

**EFEKTIVITAS PEMBERIAN KOMBINASI RIBOSOM
DAN FORMALIN KILLED CELL *Vibrio alginolyticus*
PADA BENIH IKAN KERAPU TIKUS
(*Cromileptes altivelis*)**

SKRIPSI

PROGRAM STUDI S-1 BUDIDAYA PERAIRAN



Oleh :

ADI WIBOWO
NGANJUK - JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2007**

**EFEKTIVITAS PEMBERIAN KOMBINASI RIBOSOM
DAN FORMALIN KILLED CELL *Vibrio alginolyticus*
PADA BENIH IKAN KERAPU TIKUS
(*Cromileptes altivelis*)**

**Skripsi sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar
Sarjana Perikanan pada Program Studi S-1 Budidaya Perairan
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga**

Oleh :

**ADI WIBOWO
NIM. 060210070 P**

Menyetujui,
Komisi Pembimbing



Dr. Ir. Hari Suprpto, M.Agr.
Pembimbing I



Sri Agus Sufjarwo, PhD., Drh.
Pembimbing II

Mengetahui,
Ketua Program Studi S-1
Budidaya Perairan



Prof. Dr. Drh. Hj. Sri Subekti B. S., DEA.
NIP. 130 687 296

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa Laporan Skripsi ini, baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar Sarjana Perikanan.

Menyetujui,
Panitia Penguji,



Ir. Wahyu Tjahjaningsih, M.Si.
Ketua



Ir. Agustono, M.Kes
Sekretaris



Didik Handijatno, M.S., Drh.
Anggota



Dr. Ir. Hari Suprpto, M.Agr.
Anggota



Sri Agus Sudjarwo, Ph.D., Drh.
Anggota



Surabaya, 30 Juli 2007
Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,

Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., Drh.
NIP.130 687 305

RINGKASAN

ADI WIBOWO. Efektivitas Pemberian Kombinasi Ribosom Dan *Formalin Killed Cell Vibrio alginolyticus* Pada Benih Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*). Dosen pembimbing : Dr. Hari Suprpto, M.Agr, Ir dan Sriagus Sudjarwo, PhD, drh.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan membandingkan efektivitas penggunaan ribosom, *formalin killed cell* dan kombinasi ribosom dan *formalin killed cell Vibrio alginolyticus* dalam memberikan proteksi benih ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) dari infeksi bakteri *Vibrio alginolyticus*.

Ikan divaksin dengan ribosom 80 µg/ikan, *formalin killed cell* 0,5 mg/ikan atau kombinasi ribosom dan *formalin killed cell* masing-masing 40 µg/ikan dan 0,25 mg/ikan. Setelah seminggu dilakukan *booster* dengan dosis yang sama. Seminggu kemudian dilakukan ujiantang dan mortalitas diamati selama seminggu. Parameter yang diamati antara lain: titer antibodi, sintasan, *relative percent survival* (RPS), histopatologi dan berat molekul antigen.

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 5 ulangan. Hasil penelitian dianalisis menggunakan ANAVA (Analisis Varian) dan untuk mengetahui perlakuan mana yang berbeda diantara semua perlakuan maka dilakukan uji jarak Duncan dengan derajat kepercayaan 0,05. Untuk menganalisa histopatologi menggunakan uji Kruskal Wallis dan dilanjutkan dengan uji Z dengan derajat kepercayaan 0,05.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa 1) Sintasan setelah diinfeksi *Vibrio alginolyticus* pada kontrol 32%, ikan yang divaksin ribosom 72%, FKC 60% dan kombinasi ribosom dan FKC 76%. 2) Tidak ada perbedaan yang nyata pada nilai RPS dari setiap perlakuan. 3) Terjadi kenaikan titer antibodi setelah vaksinasi dan ujiantang.

SUMMARY

ADI WIBOWO. Effectiveness of Combined Ribosomal And Formalin Killed Cell of *Vibrio alginolyticus* At Fish Fingerling of Mouse Grouper (*Cromileptes altivelis*). Academic Advisor : Dr. Hari Suprpto, M.Agr, Ir and Sriagus Sudjarwo, PhD, drh.

The object of this study to know and compare effectiveness usage of ribosomal, formalin killed cell (FKC) and combined ribosomal and FKC of *Vibrio alginolyticus* on protected mouse grouper (*Cromileptes altivelis*) from infection of *Vibrio alginolyticus*.

Fish was vaccinated using ribosomal 80 µg/fish, FKC 0,5 mg or combined ribosomal and FKC each 40 µg / fish and 0,25 mg / fish. A week later, application booster with same dose. Then challenged with *Vibrio alginolyticus* and mortality observed during one week. Parameters observe: antibody titer, survival rate, relative percent of survival (RPS), histopathology and molecule weight of antigen.

This research using Complete Random Device (RAL) by 4 treatment and 5 restating. Result of research was analysed using ANAVA (Analysis Variant) and to know which treatment different among all treatment hence distance test of Duncan with trust degree 0,05. To analysis histopathology use test of Cruskal Wallis and continued with Z test with trust degree 0,05.

Result of research shows that 1) Survival rate after infection of *Vibrio alginolyticus* at control 32%, fish which vaccine of ribosomal 72%, FKC 60% and combined ribosomal and FKC 76 2) There is no difference of RPS from every treatment 3) Increasing of antibody titer after vaccination .

KATA PENGANTAR

Segala puji atas kehadiran Allah SWT. yang telah memberikan kesehatan selama masa penelitian dan kelancaran dalam menyelesaikan skripsi yang berjudul Efektivitas Kombinasi Ribosom dan *Formalin Killed Cell Vibrio alginolyticus* pada Benih Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*).

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan penghargaan serta ucapan terima kasih yang tak terhingga kepada :

1. Dr. Hari Suprpto, M.Agr, Ir dan Sri Agus Sudjarwo, PhD, Drh selaku Dosen Pembimbing.
2. Bapak, Ibu dan segenap keluarga yang telah memberikan dukungan moral dan materi.
3. PT Panen Lestari Internusa yang mendukung materi selama masa perkuliahan dan semua pihak yang tidak dapat disebut satu per satu.

Penelitian ini didanai oleh Penelitian Hibah Bersaing tahun 2006, No. kontrak 036/SPPP/PP-PM/DP3/IV/2005. Akhirnya semoga makalah skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis khususnya dan pembaca pada umumnya.

Surabaya, 20 April 2007

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
SUMMARY	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang.....	1
1.2 Rumusan masalah	3
1.3 Tujuan	4
1.4 Manfaat	5
BAB II. STUDI PUSTAKA	6
2.1 Ikan kerapu tikus.....	6
2.1.1 Klasifikasi	6
2.1.2 Morfologi	7
2.1.3 Habitat dan penyebaran.....	7
2.1.4 Biologi reproduksi	8
2.2 <i>Vibrio alginolyticus</i>	9
2.2.1 Klasifikasi	9
2.2.2 Isolasi dan identifikasi	9
2.2.3 Vibriosis.....	10
2.3 Vaksin	11

2.3.1 Formalin killed cell.....	12
2.3.2 Ribosom	13
BAB III. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	15
3.1 Kerangka konseptual.....	15
3.2 Hipotesis.....	17
BAB IV. METODOLOGI	18
4.1 Tempat dan waktu.....	18
4.2 Bahan dan peralatan.....	18
4.2.1 Ikan coba.....	18
4.2.2 Isolat bakteri <i>Vibrio alginolyticus</i>	18
4.2.3 Media kultur bakteri.....	19
4.2.4 Bahan kimia	19
4.2.5 Alat penelitian.....	19
4.3 Metode penelitian.....	20
4.3.1 Rancangan penelitian.....	20
4.3.2 Prosedur kerja	20
4.3.3 Peubah yang diamati	25
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	28
5.1 Hasil	28
5.1.1 Penelitian pendahuluan.....	28
5.1.2 Titer antibodi	29
5.1.3 <i>Survival rate</i> (SR).....	30
5.1.4 <i>Relative percent survival</i>	31
5.1.5 Histopatologi	32
5.1.6 Elektroforesis.....	33
5.2 Pembahasan	34
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	44
6.1 Kesimpulan	44
6.2 saran	45
DAFTAR PUSTAKA.....	46
LAMPIRAN.....	51

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Patogenitas <i>Vibrio alginolyticus</i>	29
2. Hasil pengukuran titer antibodi ikan kerapu tikus	29
3. <i>Survival rate</i> dan <i>relative percent survival</i> ikan kerapu tikus setelah uji tantang dengan bakteri <i>Vibrio alginolyticus</i> 10 ⁸	30
4. Perubahan histopatologi hati ikan kerapu tikus setelah diinfeksi <i>Vibrio alginolyticus</i>	33

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kerapu tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>).....	7
2. Kerangka konseptual.....	24
3. Histopatologi sel hati ikan kerapu tikus yang sehat (A) dan yang terkena vibriosis (B)	32
4. Histopatologi sel hati ikan kerapu tikus yang divaksin ribosom (C) dan yang divaksin <i>formalin killed cell</i> (D).....	32
5. Histopatologi sel hati ikan kerapu tikus yang divaksin kombinasi ribosom dan <i>formalin killed cell</i> (E).....	32
6. Hasil elektroforesis SDS-PAGE	34
7. Morfologi ikan kerapu tikus setelah diinfeksi <i>V. alginolyticus</i>	37

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Hasil pengamatan dan perhitungan LD 50 <i>Vibrio alginolyticus</i> pada ikan kerapu tikus.....	51
2. <i>Survival rate</i> (SR) ikan kerapu tikus setelah diinfeksi <i>Vibrio alginolyticus</i> 10 ⁸	52
3. Skoring histopatologi sel hati ikan kerapu tikus.....	54
4. <i>Relative percent survival</i> (RPS) ikan kerapu tikus setelah diinfeksi <i>Vibrio alginolyticus</i> 10 ⁸	61
5. Hasil pengukuran konsentrasi protein dalam vaksin	63

BAB I

PENDAHULUAN

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Permintaan pasar ikan kerapu meningkat terutama pasar ekspor seperti Hongkong, Singapura, Taiwan, China dan Jepang menyebabkan produksi ikan kerapu tikus terus ditingkatkan. Menurut catatan Departemen Kelautan dan Perikanan (2005) pasar ikan kerapu hidup yang paling utama di dunia adalah pasar Asia Timur, khususnya pasar di Hongkong dengan total impor sebesar 30.000 ton selama dua dekade terakhir. Selanjutnya, Departemen Kelautan dan Perikanan (2006) menambahkan bahwa sepanjang periode 9 bulan pertama di tahun 2005, impor kerapu hidup naik sebesar 5,7% dibandingkan dengan periode yang sama pada tahun 2004, yaitu mencapai 8.295,5 ton dengan nilai sekitar 481,5 milyar. Ikan kerapu tikus dengan nama Hongkong *Lo Su Pan* menempati pasar kelas atas yang memiliki harga yang sangat mahal. Harga ikan kerapu tikus di dunia rata-rata Rp. 300.000 per kg (Kompas, 2005). Sedangkan di pasar Hongkong, ikan kerapu tikus dalam kondisi hidup mencapai Rp. 360.000-450.000 per kg dan kondisi mati mencapai Rp. 90.000-117.000 per kg (Harianto, 2005)

Selama ini produksi ikan kerapu lebih banyak disuplai dari hasil perikanan tangkap. Posisi produksi ikan kerapu budidaya terhadap penangkapan dilaporkan oleh Menteri Kelautan dan Perikanan (2002) bahwa dari sekitar 58.905 ton produksi ikan kerapu di Indonesia, hanya sekitar 7.500 ton (sekitar 13%) yang berasal dari budidaya (Subiyanto, 2005). Namun produksi dari hasil

penangkapan di laut nilainya semakin menurun. Berdasarkan catatan Dinas Kelautan dan Perikanan (2004) seperti yang dikutip Nindarwi (2006), hasil produksi penangkapan ikan kerapu semakin menurun hampir mencapai 60%. Hal ini menunjukkan ketidak-seimbangan antara jumlah penangkapan dan hasil reproduksi di alam yang dapat membahayakan kelestarian ikan kerapu. Oleh karena itu, produksi ikan kerapu khususnya kerapu tikus melalui budidaya harus dioptimalkan.

Usaha budidaya ikan kerapu tikus sekarang masih dihadapkan pada berbagai kendala. Kendala utama yang sering ditemui di lapangan adalah kematian benih dalam jumlah besar. Kematian massal benih ikan kerapu di *hatchery* disebabkan oleh pakan yang tidak tepat, kualitas air yang buruk dan infeksi penyakit. Menurut Maftuch (2001) bahwa sebagian besar infeksi patogen pada benih ikan kerapu tikus di Indonesia disebabkan oleh infeksi *Vibrio alginolyticus* dan *Vibrio parahaemolyticus*. *Vibrio alginolyticus* dapat menyebabkan angka kematian benih ikan kerapu tikus yang sangat tinggi, bahkan dapat mencapai 100% dalam waktu singkat (Murdjani, 2002; Kamiso, 2004).

Berdasarkan permasalahan di atas maka perlu dilakukan penanganan dan pencegahan terhadap vibriosis pada benih ikan kerapu. Usaha untuk pencegahan terhadap vibriosis dilakukan dengan perbaikan kualitas air, perbaikan pakan dan vaksinasi. Menurut Ninomiya, *et al* (1992) bahwa penggunaan vaksin ribosom *Pasteurella piscicida* dapat memberikan proteksi ikan ekor kuning (*Seriola quinqueradiata*) dari pasteurellosis yang disebabkan oleh infeksi *Pasteurella piscicida*. Selanjutnya Madeali, dkk (2004) mengatakan bahwa *formalin killed cell Vibrio sp.* mampu menaikkan SR udang windu (*Penaeus monodon* Fabricus)

setelah diinfeksi *Vibrio* sp. Namun untuk diaplikasikan ke ikan kerapu tikus dan efektivitas kombinasi ribosom dan *formalin killed cell Vibrio alginolyticus* perlu diteliti lebih lanjut.

Pada penelitian ini, pemberian ribosom, *formalin killed cell* dan kombinasi ribosom dan *formalin killed cell* dilakukan dengan cara injeksi. Bila dilakukan secara oral teknik pemberiannya belum dapat dikuasai dengan baik karena kebiasaan benih ikan kerapu adalah memakan pakan hidup. Pemberian dengan cara injeksi memudahkan vaksin akan langsung diserap tubuh sehingga lebih efisien. Untuk menghilangkan pengaruh teknik perlakuan yang dapat menyebabkan ikan stress maka perawatan ikan harus lebih hati-hati termasuk penanganan kualitas air dan pemberian pakan harus optimal.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, rumusan masalahnya adalah:

1. Apakah penggunaan ribosom, *formalin killed cell* atau kombinasi ribosom dan *formalin killed cell Vibrio alginolyticus* dapat menaikkan sintasan benih ikan kerapu tikus terhadap infeksi *Vibrio alginolyticus* ?.
2. Bagaimana nilai *relative percent survival* penggunaan ribosom, *formalin killed cell* atau kombinasi ribosom dan *formalin killed cell Vibrio alginolyticus* pada benih ikan kerapu tikus setelah diinfeksi *Vibrio alginolyticus* ?.
3. Apakah penggunaan ribosom, *formalin killed cell* atau kombinasi ribosom dan *formalin killed cell Vibrio alginolyticus* dapat menaikkan titer antibodi benih ikan kerapu tikus ?.

1.3 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui:

1. Sintasan benih ikan kerapu tikus yang divaksin ribosom, *formalin killed cell* atau kombinasi ribosom dan *formalin killed cell Vibrio alginolyticus* setelah diinfeksi *Vibrio alginolyticus*.
2. Nilai *relative percent survival* ikan kerapu tikus yang divaksin ribosom, *formalin killed cell* atau kombinasi ribosom dan *formalin killed cell Vibrio alginolyticus* setelah diinfeksi *Vibrio alginolyticus*.
3. Titer antibodi benih ikan kerapu tikus setelah divaksin ribosom, *formalin killed cell* atau kombinasi ribosom dan *formalin killed cell Vibrio alginolyticus*.

1.5 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah

1. Untuk memberikan informasi mengenai efektivitas pemberian ribosomal, *formalin killed cell* dan kombinasi ribosom dan *formalin killed cell Vibrio alginolyticus* dalam memberikan proteksi benih ikan kerapu tikus dari infeksi *Vibrio alginolyticus*.
2. Vaksin kombinasi ribosom dan *formalin killed cell* dapat digunakan sebagai vaksin alternatif dalam menanggulangi vibriosis yang dominan disebabkan oleh *Vibrio alginolyticus* sehingga diharapkan nilai sintasan dan produksi kerapu tikus dapat meningkat.

BAB II

STUDI PUSTAKA

BAB II

STUDI PUSTAKA

2.1 Ikan Kerapu Tikus

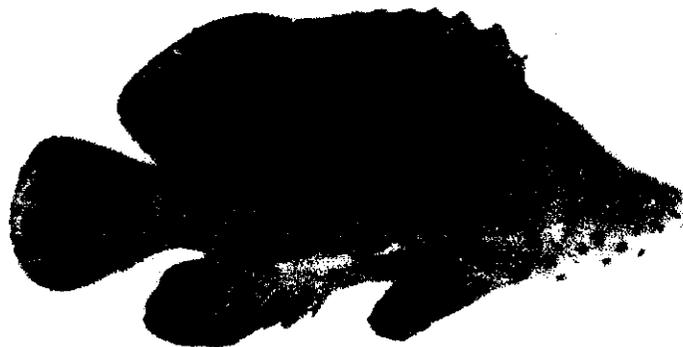
2.1.1 Klasifikasi

Ikan kerapu tikus di pasar internasional dikenal dengan nama *polka – dot grouper* atau *hump – backed rocked*. Nama kerapu biasanya digunakan untuk 4 genus anggota famili Serranidae yaitu *Epinephelus*, *Variola*, *Plectropoma* dan *Cromileptes* (Nontji 1978). Genus *Cromileptes* bersifat *monotypic*, yang berarti hanya mempunyai 1 spesies yaitu *Cromileptes altivelis*. Menurut Randall (1987) seperti yang dikutip Murdjani (2002) klasifikasi ikan kerapu tikus adalah sebagai berikut:

Phylum	: Chordata
Sub Phylum	: Vertebrata
Class	: Osteichthyes
Sub Class	: Actinopterygi
Ordo	: Percomorphi
Sub Ordo	: Percoidea
Family	: Serranidae
Sub Family	: Epinephelinae
Genus	: <i>Cromileptes</i>
Spesies	: <i>Cromileptes altivelis</i>

2.1.2 Morfologi

Ikan kerapu tikus ini bertubuh agak pipih dan dasar kulit tubuhnya abu – abu dengan bintik – bintik hitam di seluruh permukaan tubuh dan sirip ekornya berbentuk membulat. Sirip punggung tersusun dari 10 jari – jari keras dan 19 jari – jari lunak. Pada sirip dubur terdapat 3 jari jari keras dan 10 jari – jari lunak, sisik berbentuk sikloid, bagian dorsal meninggi berbentuk cembung. Ikan ini dapat mencapai panjang tubuh 70 cm atau lebih, namun yang dikonsumsi umumnya berukuran 30 – 50 cm (Antoro, *dkk* 1999).



Sumber: Tampubolon dan Mulyadi (1989)
Gambar 1. Kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*)

2.1.3 Habitat dan penyebaran

Daerah penyebaran ikan kerapu tikus dimulai dari Afrika Timur sampai Pasifik Barat. Menurut Tampubolon dan Mulyadi (1989) di Indonesia, ikan kerapu tikus banyak ditemukan di perairan Pulau Sumatera, Jawa, Sulawesi, Pulau Buru dan Ambon. Ikan kerapu muda umumnya hidup di perairan karang pantai dengan kedalaman 0,5 – 3 m. Setelah menginjak dewasa, akan bergerak ke perairan yang lebih dalam, yaitu berkisar antara 7 – 40 m dan perpindahan ini

biasanya berlangsung pada siang hari sampai sore hari. Telur dan larva bersifat *pelagic* sedangkan ikan kerapu muda hingga dewasa bersifat *demersal*. Menurut Yoshimitsu (1986) parameter ekologis yang cocok untuk pertumbuhan ikan kerapu yaitu temperatur antara 24 – 32 °C, salinitas antara 30 – 33 ppt, DO > 3,5 ppm dan pH 7,8 – 8,0.

2.1.4 Biologi reproduksi

Ikan kerapu tikus bersifat *hermaprodit protogini* yang berarti dalam siklus hidupnya terjadi proses diferensiasi gonad yang berjalan dari fase betina ke fase jantan seiring dengan pertumbuhan dan umurnya (Effendi, 1997). Menurut Antoro, *dkk* (1999) Ikan jantan yang beratnya 1 – 2 kg sudah mampu menghasilkan sperma tetapi belum berfungsi, sedangkan sperma ikan jantan dengan berat 2,5 kg atau lebih telah mampu membuahi telur dari ikan betina.

Ikan kerapu tikus sering terlihat bergerombol apabila akan melakukan pemijahan. Di Perairan Indo Pasifik puncak pemijahan berlangsung beberapa hari sebelum bulan purnama pada malam hari (Tampubolon dan Mulyadi, 1989). Musim-musim pemijahan ikan kerapu di Indonesia terjadi pada bulan Juni – September dan November – Februari, terutama di Kepulauan Riau, Karimun Jawa dan Irian Jaya (Sugama, 1995). Menurut Shapiro (1987) beberapa spesies ikan kerapu mempunyai musim pemijahan 6 – 8 kali per tahun. Untuk pemijahan kerapu baik dengan menggunakan metode manipulasi lingkungan maupun rangsangan hormonal, fekunditas dapat mencapai antara 200.000 – 300.000 per kg induk.

2.2 *Vibrio alginolyticus*

2.2.1 Klasifikasi

Bakteri *Vibrio alginolyticus* adalah salah satu jenis bakteri vibrio penyebab penyakit vibriosis yang cukup merugikan terutama pada budidaya ikan laut, khususnya ikan kerapu tikus. Menurut *Bergey's Manual of Bacteriology* (Buchanan and Gibbons, 1974) bakteri *Vibrio alginolyticus* diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Vibrionales
Family	: Vibrionaceae
Genus	: <i>Vibrio</i>
Species	: <i>Vibrio alginolyticus</i>

2.2.2 Isolasi dan identifikasi

Bakteri *Vibrio alginolyticus* sering diisolasi langsung dari darah, kemudian dilakukan inokulasi pada media *Thiosuphate Citrate Bile Agar* (TCBA), *Tryptone Soya Agar* (TSA) yang disiapkan dengan air laut atau agar air laut. Masa inkubasi 2 sampai 7 hari dengan suhu 15 sampai 25°C (Austin and Austin, 1987). Selanjutnya menurut Kamiso (1996) bakteri *Vibrio alginolyticus* juga dapat diisolasi dengan media *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA) yang ditambahkan NaCl antara 0,5-3,5% dan diinkubasi pada suhu kamar (18-30°C) dalam waktu 24-48 jam. Bakteri vibrio akan tumbuh dengan baik membentuk koloni yang bulat, tepi rata, konvek, dan berwarna krem sampai coklat muda.

Bakteri *Vibrio alginolyticus* mempunyai cirri-ciri antara lain berbentuk batang pendek, bersifat gram negative, bergerak dengan flagellum polar, tidak berspora, tidak berkapsul, bersifat fakultatif anaerob dan berkembang biak dengan pembelahan biner. Bakteri ini bila ditumbuhkan pada media TCBS akan membentuk koloni padat menyebar rata (*swarming*). Selain itu bakteri ini juga mampu melakukan fermentasi, mereduksi nitrat, dan dapat tumbuh pada suhu 37°C serta pada salinitas di atas 7%. Bakteri ini juga memproduksi katalase, oksidase, indole, H₂S, *lysine decarboxylase*, *ornithine decarboxylase*, dan *phenilalanine deaminase*. Selain itu juga mendegradasi chitin, gelatin, lipid, urea dan zat tepung (*starch*). Produksi asam diperoleh dari maltose, mannitol, mannose, salicin dan sucrose (Austin dan Austin, 1987; Istiqomah, dkk, 2001; Murdjani, 2002).

2.2.3 Vibriosis

Vibriosis merupakan penyakit bakterial dari genus vibrio yang sering ditemukan pada budidaya ikan kerapu mulai stadia telur, larva, benih bahkan sampai induk (Isqomah dkk, 2001). Vibriosis dapat menyebabkan kematian lebih dari 80% pada budidaya ikan dengan sistem keramba jaring apung (Yuasa *et al*, 2000). Penularan penyakit vibriosis dapat melalui air atau kontak langsung antar ikan dan menyebar sangat cepat pada ikan-ikan yang dipelihara dengan kepadatan yang tinggi (Sunyoto, 1994). Species Vibrio yang patogen mampu menimbulkan penyakit *epizootic* yang serius, namun beberapa species yang lain bersifat oportunistik yang menyebabkan penyakit apabila ikan mengalami luka fisik, luka akibat parasit dan stress (Chanratchakool, 1995; Zafran *et al*, 1998).

Menurut Murdjani (2002), dan Kamiso (1996) gejala eksternal penyakit vibriosis adalah punggung kehitaman, nafsu makan turun atau hilang, eritema pangkal sirip dan dalam mulut, petechiae pada otot dan daging, haemorrhagik pada alat kelamin dan dubur yang dapat meluas sampai ke daging. Gejala internal adalah hemorrhagik dan nekrotik pada usus dan otot, empedu dan hati, ginjal membengkak. Biasanya kematian ikan banyak disebabkan tidak berfungsinya organ tubuh dan kekurangan oksigen.

Roza dkk (1996) berpendapat bahwa bakteri *Vibrio* sp hidup pada air laut sampai air payau terutama air yang tidak mengalir dan kaya akan bahan organik. Hal ini memang beralasan karena pada lingkungan yang buruk dengan kualitas air yang tidak mendukung kehidupan ikan kerapu dapat menyebabkan ikan kerapu menjadi stress dan patogen yang termasuk bakteri vibrio akan mudah menginfeksi ikan kerapu. Ellis (1988) dan Reed and Floyd (1996) menyatakan bahwa bakteri dari genus *Vibrio* sp. yang bersifat patogen bagi ikan laut maupun air payau antara lain: *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. ordalli*, *V. damsella*, *V. charrariae* dan *V. vulnificus*. Sementara Wijayanti dan Hamid (1997) berhasil melakukan identifikasi bakteri vibrio patogen pada ikan kerapu tikus yaitu *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, dan *V. marinus*.

2.3 Vaksin

Menurut Kamiso (1996) vaksin adalah suspensi patogen yang sudah dilemahkan atau dimatikan, bagian dari patogen atau substrat yang merupakan produk dari patogen yang bersifat antigenik, immunogenik, dan protektif. Suatu vaksin yang bersifat immunogen apabila dapat merangsang dalam pembentukan antibodi (Supriadi, 1990). Selanjutnya Kamiso (1996) mengatakan bahwa

vaksinasi adalah proses pemasukan antigen ke dalam tubuh ikan atau udang untuk mendapatkan kekebalan spesifik dan nonspesifik sehingga tanggap terhadap patogen tertentu atau spektrum tertentu. Vaksinasi dapat dilakukan dengan cara injeksi, rendaman, *spray* dan melalui pakan atau oral (Astuti *dkk*, 2003)..

Vaksinasi aktif yang dapat merangsang respon imun humoral dan seluler. Aspek terpenting dari respon imun spesifik yang disebabkan oleh vaksinasi adalah terbentuknya sel memori yang memiliki umur panjang. Efektifitas vaksinasi dipengaruhi oleh dosis vaksin untuk menginduksi respon imun. Beberapa hal yang mempengaruhi keberhasilan vaksinasi yaitu adanya mutu antigen, cara vaksinasi, umur ikan, kualitas nutrisi pakan, polutan, antibiotik dan lingkungan (Ellis, 1988; Triyanto *dkk*, 1996).

2.3.1. *Formalin killed cell*

Vaksin sel utuh atau *formalin killed cell vaccine* yaitu vaksin dari sel utuh bakteri yang dimatikan dengan cara menginaktifkan sel bakteri dengan formalin (Kusuda *et al*, 1988). Vaksin *formalin killed cell* mengandung komponen endotoksin sebagai antigen untuk merangsang pembentukan antibodi, diantaranya adalah lipopolisakarida yang berasal dari dinding sel bakteri gram negatif. Lipopolisakarida dapat menginduksi kekebalan yang diperlukan untuk ikan (Hermayanti *dkk*, 2000). Austin and Austin (1987) mengemukakan beberapa vaksin yang berasal dari sel bakteri utuh yang diproduksi secara komersial adalah vaksin furunkulosis dari bakteri *Aeromonas salmonicida*, vaksin *Enteric Red Mouth* dari *Yersenia ruckeri* dan vaksin vibriosis dari bakteri *Vibrio sp*.

Tizard (1982) dan Kabata (1995) menyatakan bahwa ada 3 struktur antigen utama dari permukaan bakteri adalah dinding sel (antigen O), kapsul

(antigen K) dan flagella (antigen H). Antigen dinding sel bakteri gram negatif terdiri dari polisakarida-lemak-protein yang bersifat toksik dan diklasifikasikan sebagai antigen O. Kapsul bakteri dapat berupa polisakarida atau protein. Organisme berkapsul sulit untuk dihilangkan dalam aliran darah, kecuali terdapat antibodi maka antibodi tersebut akan tertuju terhadap antigen kapsul sehingga antigen ini penting untuk menginduksi kekebalan. Flagella bakteri terdiri dari protein dengan demikian sepenuhnya antigenik, dikenal dengan antigenik H. Antigen H dan K belum tentu dimiliki oleh semua jenis bakteri.

2.3.2. Ribosom

Ribosom merupakan partikel kecil, padat, berderet dan granular dari ribonuklease. Ribosom sering ditemukan dalam keadaan bebas didalam matriks mitokondria, kloroplas dan sitoplasma atau menempel pada membrane reticulum endoplasmic terutama pada sel eukaryotik. Ribosom dapat ditemukan dalam sel prokaryotik dan eukaryotic. Ribosom merupakan sel yang aktif dalam mensintesis protein (Verma *and* Agarwal, 2005).

Pada mikroskop elektron, ribosom tampak sebagai partikel-partikel dalam sitoplasma. Ribosom bakteri mempunyai ukuran 16X18 nm dan berat molekul $2,7 \times 10^3$ dalton. Ribosom yang masih utuh akan mengendap pada kecepatan sedimentasi sebesar kurang lebih 70 satuan SVEDBERG, maka dinamakan ribosom 70S. Ribosom bakteri terdiri dari 2 komponen sub unit ribosom yaitu 50S dan 30S, yang menyatu menjadi ribosom 70S. Kedua sub unit ribosom saling melekat dengan posisi ribosom sub unit 30S berada diatas 50S (Schlegel, 1995; Quinn *et al*, 2002; Verma *and* Agarwal, 2005).

Ditinjau dari komposisi kimia ribosom, ribosom terdiri dari RNA dan protein. Proporsi RNA dan protein dalam ribosom hampir sama dengan proporsi antar sub unitnya. Ribosom bakteri berisi RNA 60-70% dan protein 36-37%. Misalnya pada bakteri *E. Colli* memiliki ribosom yang berisi 63% RNA dan 37% protein. Ribosom RNA terdiri dari 3 tipe yaitu 23S rRNA dan 5S rRNA yang terletak pada ribosom sub unit 50S dan 16S rRNA terletak pada ribosom sub unit 30S. Sedangkan ribosom protein tersusun atas 21 jenis protein pada sub unit 30S dan 32-34 protein pada sub unit 50S. Sel bakteri mengandung lebih kurang 5 000-50.000 ribosom, jumlahnya semakin tinggi, semakin cepat pertumbuhan sel (Schlegel, 1995; Verma and Agarwal, 2005).

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konseptual

Budidaya ikan kerapu tikus di Indonesia saat ini memiliki hambatan yang perlu mendapat perhatian serius. Produksi benih yang sangat rendah yang sering terjadi hampir di setiap panti pembenihan. Produksi benih yang rendah sebagai akibat adanya infeksi bakteri vibrio yang dikenal sebagai vibriosis dan penyakit ini akan mudah mewabah karena adanya gangguan kualitas air, formulasi pakan yang kurang tepat dan ikan yang stress karena *handling* serta adanya luka pada tubuh ikan. Vibriosis pada ikan kerapu tikus dominan disebabkan oleh *Vibrio alginolyticus*. Infeksi *Vibrio alginolyticus* mudah mewabah sehingga mengakibatkan kematian massal benih kerapu tikus. Akibat infeksi bakteri ini dapat menyebabkan kematian benih kerapu tikus lebih dari 80%.

Kematian massal benih ikan kerapu tikus sangat merugikan baik di panti pembenihan maupun produksi kerapu tikus untuk konsumsi. Kematian massal ikan kerapu tikus dapat menyebabkan persentase sintasanya sangat rendah. Kematian ditandai dengan nafsu makan menurun, gerakan berputar ke atas, haemoragik, abses dan kerusakan pada ekor dan sisip. Pada pemeriksaan histopatologi hati ikan kerapu akibat infeksi *Vibrio alginolyticus* timbul kerusakan yang parah, mulai dari degenerasi melelemak sampai nekrosis kariolisis.

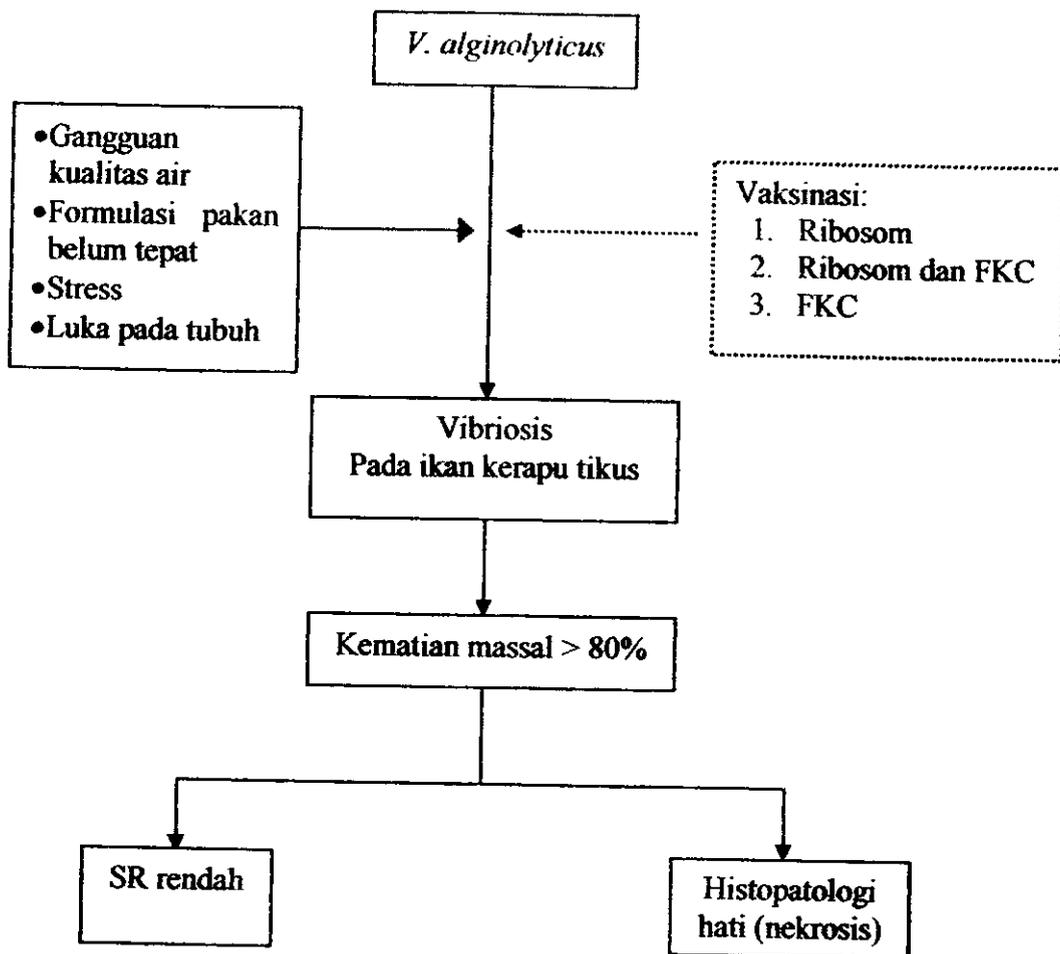
Usaha untuk mencegah dan mengendalikan vibriosis terus dilakukan baik dengan perbaikan lingkungan, perbaikan formulasi pakan dan penggunaan bahan-bahan kimia. Namun, usaha ini dirasa belum efektif untuk mencegah dan mengendalikan vibriosis. Perbaikan sistem kekebalan tubuh ikan kerapu tikus dengan vaksinasi merupakan gagasan yang rasional. Memproduksi benih ikan kerapu tikus yang resisten terhadap vibriosis diharapkan dapat mampu mengendalikan kematian massal benih ikan kerapu tikus.

Vaksin *formalin killed cell* mampu memberikan proteksi yang baik terhadap vibriosis udang windu (Madeali, dkk, 2004). *Formalin killed cell* merupakan vaksin klasik yang sering digunakan dalam vaksinasi, bahkan telah dikomersilkan dari beberapa jenis bakteri. Ribosom protein sebagai antigen dalam vaksinasi sering diragukan imunogenitasnya, namun dalam beberapa penelitian telah dibuktikan mampu meningkatkan sintasan ikan dengan signifikan. Vaksin ribosom mampu memberikan perlindungan yang sangat baik pada ikan ekor kuning dari *Pasteurella piscicida* (Ninomiya *et al*, 1992). Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan ribosom, *formalin killed cell* dan kombinasinya pada benih ikan kerapu tikus yang hasilnya diharapkan dapat memberikan kekebalan dalam tubuh benih ikan kerapu tikus, sehingga dapat meningkatkan persentase sintasan, RPS, titer antibodi, dan proteksi hati ikan kerapu tikus.

3.2 Hipotesis

Hipotesis yang dapat dibuat dari penelitian ini adalah:

1. Penggunaan ribosom, *formalin killed cell* atau kombinasi ribosom dan *formalin killed cell Vibrio alginolyticus* dapat menaikkan sintasan benih ikan kerapu tikus setelah diinfeksi bakteri *Vibrio alginolyticus*.
2. Penggunaan ribosom, *formalin killed cell* atau kombinasi ribosom dan *formalin killed cell Vibrio alginolyticus* dapat menaikkan nilai *relative percent survival* benih ikan kerapu tikus setelah diinfeksi bakteri *Vibrio alginolyticus*.



Gambar 2. Kerangka konseptual

BAB IV
METODOLOGI

BAB IV

METODOLOGI

4.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan selama lebih dari 6 bulan, dimulai pada tanggal 1 Juli 2006 dan selesai tanggal 10 Januari 2007, di Laboratorium *Gastroenteritis Tropical Disease Centre* (TDC) Universitas Airlangga, Laboratorium Pendidikan Perikanan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, dan Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.2 Bahan dan Alat Penelitian

4.2.1 Ikan coba

Ikan coba yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah benih ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*). Ikan kerapu tikus diperoleh dari Balai Budidaya Air Payau (BBAP) Situbondo. Ikan ini berumur kurang lebih 3 bulan dengan panjang total 6-7 cm dan berat rata-rata 10-12 gram, sebanyak 157 ekor.

4.2.2 Isolat bakteri *Vibrio alginolyticus*

Isolat bakteri *Vibrio alginolyticus* yang akan digunakan diperoleh dari Laboratorium Hama dan Penyakit Ikan Balai Budidaya Air Payau (BBAP) Situbondo. Bakteri dinyatakan dalam kondisi murni setelah dilakukan tes biokimia. Patogenitas bakteri *Vibrio alginolyticus* ini dinyatakan masih tinggi sehingga bakteri ini masih dapat menimbulkan sakit apabila diinfeksi ke ikan kerapu.

4.2.3 Media kultur bakteri

Media kultur yang akan digunakan pada penelitian ini meliputi *Brain Heart Infusion broth* (BHIB) yang mengandung 3% NaCl dan media selektif agar *Thiosulfate Citrate Bile Sucrose* (TCBS). Media BHIB ini digunakan untuk menumbuhkan bakteri *Vibrio alginolyticus*. Penggunaan media cair ini akan memudahkan dalam tahap pemanenan bakteri karena dilakukan dengan sentrifuse. Media selektif agar TCBS digunakan untuk menguji bakteri setelah diberi formalin dan untuk estimasi koloni bakteri.

4.2.4 Bahan kimia

Bahan kimia yang akan digunakan selama penelitian antara lain: *phospate bufer saline* (PBS), *phospate bufer* (PB), *deoxyribonuclease* I dan II, alkohol 70%, formalin 3%, *aquadest*, SDS, MgCl₂, NaCl, kaporit, akrilamid, bis akrilamid, TEMED, ammonium persulfat, larutan penyangga elektroforesis, larutan penyangga *stacking gel* pH 6,8, larutan penyangga *separating gel* pH 8.

4.2.5 Alat penelitian

Alat-alat yang digunakan selama penelitian ini antara lain: akuarium dan perlengkapannya, spektrofotometer, peralatan elektroforesis, spuit, erlenmeyer, tabung sentrifuse, tabung reaksi, mikropipet, *refrigerator*, vortek, sentrifuse, sonikator, mikroskop dan perlengkapannya, *mikroplate*, diluter, DO meter, pH pen, thermometer, dan refraktometer.

4.3 Metode Penelitian

4.3.1 Rancangan penelitian

Rancangan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan metode Analisis Varian (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji jarak *Duncan Multiple Range Test* (Kusriningrum, 1989). Metode analisis tersebut digunakan untuk menganalisa sintasan dan RPS. Sedangkan untuk menganalisa data histopatologi digunakan *Kruscal Wallis* dan dilanjutkan dengan uji Z. (Azwar, 2004).

Penelitian ini menggunakan 4 perlakuan dan 5 ulangan, yaitu:

Perlakuan I : Vaksinasi dengan ribosom dari *Vibrio alginolyticus*.

Perlakuan II : Vaksinasi dengan *formalin killed cell Vibrio alginolyticus*.

Perlakuan III : Vaksinasi dengan kombinasi ribosom dan *formalin killed cell Vibrio alginolyticus*.

Perlakuan IV : Tanpa vaksinasi (kontrol).

4.3.2 Prosedur kerja

a. Persiapan media pemeliharaan

Media pemeliharaan benih ikan kerapu tikus adalah air laut. Sebelum digunakan, air laut disterilisasi dengan kaporit 30 ppm. Untuk membantu mempercepat proses terutama untuk menghilangkan bau kaporit maka diberi aerasi kuat. Selain sterilisasi, air laut juga dilakukan pengendapan atau filtrasi fisik.

Akuarium yang akan digunakan berukuran 40 X 50 X 40 cm. Sebelum digunakan akuarium dibersihkan terlebih dahulu dengan air tawar, kemudian dilakukan sterilisasi dengan kaporit 10 ppm. Untuk menghilangkan bau kaporit,

dilakukan pembilasan kembali dengan air tawar lalu dikeringkan di bawah sinar matahari. Setelah pengeringan selama kurang lebih sehari, akuarium diisi dengan air laut sebanyak 3/4 dan siap digunakan.

b. Persiapan ikan uji

Benih ikan kerapu yang digunakan adalah ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) yang kondisinya sehat dan tidak ada indikasi infeksi penyakit baik secara pengamatan visual maupun keterangan dari tempat asal. Ikan dipelihara di dalam akuarium, dan setiap akuarium diisi ikan kerapu tikus sebanyak 5 ekor untuk perlakuan dan 8 ekor untuk penelitian pendahuluan. Sebelum diberi perlakuan ikan diadaptasikan selama lebih dari seminggu.

c. Penelitian pendahuluan

Benih ikan kerapu tikus yang berukuran 6-7 cm dipelihara dalam akuarium dengan volume air 3/4. Masing-masing akuarium diisi dengan ikan kerapu tikus sebanyak 8 ekor. Setelah diadaptasi lebih dari seminggu, ikan diinfeksi *Vibrio alginolyticus* dengan cara diinjeksi sebanyak 0,05 ml dengan kepadatan bakteri masing-masing 10^4 , 10^5 , 10^6 , dan 10^7 . Kemudian mortalitasnya diamati selama 5 hari. Nilai LD_{50} ditentukan dengan metode *Reed and Munch* (1938) dan kepadatan bakteri diestimasi dengan *colony count reader*.

d. Pembuatan vaksin formalin killed cell

Pembuatan vaksin *formalin killed cell* dari *Vibrio alginolyticus* berdasarkan prosedur dari Suprpto *et al* (1996). Bakteri *Vibrio alginolyticus* dikultur terlebih dahulu pada media BHIB yang mengandung 3% NaCl selama 24-48 jam. Setelah tumbuh, bakteri dipanen dan dicuci dengan cara disentrifuse

dengan kecepatan 1500 rpm selama 10 menit sebanyak 3 kali. Filtratnya sebanyak 1 gram diambil kemudian direndam dalam larutan formalin 3% selama 72 jam. Hasil yang diperoleh digunakan sebagai vaksin. Untuk mengetahui bakteri tersebut sudah mati, maka antigen vaksin dikultur pada media TCBS. Jika tidak tampak adanya koloni setelah dikultur 24-48 jam, maka bakteri tersebut sudah dapat dinyatakan mati dan jika tampak adanya koloni maka dilakukan pengulangan perendamam bakteri dalam larutan formalin. Sebelum digunakan, antigen tersebut dicuci kembali dengan PBS sebanyak 3 kali masing-masing 10 menit dengan kecepatan 1500 rpm. Kepadatan bakteri dibuat sebanyak 10 mg/ml dan disimpan di dalam *freezer* dengan suhu -4°C sampai digunakan. Dosis yang diberikan sebanyak 0,5 mg per ikan dengan cara injeksi (Ninomiya, 1992).

e. Pembuatan vaksin ribosom

Pembuatan vaksin ribosom dari *Vibrio alginolyticus* berdasarkan metode dari Kusuda *et.al.* (1988). *Vibrio alginolyticus* dikultur pada media BHIB yang mengandung 2% NaCl pada suhu 25°C selama 24 jam. Setelah itu, *Vibrio alginolyticus* hasil biakan dikumpulkan dan dicuci 3 kali dengan PBS (0,01 M, pH 7,1) yang mengandung 2% NaCl. Bakteri sebanyak 1 gram yang telah dicuci kemudian diencerkan pada PB (0,01M, pH 7,1) yang mengandung 0,01 M MgCl_2 , 0,25% *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS), $1\mu\text{g/ml}$ deoxyribonuclease I dan $0,5\mu\text{g/ml}$ deoxyribonuclease II. Kemudian larutan dipecah dengan homogenizer menggunakan 0,2 mm glass beads. Larutan bakteri yang telah dipecah, disentrifuse dengan kecepatan 27 000 X g selama 15 menit. Supernatan disentrifuse dengan kecepatan 45 000 X g selama 15 menit dan 100.000 X g selama 3 jam. Endapan yang terbentuk diencerkan dengan larutan PB yang

mengandung 0,5 % SDS, dan 0,01 mM MgCl₂ diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam, kemudian pada suhu 4°C selama semalam. Setelah inkubasi, endapan yang diencerkan tersebut disentrifuse dengan kecepatan 23 600 X g selama 15 menit. Selanjutnya 2/3 bagian atas larutan supernatan diambil dan disentrifuse pada kecepatan 64 000 X g selama 3 jam. Endapan yang terbentuk dilarutkan pada larutan PB yang berisi 0,1 mM MgCl₂ dan digunakan sebagai vaksin ribosomal. Kepadatan ribosom dibuat 1600 µg/ml dan disimpan di dalam *freezer* dengan suhu -4°C sampai digunakan. Dosis injeksi yang diberikan sebanyak 80 µg per ikan (Ninomiya, 1992).

f. Pembuatan vaksin kombinasi ribosom dan *formalin killed cell*

Untuk vaksin kombinasi ribosom dan *formalin killed cell* yaitu dengan mencampur kedua vaksin tersebut. Sebelum digunakan, vaksin *formalin killed cell* sebanyak 3 ml dengan kepadatan bakteri 10 mg/ml dan vaksin ribosom sebanyak 3 ml dengan kepadatan 1600 µg/ml dicampur dan dihomogenkan menggunakan vortex. Setelah dihomogenkan, vaksin siap digunakan. Dosis injeksi yang diberikan sebanyak 0,05 ml.

g. Imunisasi benih ikan kerapu tikus

Imunisasi ikan kerapu tikus dilakukan pada tahap benih yang telah diaklimatisasi lebih dari satu minggu. Imunisasi ikan kerapu tikus dilakukan dengan cara injeksi intramuskular dengan menggunakan spuit 1 ml dengan dosis 0,5 mg. Selang satu minggu dilakukan *booster* dengan dosis yang sama (Song *et al.*, 1982) dalam Collado *et al.* (2000). Vaksinasi ini tanpa ada pemberian tambahan adjuvan.

h. Uji tantang benih ikan kerapu tikus

Benih ikan kerapu tikus yang telah diberi perlakuan *booster* dipelihara selama 7 hari kemudian diinfeksi dengan *Vibrio alginolyticus* melalui injeksi intramuskular. Dosis bakteri *Vibrio alginolyticus* yang diberikan sebanyak $3,6 \times 10^8$ CFU/ml berdasarkan nilai LD₅₀ yang sudah ditentukan dalam penelitian pendahuluan setelah dikalikan minimal 100 kali. Selanjutnya ikan diamati selama kurang lebih seminggu.

4.3.3 Peubah yang diamati

a. Survival rate (SR)

Survival rate (SR)

merupakan gambaran mengenai tingkat kelulusan hidup yang sering disebut sebagai SR. Perhitungan SR ikan kerapu tikus yaitu persentase jumlah ikan kerapu tikus yang masih hidup setelah perlakuan dari jumlah keseluruhan ikan kerapu tikus yang digunakan dalam perlakuan. Zooneveld (2001) merumuskan SR sebagai berikut:

$$SR = \frac{\text{Jumlah benih yang hidup}}{\text{Jumlah populasi}} \times 100\%$$

b. Relative percent survival (RPS)

Merupakan tingkat perlindungan relatif vaksin terhadap benih ikan kerapu tikus. Berdasarkan Nilai RPS, vaksin tersebut dapat dikatakan ideal atau tidak apabila diaplikasikan pada kegiatan budidaya. Varvagos (2003) merumuskan RPS (%) sebagai berikut:

$$\text{RPS} = 1 - \frac{\% \text{ mortalitas ikan divaksin}}{\% \text{ mortalitas ikan tidak divaksin}} \times 100\%$$

c. Titer antibodi

Pengukuran titer antibodi menggunakan uji aglutinasi yang mereaksikan antara antigen dengan antiserum. Pengukuran ini dilakukan tiga kali yaitu pada saat sebelum divaksin, 2 minggu sesudah divaksin dan 1 minggu sesudah ujiantang.

Pengukuran titer antibodi dilakukan dengan prosedur dari Suprpto *et al* (1996): 25 μl dari 0,01 M PBS dimasukkan kedalam setiap lubang mikroplate. Diluter dipanaskan sampai merah membara untuk mencegah kontaminasi. Antiserum sebanyak 25 μl dimasukkan ke lubang pertama dan diencerkan mulai dari lubang pertama sampai lubang terakhir. 25 μl antigen dimasukkan ke dalam setiap lubang, kemudian lubang goyang-goyangkan selama 5 menit dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam. Kemudian dilakukan pengamatan ada atau tidak aglutinasi pada setiap lubang mikroplate. Titer antibodi adalah pengenceran tertinggi dari antibodi *V. alginolyticus* yang masih dapat mengaglutinasi antigen *V. alginolyticus*.

d. Karakterisasi protein

Konsentrasi protein dalam vaksin diukur untuk estimasi dalam melakukan elektroforesis. Sebelum digunakan, alat distabilkan selama kurang lebih 30 menit. Kemudian pengukuran dapat dilakukan dengan memakai PBS sebagai kontrol. Absorbance yang digunakan adalah 280 nm dan 260 nm. Untuk menghitung konsentrasi protein digunakan rumus menurut Deutcher (1995).

$$\text{Konsentrasi protein} = (1,55 \times A_{280}) - (0,76 \times A_{260})$$

Keterangan:

A 280: absorbance pada 280 nm

A 260: absorbance pada 260 nm

Metode yang sering digunakan dalam melakukan karakteristik protein adalah metode elektroforesis SDS-PAGE. Prosedur elektroforesis SDS-PAGE yang dilakukan menggunakan metode Laemmli (1970) adalah 10 μ l antigen ditambahkan buffer 62,5 mM Tris-Cl (pH 6,8) yang mengandung 2% SDS, 10% gliserol dan 5% mercaptoetanol dengan perbandingan 1:1, kemudian dihomogenkan dengan vortex selama 5 detik. Setelah itu dipanaskan pada air mendidih (100°) selama 2 menit kemudian didinginkan. Elektroforesis dilakukan pada gel poliakrilamid 12% dan di *running* pada voltage 100 selama 2 jam. Band protein yang didapat dilakukan pewarnaan dengan *Croomasie brilliant blue* 0,1% selama 18 jam kemudian dilanjutkan dengan proses *destaining* dengan larutan methanol 50%, asam asetat glasial dalam aquades sampai latar belakang terlihat jernih. Hasil elektroforesis kemudian dianalisis dengan membandingkan setiap *band* yang terbentuk dengan protein marker.

e. Pengamatan Histologi

Pengamatan histologi pada ikan coba dilakukan untuk membandingkan jaringan dari hati pada ikan sehat (kontrol) dengan jaringan yang sama pada ikan yang telah diberi perlakuan. Organ ikan diambil dengan proses pembedahan. Selanjutnya dilakukan fiksasi dalam larutan phosphate buffer formalin 10%.

Kemudian sampel di *embedding* dalam paraffin wax dan dipotong dengan ketebalan 3-5 mm serta diwarnai dengan haemotoxylin-eosin (H dan E).

Penilaian skor histopatologi dilakukan menurut Handayani (1996), yaitu:

Nilai 1: untuk kongesti vena sentralis dan sinusoid.

Nilai 2: untuk perdarahan.

Nilai 3: untuk sel radang lebih dari 10% lapang pandang.

Nilai 4: untuk degenerasi sel lebih dari 10% lapang pandang.

Nilai 5: untuk nekrosis lebih dari 5 % lapang pandang.

f. Kualitas Air

Pengamatan kualitas dilakukan setiap hari untuk menjaga agar kualitas air tetap dalam kondisi optimal. Kualitas air yang diamati dalam penelitian ini antara lain: suhu, pH, salinitas dan oksigen terlarut.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil

5.1.1 Penelitian pendahuluan

Penelitian pendahuluan dilakukan untuk mengetahui nilai LD (*lethal dose*)₅₀ *Vibrio alginolyticus* pada ikan kerapu tikus. Nilai LD₅₀ menunjukkan dosis minimal bakteri *Vibrio alginolyticus* yang masih dapat menyebabkan kematian 50% ikan yang diuji. Selanjutnya, nilai LD₅₀ ini digunakan sebagai dosis pada ujiantang setelah dikalikan 100 kali. Pengamatan kematian ikan kerapu tikus dalam penentuan LD₅₀ dilakukan selama 7 hari.

Metode yang digunakan dalam menentukan nilai LD₅₀ *Vibrio alginolyticus* yang menginfeksi ikan kerapu tikus adalah menurut Reed *and* Munch (1938). Sedangkan kepadatan bakteri dibuat berdasarkan kepadatan setiap gram bakteri dalam 10 ml PBS. Pada pengenceran 10⁻⁷, setelah dikultur pada media TCBS sebanyak 0.1 ml diperoleh jumlah koloni bakteri *Vibrio alginolyticus* sebanyak 36. Hal ini dapat dikatakan bahwa pada pengenceran tersebut mempunyai kepadatan bakteri sebanyak 36 CFU/0,1ml = 3,6 X 10² CFU/ml. Hasil pengamatan mortalitas ikan kerapu tikus dalam penentuan LD₅₀ seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Injeksi *Vibrio alginolyticus* Terhadap Ikan Kerapu Tikus

Pengenceran	Jumlah Bakteri	Jumlah Ikan	Mortalitas	% Mortalitas
10^{-2}	$3,6 \times 10^7$	8	8	100 %
10^{-3}	$3,6 \times 10^6$	8	5	62.5 %
10^{-4}	$3,6 \times 10^5$	8	3	37.5 %
10^{-5}	$3,6 \times 10^4$	8	2	25 %

Berdasarkan tabel 1 dapat diketahui bahwa prosentase mortalitas ikan kerapu tikus sebanyak 50% terletak pada pengenceran 10^{-3} - 10^{-4} . Hasil perhitungan LD_{50} yang menggunakan rumus Reed *and* Munch (1938) menunjukkan LD_{50} *Vibrio alginolyticus* untuk ikan kerapu tikus adalah sebesar $3,6 \times 10^{5,31}$ CFU/ml. Proses penghitungan LD_{50} ini dapat dilihat pada Lampiran 1.

5.1.2 Titer antibodi

Titer antibodi diukur pada masing-masing perlakuan dan kontrol. Pengukuran titer antibodi ini dilakukan sebelum vaksinasi, 7 hari setelah vaksinasi kedua (*booster*) dan 7 hari setelah ujiantang. Hasil pengukuran titer antibodi dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Pengukuran Titer Antibodi Ikan Kerapu Tikus.

Perlakuan	Sebelum vaksinasi	Sesudah vaksinasi	Sesudah ujiantang
Ribosom	32	128	512
FKC	32	512	1024
Ribosom dan FKC	32	512	1024
Kontrol	32	32	128

Hasil pengukuran terhadap titer antibodi ikan kerapu tikus menunjukkan adanya peningkatan pada setiap ikan yang diberi perlakuan vaksinasi baik pasca

vaksinasi dan ujiantang. Nilai titer antibodi awal sebelum divaksin pada semua perlakuan menunjukkan nilai yang seragam yaitu sebesar 32. Titer antibodi ikan kerapu tikus yang diberi vaksin ribosom, pasca vaksinasi sebesar 128 dan setelah diuji tantang sebesar 512. Pada ikan yang divaksin dengan FKC, pasca vaksinasi sebesar 512 dan setelah uji tantang sebesar 1024. Sedangkan pada ikan yang divaksin dengan kombinasi FKC dan ribosom, pasca vaksinasi sebesar 512 dan setelah uji tantang sebesar 1024. Dan pada kontrol yang tidak divaksin juga menunjukkan peningkatan titer antibodi setelah uji tantang sebesar 128, akan tetapi tidak menunjukkan peningkatan titer antibodi pada pemeriksaan kedua.

5.1.3 Survival rate (SR)

Pengamatan *survival rate* (SR) benih ikan kerapu tikus dilakukan selama 7 hari setelah uji tantang dengan menginfeksi bakteri *Vibrio alginolyticus* sebanyak $3,6 \times 10^8$ CFU/ml secara intramuscular seperti tertera dalam Tabel 3.

Tabel 3. *Survival Rate* (SR) dan Nilai *Relatif Persentatif Rate* (RPS) Benih Ikan Kerapu Tikus Setelah Uji Tantang dengan Bakteri *Vibrio alginolyticus* $3,6 \times 10^8$ CFU/ml.

Perlakuan	SR (%) rata-rata \pm SD	RPS (%) rata-rata \pm SD
Kontrol	32 ^a \pm 16	-
Ribosom	72 ^b \pm 20.3961	60 ^a \pm 25.4951
FKC	60 ^{ab} \pm 14.9667	43.34 ^a \pm 16.1686
Ribosom dan FKC	76 ^b \pm 14.9667	65 ^a \pm 20

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).

Hasil pengamatan menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata antara kontrol dengan ribosom dan kombinasi ribosom dan *formalin killed cell* yang

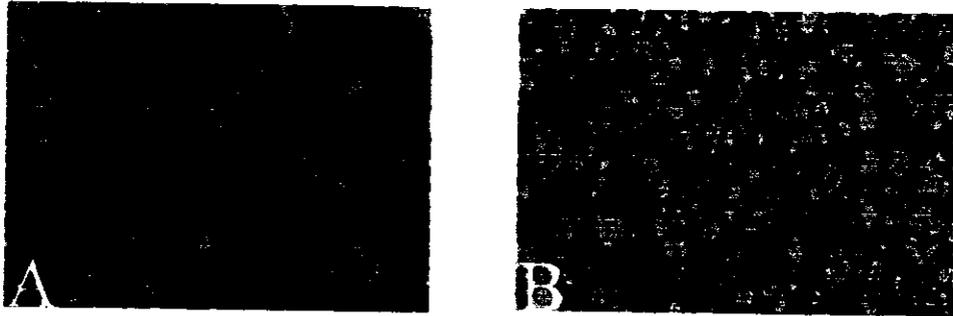
tidak berbeda nyata dengan *formalin killed cell*. Pada kontrol diperoleh nilai SR kerapu tikus rata-rata 32%. Sedangkan pada vaksinasi dengan ribosom sebesar 72%, dan FKC sebesar 60% serta kombinasinya sebesar 76%.

5.1.4 Relative percent survival (RPS)

Nilai RPS yang diperoleh dengan perlakuan vaksinasi dengan ribosom, FKC dan kombinasinya menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata (Tabel 3). Hasil perhitungan dengan formula RPS pada ribosom sebesar 60%, FKC sebesar 43.34% dan kombinasinya sebesar 65%. Berdasarkan nilai tersebut di atas, maka menurut aspek ekonomi, vaksin ribosom, dan kombinasi ribosom dan FKC dalam kisaran layak untuk dikomersilkan. Sedangkan vaksin FKC belum layak dikomersilkan sehingga perlu penyempurnaan.

5.1.5 Histopatologi sel hati

Gambaran histopatologi digunakan untuk mengetahui kerusakan akibat infeksi bakteri *Vibrio alginolyticus* secara mikroskopis pada ikan kerapu tikus. Organ yang dipakai sebagai bahan histopat adalah hati. Pemilihan organ tersebut sesuai dengan fungsinya yang kompleks sebagai organ sehingga sangat peka terhadap infeksi *Vibrio alginolyticus*. Organ yang diambil berasal dari ikan yang masih hidup pasca ujiantang.



Gambar 3. Histopatologi hati ikan kerapu tikus yang sehat (A) dan terkena vibriosis (B).



Gambar 4. Histopatologi hati ikan kerapu tikus yang divaksin ribosom (C) dan yang divaksin FKC (D)



Gambar 5. Histopatologi hati ikan kerapu tikus yang divaksin kombinasi ribosom dan FKC (E)

Tabel 4. Perubahan Histopatologis Hati Ikan Kerapu Tikus Setelah Diinfeksi *Vibrio alginolyticus*.

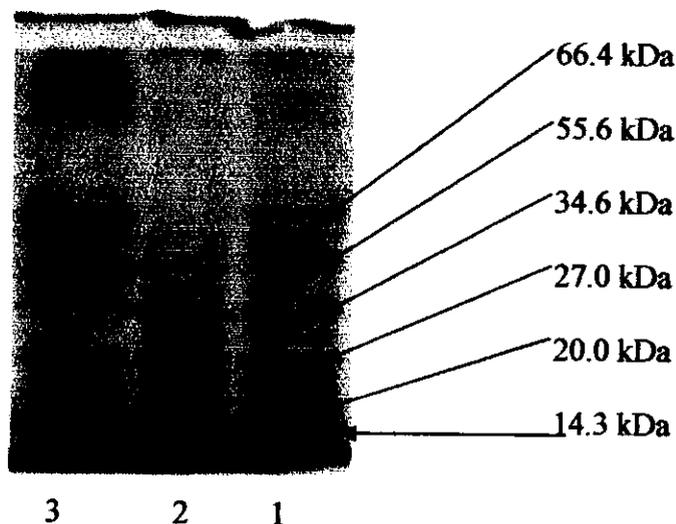
Perlakuan	Skor histopatologi hati ikan kerapu \pm SD
Kontrol negatif	$5^d \pm 5.1614$
Kontrol positif	$18.8^a \pm 2.9933$
Ribosom	$14.1^{bc} \pm 5.8856$
FKC	$15.9^b \pm 3.8678$
Kombinasi ribosom dan FKC	$13.2^c \pm 5.1147$

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).

Hasil pengamatan sediaan histopatologi dari organ hati pada setiap perlakuan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 100X. Pada ikan yang divaksin baik dengan ribosom, *formalin killed cell* dan kombinasinya serta kontrol positif dan negatif menunjukkan perbedaan yang nyata, kecuali ikan yang divaksin dengan ribosom menunjukkan adanya kerusakan yang tidak berbeda nyata dengan ikan yang divaksin dengan FKC.

5.1.6 Karakterisasi protein antigen

Karakterisasi antigen menggunakan SDS-PAGE dengan sistem diskontinyu (*Laemmli*, 1970). Metode ini merupakan standar pengujian terhadap berat molekul protein, struktur subunit, dan kemurnian protein. Selanjutnya hasil elektroforesis SDS-PAGE digunakan untuk mengetahui kisaran berat molekul yang ada didalam antigen.



Gambar 7. Hasil elektroforesis SDS-PAGE, lajur 1= marker, lajur 2= ribosom, dan lajur 3= FKC.

Berat molekul ribosom dan FKC diukur dengan menggunakan SDS-PAGE. Hasil elektroforesis ribosom adalah terbentuknya band-band dominan antara 14,3 kDa, sampai dengan 34,6 kDa. Sedangkan pada FKC terbentuk band-band dominan antara 14,3 kDa sampai dengan 66,4 kDa.

5.2 Pembahasan

Bakteri *Vibrio* sp. diketahui sebagai penyebab vibriosis pada ikan yang hidup di perairan payau dan laut. *Vibrio alginolyticus* merupakan salah satu species yang menyebabkan vibriosis yang banyak ditemukan pada ikan laut khususnya ikan kerapu. Patogenitas *Vibrio alginolyticus* telah dilaporkan oleh Murdjani (2002), Balebona *et al* (1998), dan Kamiso (1996) yang menyimpulkan bahwa *Vibrio alginolyticus* menyebabkan kematian massal ikan dalam waktu yang singkat.

Pengendalian vibriosis dengan memberikan vaksinasi sejak dini sebelum ikan ditebar di kolam atau tambak perlu dilakukan. Hal ini disebabkan penggunaan bahan kimia untuk mengendalikan populasi patogen dirasa belum efektif bahkan berdampak buruk bagi lingkungan. Vaksinasi akan memberikan proteksi pada ikan dari infeksi patogen. Vaksin FKC, ribosom dan kombinasinya dari *Vibrio alginolyticus* diharapkan mampu mencegah dan mengendalikan vibriosis pada ikan kerapu.

Metode vaksinasi yang dilakukan dalam penelitian ini dengan injeksi walaupun ikannya masih kecil. Menurut Ellis (1988) metode vaksinasi dengan injeksi digunakan pertama kali dalam melaporkan efektivitas vaksinasi untuk menanggulangi vibriosis. Vaksinasi dengan injeksi melalui intramuskular

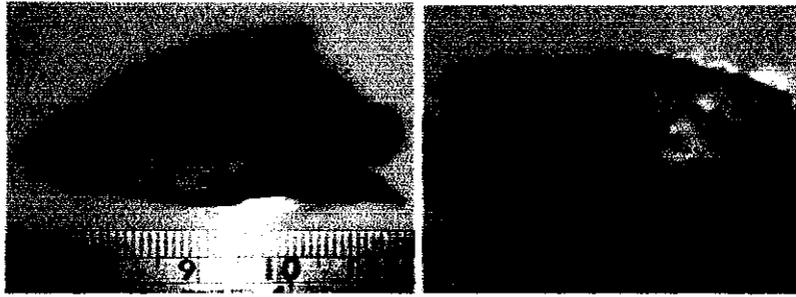
memberikan respon imun yang lebih cepat daripada melalui *intra peritoneal* (Murdjani, 2002), perendaman (Kitao *et al*, 1991) dan oral (Dalmo and Bogwald, 1996). Hal ini disebabkan antigen yang diberikan dapat dengan cepat tersebar ke seluruh tubuh melalui peredaran darah. Namun untuk aplikasi di lapangan dengan jumlah populasi yang besar dan ukuran ikan yang masih kecil maka cara injeksi sangat tidak efektif sehingga untuk penelitian selanjutnya perlu dilakukan vaksinasi dengan metode yang lain.

Penelitian pendahuluan yang menentukan nilai LD_{50} *Vibrio alginolyticus* yang menyerang ikan kerapu tikus dilakukan sebagai acuan untuk ujiantang. Penentuan LD_{50} ini secara tidak langsung juga untuk mengetahui tingkat patogenitas *Vibrio alginolyticus* pada benih ikan kerapu tikus. Hal ini disebabkan pada perlakuannya dilakukan penyuntikan bakteri tersebut dengan berbagai pengenceran sehingga diperoleh jumlah bakteri tertentu yang dapat menyebabkan mortalitas ikan kerapu tikus. Nilai LD_{50} yang diperoleh dikalikan minimal 100 untuk dosis ujiantang (Nindarwi, 2006). Pengalihan minimal 100 dimaksudkan untuk memastikan ikan yang tidak divaksin akan terjadi kematian massal dalam waktu yang singkat dan untuk mengetahui sejauh mana proteksi yang diberikan oleh vaksin.

Nilai LD_{50} *Vibrio alginolyticus* pada ikan kerapu tikus yang diperoleh sebanyak $3,6 \times 10^{5,31}$ CFU/ml. Nilai LD_{50} dari setiap species organisme akan berbeda, demikian juga dengan ikan yang terinfeksi. Pada umumnya ikan yang lebih muda akan lebih peka terhadap infeksi pathogen sehingga nilai LD_{50} yang diperoleh akan lebih besar (Istiqomah dkk, 2001). Pendapat ini juga didukung oleh nilai LD_{50} yang diperoleh dari ikan kerapu tikus ukuran 4-5 cm sebanyak 4,5

$\times 10^{6.5}$ CFU/ml (Murdjani,2002). Selanjutnya Istiqomah dkk (2001) menambahkan ikan kerapu tikus dengan ukuran 12-13 memiliki LD₅₀ terhadap *Vibrio fluvialis* sebesar $(1,1 \pm 0,5) \times 10^7$ CFU/ml. Namun pada umumnya, nilai LD₅₀ yang diperoleh dalam kisaran standar. Balebona *et al* (1998) menyatakan LD₅₀ *Vibrio alginolyticus* pada benih ikan laut berkisar antara 10^4 sampai dengan 10^6 CFU/ml.

Pengamatan benih ikan kerapu tikus yang dilakukan setelah benih ikan diinfeksi dengan *Vibrio alginolyticus* menunjukkan perubahan tingkah laku. Perubahan tingkah laku mulai terlihat pada 3 jam setelah diinfeksi dengan *Vibrio alginolyticus*, khususnya pada kontrol. Perubahan tingkah laku yang ditunjukkan antara lain: gerakan yang lamban, keseimbangan tubuh terganggu dengan ditandai gerakan berenang yang berputar-putar (*whirling*), nafsu makan yang menurun. Selain itu beberapa ikan menunjukkan perubahan warna yang semakin pudar atau pucat. Gejala vibriosis semakin nyata setelah 12 jam yang ditandai dengan adanya abses pada bekas injeksi, septicemia, haemoragik pada mulut dan insang, perut menggelembung karena berisi cairan, ekor dan sirip geripis serta adanya kematian. Hal senada juga dikemukakan oleh Yanuhuar (2003), Murdjani (2002), Kamiso (1996) dan Ellis (1988).



Gambar 8. Morfologi ikan kerapu tikus setelah diinfeksi *Vibrio alginolyticus*. Berturut-turut: kerusakan pada ekor dan septicemia

Titer antibodi awal ikan kerapu tikus sebelum diberi perlakuan sebesar 32. Titer antibodi yang terbentuk mungkin disebabkan karena ikan tersebut sudah pernah terserang bakteri sejenis yang mempunyai serotipe yang sama atau membawa antibodi dari induknya. Menurut Ellis (1998) sistem pertahanan humoral ikan dapat diturunkan dari induk ke anaknya. Hal ini disebabkan oleh ditemukannya *C-reactive* protein, lysozime dan lektin pada ova beberapa species ikan. Setelah telur menetas, immunoglobulin akan terus menurun hingga pada tingkat terendah yaitu pada saat larva mulai melakukan aktifitas makan (Olsen and Press, 1997). Takemura and Takano (1997) juga menambahkan bahwa sistem imun ikan mulai maturasi selama stadia post larva. Dari pernyataan di atas dapat ditarik kesimpulan bahwa timbulnya titer antibodi yang besar tersebut lebih mengarah pada infeksi bakteri yang mempunyai serotipe yang sama.

Efek *booster* telah terjadi pada vaksinasi pertama. Hal ini seperti dugaan sebelumnya, bahwa nilai titer antibodi sebesar 32 lebih cenderung disebabkan infeksi bakteri sejenis yang memiliki serotipe yang sama. Kemudian pada vaksinasi kedua, efek *booster* juga terjadi kembali. Tizard (1982) mengatakan bahwa efek *booster* terjadi setelah terpaparnya antigen untuk yang kedua kalinya

dan seterusnya. *Booster* mampu memperbaiki kualitas vaksin yang ditandai dengan naiknya titer antibodi (Collado *et al*, 2000). Selanjutnya Hernayanti dkk (2000) mengatakan *booster* mampu menaikkan jumlah neutrofil dan menaikkan SR ikan Lele dumbo dari infeksi *A. hydrophilla*.

Pengamatan SR ikan kerapu tikus setelah uji tantang dengan *Vibrio alginolyticus* menunjukkan ada perbedaan yang nyata antara kontrol dan perlakuan vaksinasi dengan ribosom dan kombinasi ribosom dan *formalin killed cell* yang tidak berbeda nyata dengan *formalin killed cell*. Nilai SR ikan kerapu tikus yang divaksin menunjukkan nilai yang tinggi yang rata-rata di atas 60%, ini menggambarkan bahwa efek proteksi vaksin terhadap infeksi patogen sangat besar. Walaupun nilai sintasan dipengaruhi banyak faktor, namun pada setiap perlakuan faktor tersebut menjadi variabel terkendali sehingga hanya pengaruh vaksin yang bekerja menurut kemampuannya.

FKC merupakan vaksin tradisional yang diyakini memberikan proteksi yang sangat tinggi ketika diberikan melalui injeksi daripada melalui oral maupun perendaman (Woo and Bruno, 1999). Hal ini sangat berdasar karena FKC berisi antigen yang utuh dari bakteri tersebut sehingga imunogenitasnya sangat tinggi. Austin and Austin (1987) mengemukakan beberapa vaksin yang berasal dari sel bakteri utuh yang diproduksi secara komersial adalah vaksin furunkulosis dari bakteri *Aeromonas salmonicida*, vaksin *Enteric Red Mouth* dari *Yersenia ruckeri* dan vaksin vibriosis dari bakteri *Vibrio sp*.

Ribosom merupakan mikromolekul juga mempunyai potensi sebagai imunogen. Ribosom yang tersusun atas RNA mampu merespon sistem imun

nonspesifik (Gonggrijp *et al*, 1981^a; Gonggrijp *et al* 1981^b), ribosom protein dan membrane ribosom yang tersusun dari glucose dan rhamnose yang merupakan gula spesifik pada lipopolisakarida mampu merespon sistem imun spesifik (Lieberman, 1977). Gula glucose dan rhamnose yang merupakan gula spesifik pada LPS sangat efektif merespon imunitas humoral dan selular walaupun tidak dilakukan *booster* (Iglis *et al*, 2001). Proteksi ribosom yang besar telah dibuktikan dalam beberapa penelitian dengan species yang berbeda (Field *et al*, 1979; Lieberman *et al*, 1979; Kusuda *et al*, 1988; Ninomiya *et al*, 1993).

Menurut Tizard (1982) menyatakan bahwa FKC dalam menimbulkan kekebalan umumnya relative pendek sehingga perlu diperbaiki dengan penambahan antigen yang imunogen dari bakteri tersebut. Selain itu FKC dalam kondisi normal mampu menimbulkan respon imun kurang lebih 6 hari setelah vaksinasi, sedangkan ribosom mampu menimbulkan respon imun 2 hari setelah vaksinasi sehingga kedua macam vaksin perlu dikombinasikan (Gonggrijp *et al*, 1981^b). Hal ini dimaksudkan untuk meningkatkan proporsi ribosom dalam vaksin FKC. Kombinasi vaksin ribosom dan FKC yang diuji cobakan ke ikan kerapu tikus menunjukkan nilai SR yang paling tinggi walaupun secara statistika hasilnya sama dengan ribosom yang tidak berbeda nyata dengan FKC.

Hasil vaksinasi yang dilakukan baik dalam skala laboratorium, uji lapangan, maupun aplikasi komersial dievaluasi berdasarkan formula *Relatif percent survival* (RPS). Nilai RPS menggambarkan persentase ikan yang mati setelah divaksin dan ikan yang mati tanpa divaksin setelah diberi perlakuan infeksi bakteri *Vibrio alginolyticus* (Varvarigos, 2003). Proporsi ini menunjukkan ikan yang terlindungi oleh vaksinasi. Penerimaan secara ekonomi, nilai RPS

harus di atas 70%. Artinya, jika ada penyakit yang mewabah, ikan yang divaksin dalam posisi selamat minimal 70% dari populasi daripada ikan yang tidak divaksin.

Nilai RPS dari vaksinasi dengan ribosom, FKC dan kombinasinya menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata yaitu kurang dari 70 % sehingga belum layak dikomersilkan. Artinya vaksin ini masih perlu dikembangkan lagi dan bukan berarti tidak dapat dikomersilkan. Harapan untuk mengkomersilkan vaksin ini masih tetap ada, yaitu dengan melihat nilai standar deviasi yang masih dalam kisaran layak dikomersilkan.

Pengamatan kerusakan hati akibat infeksi bakteri *Vibrio alginolyticus* dilakukan setelah ujiantang. Pemilihan hati sebagai objek pengamatan histopatologi disebabkan karena hati memiliki peran yang sangat kompleks jika dilihat sebagai organ secara keseluruhan. Menurut Horison (1981) hati berfungsi mengatur keseimbangan elektrolit dalam tubuh, menghancurkan dan mensekresi substansi asing, peka terhadap kerusakan oleh agen asing dan detoksikasi racun. Peran hati yang besar dalam metabolisme di dalam tubuh menyebabkan peradangan dan nekrosis pada sel-selnya.

Pengamatan histopatologi pada hati ikan kerapu tikus baik yang divaksin maupun yang tidak divaksin menunjukkan adanya perbedaan nyata antara kontrol dan perlakuan. Menurut Robert (1989) infeksi bakteri patogen mengakibatkan kerusakan pada hati mulai dari kerusakan ringan yaitu infiltrasi sampai kerusakan yang berat yaitu nekrosis karyolisis. Pada hati ikan yang sehat sebagai kontrol negatif menunjukkan sel-sel hati yang normal dan kerusakan sel hanya ditemukan pada bagian tertentu dengan tingkat kerusakan yang rata-rata ringan. Kondisi ini

sangat berlawanan dengan ikan yang hanya diinfeksi *Vibrio alginolyticus* tanpa diberi perlakuan vaksinasi. Kerusakan sel hati sangat parah yaitu didominasi degenerasi sel dan nekrosis yang terjadi hampir di setiap bagian. Gambaran kerusakan sel hati di atas menunjukkan bahwa kerusakan sel hati didominasi oleh infeksi *Vibrio alginolyticus*. Sedangkan pada ikan yang diberi vaksinasi menunjukkan adanya efek proteksi dari vaksin yang diberikan.

Pengaruh perlakuan dengan vaksinasi ribosom, FKC atau kombinasinya pada histopatologi sel hati menunjukkan adanya perbedaan. Ikan yang divaksin dengan FKC memberikan proteksi terhadap infeksi *Vibrio alginolyticus* yang paling rendah daripada ikan yang divaksin dengan ribosom atau dengan kombinasinya. Kemungkinan efek proteksi yang digambarkan dengan perubahan histopatologi sesuai atau sebanding dengan proteksi yang diberikan pada pengamatan sintasan. Sedangkan ikan yang divaksin dengan ribosom menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata dengan ikan yang divaksin dengan kombinasi ribosom dan FKC. Proteksi yang diberikan pada ketiga macam vaksin ini masih rendah, seperti yang terlihat pada nilai skor yang sangat tinggi yang menunjukkan tingkat kerusakan yang sangat parah. Hal ini kemungkinan toksin yang dihasilkan bakteri menimbulkan kerusakan yang lebih cepat daripada kerja antibodi.

Pengukuran konsentrasi protein yang terkandung dalam vaksin dilakukan sebelum dilakukan SDS-PAGE. Pengukuran ini bertujuan untuk melakukan estimasi dalam menentukan pengenceran dengan *resolving sample buffer* (RSB) sebelum proses *running* dalam rangkaian kerja elektroforesis. Hal ini dikarenakan, apabila pengenceran terlalu pekat maka hasil elektroforesis band yang terbentuk terlalu tebal dan sebaliknya bila terlalu encer maka band yang terbentuk terlalu

tipis sehingga sulit dibaca. Hasil perhitungan konsentrasi protein dengan menggunakan rumus yang dikemukakan Deutcher (1995). Konsentrasi protein dalam vaksin ribosom sebesar 0,27276 mg/ml dan FKC sebesar 2,62472 mg/ml. Dari hasil tersebut dapat diestimasi perbandingan RSB dan ribosom sebesar 1:4 dan RSB dengan FKC sebesar 1:2.

Karakterisasi protein antigen yang digunakan sebagai vaksin dilakukan dengan elektroforesis SDS-PAGE dengan sistem diskontinyu (Laemmli, 1970). Hasil dari elektroforesis terhadap ribosom dan FKC menunjukkan kisaran di atas 10 kDa sehingga kedua macam antigen tersebut bersifat imunogen. Menurut Woo (1990) antigen yang memiliki berat molekul protein di atas 10 kDa bersifat imunogen. Berat molekul protein *whole cell Vibrio alginolyticus* dari strain yang berbeda telah diukur Nindarwi (2006) dan Mahtuch *dkk* (2001), hasil pengukuran tersebut tidak berbeda dengan yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu kisaran berat molekul protein yang dominan antara 14,3 kDa sampai dengan 66,4 kDa. Sedangkan ribosom yang merupakan fraksi subselular yang imunogen juga memiliki berat molekul protein tinggi seperti yang dilaporkan dilaporkan Houchens and Wright (1973).

Kualitas air selama pemeliharaan ikan kerapu tikus dalam penelitian ini diusahakan dalam kondisi yang optimal. Kualitas air selama pemeliharaan menunjukkan suhu 28-30°C, pH 7.5-8.3, salinitas 30-32 ‰, dan oksigen terlarut sebesar 6.3-7.8 ppm. Kualitas air yang merupakan variabel terkendali sangat memainkan peran penting dalam proses metabolisme di dalam tubuhnya sehingga harus diusahakan dalam kisaran optimal. Penyakit yang mewabah sering dikaitkan dengan kualitas air yang buruk. Vibriosis yang menyerang ikan laut baik ikan liar

maupun yang dibudidayakan sering mewabah ketikan salinitas dan bahan organik tinggi (Iglis *et al*, 2001). Selanjutnya Ellis (1998) menambahkan vibriosis sering dihubungkan dengan kondisi stress karena suhu yang terlalu tinggi, fluktuasi yang sangat tinggi dari salinitas dan suhu, termasuk oksigen terlarut yang rendah.

Kamiso (1996) menyatakan ikan bersifat *poilokilotermik* yaitu suhu tubuhnya berubah menurut suhu lingkungan, sehingga suhu punya peranan yang sangat penting pada metabolisme ikan termasuk lama periode induksi imunitas ikan. Umumnya, pada suhu yang lebih rendah waktu yang dibutuhkan untuk perkembangan imun ikan menjadi lebih lama (Ellis, 1988). Pylkko *et al* (2000) juga menerangkan bahwa temperatur memainkan peran yang penting dalam sistem pertahanan ikan. Cheng *and* Chen (2000) menambahkan bahwa aktifitas phenol oxidase pada udang air tawar mencapai puncaknya ketika semua parameter kualitas air dalam kondisi optimal. Pada pemeliharaan ikan kerapu tikus selama penelitian suhu dalam kisaran optimal sehingga dimungkinkan perkembangan dalam pembentukan imunitas ikan berjalan dengan optimal.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Sintasan benih ikan kerapu tikus yang divaksin: ribosom sebesar 72%, FKC sebesar 60% dan kombinasi ribosom dan FKC sebesar 76%, sedangkan kontrol yang tidak divaksin sebesar 32%.
2. Nilai RPS benih ikan kerapu tikus yang divaksin: ribosom sebesar 60%, FKC sebesar 43,34% dan kombinasi ribosom dan FKC sebesar 65%.
3. Titer antibodi benih ikan kerapu tikus yang divaksin: ribosom sebesar 128, FKC sebesar 512 dan kombinasi ribosom dan FKC sebesar 512, sedangkan kontrol yang tidak divaksin sebesar 32.

6.2 Saran

Penelitian ini perlu dilanjutkan untuk memperoleh informasi dosis vaksin yang tepat terutama vaksin kombinasi. Selain itu, aplikasi vaksinasi secara massa! melalui oral perlu diujicobakan pada ikan kerapu tikus ataupun pada komoditas ikan lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Antoro. 1999. Biologi Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*). Departemen Pertanian. Direktorat Jendral Perikanan. Balai Budidaya Laut. Lampung
- Austin, B. dan D. A. Austin. 1987. Bacterial Fish Pathogen: Diseases of Farmed and Wild Fish. Praxis Publishing. Chicester. P 107-238.
- Azwar, S. 2004. Metode Peneliti. Pustaka Pelajar. Yogyakarta. 145 hal.
- Balebona, M.C, M.J. Andreu, M.A.Bordas, I. Zorrilla, M.A. Marinigo, and J.J. Borrego. 1998. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for Cultured Gilt Head Sea Bream (*Sparatus aurata* L.) Applied and Enviromental Microbiology, Vol. 64, No. 11, p. 4269-4275.
- Bellanti, J. A, 1993. *Imunologi Voleme 111*. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- Buchanan, R.E and N.E Gibbons. 1979. Bergeys's Manual of Deserminative Bacteriology. 8th Edition. Williams and Wlkins. Baltimone.
- Chanratchakool, P, J.F Turbull, S. Funge-Smith and C. Lisuwun. 1995. Health Management in Shrimp Pond. 2nd edition. Aquatic Animal Health Research Institute. Thailand. P 85-87.
- Cheng,W. and J.C. Chen. 2000. Effect of pH, temperature and salinity on immune parameters of freshwater prawn *Macrobrachium rosenberi*. Fish and Shellfish immunology. 10, 387-391.
- Collado, R, B. Fouz, E. Sanjutan, C. Amaro. 2000. Effectiveness of Different Vaccine Formulations Against *Vibriosis Vulnificus* serovar E (Biotype 2) in European Ell *Anguilla anguilla*. Diseases of Aguatic Organisms. Vol 43: 91-101.
- Dalmo, R.A. and J. Bogward. 1996. Distribution of intravena and perorally administerad *A. salmonisida* LPS in Antlantic salmon, *Salmo solar* L. Fish and Shellfish immunology. 6. 427-441.
- Departemen Kelautan dan Perikanan. 2005. Mengenal Pasar Ikan Kerapu Tikus di Hongkong. www.departemenkelautandanperikanan.org.co.id
- _____. 2006. Analisa Pasar Perikanan Luar Negeri Periode Januari 2006. www.departemenkelautandanperikanan.org.co.id
- Ellis, A. E. 1988. Optimizing Factor For Fish Vacctination. Fish Vacctination. Ellis, A.E (ed) Academic Press. London. P 32-46.

- _____. 1998. Immunity to Bacteria in Fish. *Fish and Shellfish Immunology* 9, p 291-308.
- Effendie, M.I. 1997. *Biologi Perikanan*. Yayasan Pustaka Indonesia. Jakarta.
- Field, L. H., C. D. Parker, C.R.Manclark, and L.J. Berry. 1979. Evaluation of Ribosomal Vaccine Against Pertussis. *Infection and immunity*, May, p. 346-351.
- Gonggrijp, R., W.J.H.A. Muller, and C.P.A.Van Boven. 1981. Serotype-nonspecific Protection Induced by Ribonucleic Acid Isolated from Ribosomal Vaccine of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*. Vol 33, No. 1, p 178-185.
- Gonggrijp, R., M.P.W. Volleberg, P.J.M.R. Lemmens, and C.P.A.Van Boven. 1981. Evidence for the Presence of lipopolysaccharide in Ribonuclease-Sensitive Ribosomal vaccine of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*. Vol. 31, No. 2, p 896-905.
- Hariato. 2005. Kajian Kelayakan Usaha Ekspor Ikan Kerapu dengan Penerapan Alat Angkut Darat dan Teknik Kemasan Pengiriman Udara. *Jurnal Saint dan teknologi BPPT*. www.ipteknet.com
- Hernayanti, A., A. Irianto dan E. Herlina. 2000. Respon Imun Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) terhadap Vaksin *Whole Cell Aeromonas hydrophyla* yang Diberikan Secara Renasaman Dengan Dosis yang Berbeda. *Biologi Lingkungan*. Fakultas Biologi. Universitas Jendral Soedirman. Purwokerto. 7 hal.
- Horrison, S., 1981. *Principle of Internal Medicine*. Terjemahan Adji Darma. Edisi 9. EGC. Jakarta. P: 4-17 dan 53.
- Houchens, D.P., and G.L.Wright Jr. 1973. Immunity to *Salmonella typhimurium* Infection: Characterization of Antigens in Active Protection by Polycrylamide Gel Electroforesis. *Infection and Immunity*. Vol 7, No. 3: p. 507-511.
- Iglis, V, R.J. Roberts, N.R. Bromage. 2001. *Bacterial Diseases of Fish*. Blackwell Science Ltd.
- Istiqomah, I., Triyanto, A. Isnansyoto, Kamiso, H. N dan Murdjani. 2001. Pathogenitas *Vibrio fluvialis* yang Diisolasi dari Kerap Tikus (*Cromileptes altivelis*). *Jurnal Perikanan Indonesia*.
- Jan. 2005. China Minati Ikan Kerapu Hidup. *Kompas*, 19 November 2005.

- Kataba, Z. 1995. *Parates and Diseases of Fish Cultured in The tropics*. Taylor and Francis. London and Philadelphia. 93-94 p.
- Kamiso, H. N. 1996. *Vibriosis Pada Ikan dan Alternatif Cara Penanggulangannya*. Jurnal Perikanan UGM I (1) : 78-86 hal
- _____. 2004. *Status Penyakit Ikan dan Pengendaliannya di Indonesia*. Laboratorium Penyakit Ikan. Jurusan Perikanan. Fakultas Perikanan. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. Makalah Seminar Nasional Penyakit Ikan dan Udang IV, Purwokerto.
- Kitao, T, T. Eshima, T. Yoshida. 1991. *Analysis of Protective Mechanisms in Cultured Ayu, *Plecoglossus altivelis* Temminck and Schlegel, Administered *Vibrio* vaccine by the Immersion Method*. Journal of fish diseases. Volume 14 Issue 3 Page 375.
- Kusriningrum, R. 1989. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Kusuda, R., Ninomiya, M., Hamaguchi, M. And Maraoka, M. 1988. *Efficacy of Ribosomal Vaccine Prepared from *Pasteurella piscicida* against Pseudotuberculosis in Cultured Yellow tail*. Fish pathology, 23, 191-196.
- Laemmli, U.K. 1970. *Cleavage of Struktural Protein During Assembly of The Head of Bacteriophage T4*. *Nature*, 227: 680-685.
- Lieberman, M. M. 1977. *Direct Evidence for the Presence of Lipopolysaccharide Component in a *Pseudomonas* Ribosomal Vaccine*. *Infection and Immunity*, August, p. 471-473.
- Lieberman, M. M., D. C. McKissock, and G. L. Wright. 1979. *Passive Immunization Against *Pseudomonas* with *V. alginolyticus* Ribosomal Vaccine-Induced Immune Serum and Immunoglobulin Fractions*. *Infection and immunity*, February, p. 509-521.
- Madeali, I.M, A. Tompo, dan M. Atmomarsono. 2004. *Pengaruh Pemberian Vaksin *Vibrio* dan Vitamin C Terhadap Sintasan Pasca Larva Udang Windu (*Penaeus monodon* Fabricus) yang Dipapar dengan Bakteri *Vibrio harveyi**. Balai Riset Perikanan Air Payau. Maros.
- Maftuch. 2005. *Imunodeteksi Antigen Pada Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) yang Terinfeksi *Vibrio alginolyticus**. Makalah Seminar dalam Rangka Dies Natalis Universitas Brawijaya Bekerjasama dengan Pemerintah kabupaten Situbondo. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang. 10 hal.

- Murdjani, M. 2002. Identifikasi dan Pathologi Bakteri *Vibrio alginolyticus* Pada Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*). Disertasi. Program Pasca Sarjana. Universitas Brawijaya.
- Nindarwi, D.D. 2006. Studi Perbandingan Penggunaan *Whole Cell* dan *Extracellular Product* dari *Vibrio alginolyticus* Sebagai Vaksin Secara Oral Terhadap Sintasan Benih Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscogutatus*). Skripsi. Program Studi Budidaya Perairan. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Ninomiya, M., Muraoka, A., Kawai, K., and Kusuda, R. 1992. Duration of Resistance of Yellowtail Agzaint Pseudotuberculosis Induced by *Pasteurella piscicida* Ribosom and Formalin-Killed Vaccines. Short communication. Fish and Shellfish Immunology. 3, 313-314
- Nontji, A. 1987. Laut Nusantara. Penerbit Djembatan. Jakarta
- Pylkko, P., T. Lyytikainen, O. Ritola and S. Pelkonen. 2000. Vaccination influences growth of Arctic charr. Diseases of aquatic organisms. 43,77-80.
- Olsen, Y.A. and McL. Press. 1997. Degradation kinetics of Ig in the egg, alevin and fry of Atlantic Salmon, *Salmon solar* L and localization of Ig in the egg. Fish and Shellfish immunology. 7, 81-91.
- Quinn *et al.* 2002. Veteriner Microbiology and Microbial Disease. Black Well. London p.8-11.
- Rantam, F. A. 2003. Metode Imunologi. Airlangga University Press. Surabaya. 174 hal.
- Reed, P. A. and R. F. Floyd. 1996. *Vibrio* Infections of Fish. Cooperative Extension Service. <http://Vibrio%20Infection%20of%20Fish.htm>.
- Roberts, R. J. 1989. Fish Pathology. 2th edition. Black Well Sinergy. London. p 135-151.
- Roza, D., Zafran dan I. Taufik. 1996. Uji Pathogenitas Bakteri *Vibrio* yang Dominan di Panti Pembenuhan Skala Rumah Tangga Terhadap Larva Bandeng (*Chanos chanos forskal*). Jurnal Perikanan Indonesia Vol. II No. 3. 33-37.
- Schlegel, H.G. 1993. General Microbiology. 7th Edition. Canbriedge University Press. Canbriedge.
- Shapiro, D.Y. 1987. Reproduction in Grouper in JJ Polovina, S. Ralston (Editors), Tropical Snapper and Grouper: Biology and Fisheries management. Westview Press, inc., Boudier and London.

- Subiyanto. 2005. Analisis Penerapan Paket Tehnologi budidaya Pembesaran Ikan Kerapu. Jurnal Saint dan Tehnologi BPPT. www.ipteknet.com
- Sugama, K., Artaty Wijono. 1995. Tehnologi Pembenihan Dan Pengadaan Ikan Laut. Prosiding Temu Usaha Pemasarakatan Tehnologi Keramba Jaring Apung Bagi Budidaya Laut. Jakarta
- Sunyoto, P. 1994. Pembesaran Kerapu Dengan Keramba Jaring Apung. Penebar Swadaya. Jakarta. 64 hal.
- Suprpto, H., T. Hara, T. Nakai and K Muroga. 1996. Purification of a Lethel Toxin of *Edwardsiella tarda*. Fish Pathology 31: 203-207.
- Supriadi, H. 1990. Pencegahan Penyakit Bakteri Pada Usaha Perikanan. Bahan kuliah pada pelatihan karantina ikan 21 Mei -4 Agustus 1990. Ciawi. Bogor. 11 hal.
- Takemura, A. and K. Takano. 1997. Transfer of maternally derived immunoglobulin (IgM) to Larva in Tilapia, *O. mossambicus*. Fish and Shellfish immunology. 7, 355-363.
- Tampubolon, G.H dan E. Mulyadi. 1989. Sinopsis Ikan Kerapu di Perairan Indonesia. Balitbankan. Semarang.
- Verma, P. S., and V. K. Agarwal. 2005. Cell Biology, Genetics, Molecular Biology, Evolution And Ecology. S. Chand And Company LTD. New Delhi. P 280-292.
- Varvarigos, P.2003. Practical Consideration of Vaccination Strategies. www.vetcare.gr/fish_vaccination_strategies.htm
- Wijayanti, A. dan Hamid, N. 1997. Identifikasi Bakteri pada Pembenihan Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*). Ditjen. Perikanan, Deptan. 9 hal.
- Weir, D.M, 1990. *Segi Praktis Immunologi*. PT, Binarupa Aksara. Jakarta. Halaman 1-8
- Woo, P.T.K, and D. W. Bruno. 1999. Fish Diseases and Disorders. Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections. CABI Publishing USA. Polyvalent
- Yoshimitsu, T., H.Eda and K. Hiramatsu. 1986. Grouper Final Report Marine culture Reserch and Development in Indonesia. ATA 192. JICA P 103-129
- Yuasa, K., Roza, D., Koesharyani, I, Johny, F., and Mahardika, K. 2001. Impotence of Fish Patology on Mariculture. In Indonesia and The Role of Fish Patologist in Sustainable Aquaculture. Prossiding laut dan Pengembangan Sea Farming di Indonesia. DKP Bekerjasama dengan JICA.

Zafran, D. Roza, I. Koesharyani, F. Johnny. 1998. Panduan Untuk Diagnosis Penyakit Ikan dan Krustacea Laut di Indonesia. JICA dan Loka Penelitian Perikanan Pantai Gondol

Zonneveld, N., E. A. Huismana dan J.H. Boon. 1991. Prinsip-Prinsip Budidaya Ikan. PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta. 318 hal

LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil pengamatan dan perhitungan LD₅₀ *Vibrio alginolyticus* pada ikan kerapu tikus.

Pada pengenceran 10⁻⁷ terbentuk 36 koloni → 3,6 X 10² CFU/ml.

Kemudian pada pengenceran 10⁻⁵, 10⁻⁴, 10⁻³ dan 10⁻² disuntikan ke masing-masing ikan dan mortalitas diamati selama 5 hari.

Hasil pengamatan mortalitas ikan setelah diinfeksi dengan berbagai pengenceran *Vibrio alginolyticus*.

Pengenceran	Jumlah bakteri	Mortalitas		Jumlah		Ratio	Persentase
		+	-	+	-		
10 ⁻⁵	3,6 X 10 ⁴	2	6	2	14	2/16	12.5
10 ⁻⁴	3,6 X 10 ⁵	3	5	5	8	5/13	38.46
10 ⁻³	3,6 X 10 ⁶	5	3	10	3	10/13	76.92
10 ⁻²	3,6 X 10 ⁷	8	0	18	0	18/18	100

$$\begin{aligned}
 PD &= \frac{\%mortalitas > 50\% - 50\%}{\%mortalitas > 50\% - \%mortalitas < 50\%} \\
 &= \frac{76.92 - 50}{76.92 - 38.46} \\
 &= 0.69
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 LD_{50} &= 3,6 \times 10^{6-0,69} \\
 &= 3,6 \times 10^{5,31}
 \end{aligned}$$

Jadi nilai LD₅₀ *Vibrio alginolyticus* pada ikan kerapu sebesar 3,6 X 10^{5,31} CFU/ml

Lampiran 2. *Survival Rate (SR)* Ikan Kerapu Tikus Setelah Diinfeksi *Vibrio alginolyticus*

Ulangan	Perlakuan				Jumlah
	Control	Ribosom	FKC	Ribosom dan FKC	
I	20%	40%	40%	60%	140%
II	60%	80%	80%	80%	240%
III	20%	80%	60%	60%	200%
IV	20%	60%	40%	80%	180%
V	40%	100%	80%	100%	280%
Jumlah	160%	360%	300%	380%	1040%
Rata-rata	32%	72%	60%	76%	-
SD	16	20.3916	14.9667	14.9667	-

Setelah ditransformasi $\sqrt{\sin}$

Ulangan	Perlakuan				Jumlah
	Control	Ribosom	FKC	Ribosom dan FKC	
I	26.56	39.23	39.23	50.77	155.79
II	50.77	63.44	63.44	63.44	241.09
III	26.56	63.44	50.77	50.77	191.54
IV	25.56	50.77	39.23	63.44	180
V	39.23	90.00	63.44	90.00	282.67
Jumlah	169.68	306.88	256.11	318.42	1051.09
Rata-rata	33.936	61.376	51.222	63.684	-
SD	± 9.7429	± 16.9162	± 10.8294	± 14.3262	-

$$FK = \frac{1051.09^2}{4 \times 5} = 55239.5094$$

$$JKT = 26.56^2 + 50.77^2 + \dots + 90.00^2 - FK = 6268.5291$$

$$JKP = \frac{169.68^2 + 306.88^2 + 256.11^2 + 318.42^2}{5} = 2750.5437$$

$$JKS = 6268.5291 - 2750.5437 = 3517.9854$$

$$KTP = \frac{2750.5437}{3} = 916.8479$$

$$KTS = \frac{3517.9854}{16} = 219.8741$$

$$F_{hitung} = \frac{916.8479}{219.8741} = 4.1699$$

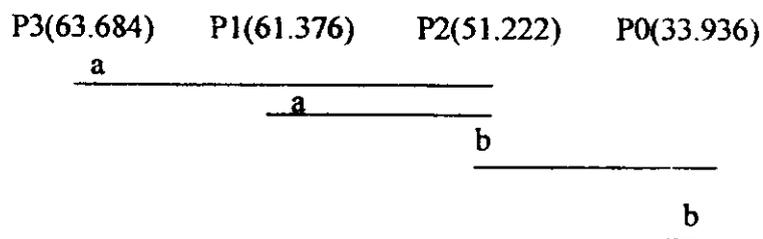
Sidik ragam

Ragam	db	JK	KT	F _{hitung}	F _{tabel}	
					0.05	0.01
Perlakuan	3	2750.5437	916.8479	4.1699*	3.24	5.29
Sisa	16	3517.9854	219.8741			
Total	19	6268.5291				

Kemudian dilanjutkan dengan uji jarak Duncan

Ragam	X	Beda			P	SSR	LSR
		X-P0	X-P2	X-P1			
P3	63.684 ^a	29.748 ^a	12.462	2.308	4	3.24	21.4857
P1	61.376 ^a	27.440 ^a	10.154	-	3	3.14	20.8226
P2	51.222 ^{ab}	17.286	-	-	2	3.00	19.0942
P0	33.936 ^b	-	-	-	-	-	-

$$s.e = \sqrt{\frac{219.8741}{5}} = 6.6314$$



Lampiran 3. Skoring Histopatologi Sel Hati Kerapu Tikus

Data Skor Perubahan Histopatologis Hati Kerapu Tikus pada Kontrol Negatif.

Ulangan	Lapang pandang	Perubahan histopatologi					Total skor
		A	B	C	D	E	
I	1	-	-	+	-	-	
	2	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	
	4	-	-	-	-	-	
Jumlah skor		0	0	3	0	0	3
II	1	-	-	-	+	-	
	2	-	-	-	+	+	
	3	-	-	-	-	-	
	4	+	-	-	-	-	
Jumlah skor		1	0	0	8	5	14
III	1	-	-	-	-	-	
	2	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	+	+	
	4	-	-	-	-	-	
Jumlah skor		0	0	0	4	5	9
IV	1	-	-	-	-	-	
	2	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	
	4	-	-	-	-	-	
Jumlah skor		0	0	0	0	0	0
V	1	-	-	-	-	-	
	2	+	-	-	+	-	
	3	+	-	-	-	-	
	4	+	-	-	+	-	
Jumlah skor		3	0	0	8	0	11

Data Skor Perubahan Histopatologis Hati Ikan Kerapu Tikus pada Kontrol Positif.

Ulangan	Lapang pandang	Perubahan histopatologi					Total skor
		A	B	C	D	E	
I	1	-	-	-	+	+	
	2	-	-	-	+	+	
	3	-	-	-	+	+	
	4	-	-	-	+	+	
Jumlah skor		0	0	0	16	20	36
II	1	-	-	-	+	+	
	2	-	-	-	+	+	
	3	-	-	-	-	+	
	4	-	-	-	+	+	
Jumlah skor		0	0	0	12	20	32
III	1	-	-	-	+	+	
	2	-	-	-	+	+	
	3	-	-	-	-	+	
	4	-	-	-	-	+	
Jumlah skor		0	0	0	8	20	28
IV	1	-	-	-	-	+	
	2	-	-	-	+	+	
	3	-	-	-	+	+	
	4	-	-	-	+	+	
Jumlah skor		0	0	0	12	20	32
V	1	-	-	-	+	+	
	2	-	-	-	+	+	
	3	-	-	-	+	+	
	4	-	-	-	+	+	
Jumlah skor		0	0	0	16	20	36

Data Skor Perubahan Histopatologis Hati Ikan Kerapu Tikus yang Divaksin Ribosom *Vibrio alginolyticus*.

Ulangan	Lapang pandang	Perubahan histopatologi					Total skor
		A	B	C	D	E	
I	1	-	-	-	+	+	
	2	-	-	-	+	+	
	3	-	+	-	-	-	
	4	-	-	-	+	+	
Jumlah skor		0	2	0	12	15	29
II	1	+	-	-	+	+	
	2	-	-	+	+	+	
	3	-	-	-	+	+	
	4	-	-	-	-	-	
Jumlah skor		1	0	3	12	15	31
III	1	-	-	-	-	-	
	2	-	-	-	+	+	
	3	-	-	-	+	+	
	4	-	-	-	-	-	
Jumlah skor		0	0	0	8	10	18
IV	1	-	-	-	-	+	
	2	+	-	-	+	+	
	3	-	-	-	+	+	
	4	-	-	-	+	-	
Jumlah skor		1	0	0	12	15	28
V	1	-	-	-	+	+	
	2	-	-	-	+	+	
	3	-	-	-	+	+	
	4	-	-	-	+	+	
Jumlah skor		0	0	0	16	20	36

Data Skor Perubahan Histopatologis Hati Ikan Kerapu Tikus yang Divaksin FKC *Vibrio alginolyticus*.

Ulangan	Lapang pandang	Perubahan histopatologi					Total skor
		A	B	C	D	E	
I	1	-	-	-	+	+	
	2	-	-	+	+	+	
	3	-	-	-	-	+	
	4	-	-	-	-	-	
Jumlah skor		0	0	3	8	15	26
II	1	-	-	-	+	+	
	2	-	-	-	+	+	
	3	-	-	-	+	+	
	4	-	-	-	+	+	
Jumlah skor		0	0	0	16	20	36
III	1	-	-	+	+	+	
	2	-	-	+	-	+	
	3	-	-	-	+	+	
	4	-	-	-	+	+	
Jumlah skor		0	0	6	12	20	28
IV	1	-	-	-	-	+	
	2	-	-	-	+	+	
	3	-	-	+	+	+	
	4	-	-	-	+	+	
Jumlah skor		0	0	3	12	20	35
V	1	-	-	-	+	+	
	2	-	-	-	-	+	
	3	-	-	-	+	+	
	4	-	-	-	-	+	
Jumlah skor		0	0	3	8	20	31

Data Skor Perubahan Histopatologis Hati Ikan Kerapu Tikus yang Divaksin Kombinasi Ribosom dan FKC *Vibrio alginolyticus*.

Ulangan	Lapang pandang	Perubahan histopatologi					Total skor
		A	B	C	D	E	
I	1	-	-	-	+	+	
	2	-	-	-	+	+	
	3	-	-	-	+	+	
	4	-	-	-	-	-	
Jumlah skor		0	0	0	12	15	27
II	1	-	-	-	+	+	
	2	-	-	-	+	+	
	3	-	-	-	+	+	
	4	-	-	-	+	+	
Jumlah skor		0	0	0	16	20	36
III	1	-	-	-	-	+	
	2	-	-	-	-	+	
	3	-	-	-	+	+	
	4	-	-	-	+	-	
Jumlah skor		0	0	0	8	15	23
IV	1	-	-	-	+	+	
	2	-	-	-	+	+	
	3	-	-	-	-	+	
	4	-	-	-	-	-	
Jumlah skor		0	0	0	8	15	23
V	1	-	-	-	-	+	
	2	-	-	-	+	+	
	3	-	-	-	+	+	
	4	-	-	-	+	+	
Jumlah skor		0	0	0	12	20	32

.Keterangan:

A: kongesti vena sentralis, dengan nilai skor 1

B: perdarahan, dengan nilai skor 2

C: infiltrasi sel radang, dengan nilai skor 3

D: degenerasi sel, dengan nilai skor 4

E: nekrosis sel, dengan nilai skor 5

- : tidak ada perubahan

+ : ada perubahan

kemudian dilakukan pengurutan nilai skor dari nilai terkecil ke nilai yang lebih besar untuk mengetahui rank atau peringkatnya.

Nilai skor	0	3	9	11	14	18	23	23	26	27	28	28	28
No.urut	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Nilai skor	29	31	31	32	32	32	35	36	36	36	36	36	-
No.urut	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	-

- Nilai skor 0, memiliki rank: 1
- Nilai skor 3, memiliki rank: 2
- Nilai skor 9, memiliki rank: 3
- Nilai skor 11, memiliki rank: 4
- Nilai skor 14, memiliki rank: 5
- Nilai skor 18, memiliki rank: 6

- Nilai skor 23, memiliki rank: 7,5
- Nilai skor 26, memiliki rank: 9
- Nilai skor 27, memiliki rank: 10
- Nilai skor 28, memiliki rank: 12
- Nilai skor 29, memiliki rank: 14
- Nilai skor 31, memiliki rank: 15,5
- Nilai skor 32, memiliki rank: 18
- Nilai skor 35, memiliki rank: 20
- Nilai skor 36, memiliki rank: 23

Data Perubahan Histopatologis Hati Ikan Kerapu Tikus Setelah Diinfeksi *Vibrio alginolyticus*

Ulangan	Control negatif		Control positif		Ribosom		FKC		Ribosom dan FKC	
	Ns	R0	Ns	R1	Ns	R2	Ns	R3	Ns	R4
1	3	2	36	23	29	14	26	9	27	10
2	14	5	32	18	31	15.5	36	23	36	23
3	9	3	28	12	18	6	28	12	23	7.5
4	0	1	32	18	28	12	35	20	23	7.5
5	11	4	36	23	36	23	31	15.5	32	18
$\sum R$	15		94		70.5		79.5		66	
\bar{R}	5		18.8		14.1		15.9		13.2	
R^2	225		8836		4970.25		6320.25		4356	
SD	± 5.1614		± 2.9933		± 5.8856		± 3.8678		± 5.1147	

Keterangan:

Ns= nilai skor

$\sum R$ = jumlah rank

\bar{R} = rata-rata rank

SD= standar deviasi

R0= rank control negatif

R1= rank control positif

R2= rank perlakuan dengan ribosom

R3= rank perlakuan dengan FKC

R4= rank perlakuan dengan kombinasi ribosom dan FKC

Kemudian dilanjutkan dengan mencari H hitung:

$$\text{Rumus } H_{\text{hitung}}: \frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^k \frac{R_i^2}{n_i} - 3(N+1)$$

Keterangan:

N= jumlah seluruh sample

N_i= jumlah ulangan pada sample ke-I dari setiap perlakuan

R_i= jumlah rank pada sample ke-I dari setiap perlakuan

$$\begin{aligned} H_{\text{hitung}} &= \frac{12}{25(25+1)} \times \frac{225 + 8836 + 4970.25 + 6320.25 + 4356}{5} - 3(25+1) \\ &= 13.2201 \end{aligned}$$

karena dalam data terdapat angka kembar, maka H_{hitung} dimasukan dalam

H_{hitung} terkoreksi-

$$\text{Rumus } H_{\text{hitung terkoreksi}} = \frac{H_{\text{hitung}}}{1 - \frac{T}{N^3 - N}}$$

Keterangan :

$$T = t^3 - t$$

T= banyaknya nilai pengamatan yang sama

N= jumlah seluruh sample

Perhitungan nilai T:

$$T_{23} = 2^3 - 2 = 6$$

$$T_{28} = 3^3 - 3 = 24$$

$$T_{31} = 2^3 - 2 = 6$$

$$T_{32} = 3^3 - 3 = 24$$

$$\underline{T_{36} = 5^3 - 5 = 120}$$

$$\text{Jumlah } T = 180$$

$$H_{\text{hitung terkoreksi}} = \frac{13.2201}{1 - \frac{180}{25^3 - 25}} = 13.3739$$

$$\text{derajat bebas (db)} = t - 1$$

$$= 4$$

dengan menggunakan table X², diperoleh:

$$H_{\text{tabel}(0,05)} = 9,49$$

$$H_{\text{tabel}(0,01)} = 13,28$$

Dari perhitungan di atas diperoleh $H_{\text{hitung}} > H_{\text{tabel}(0,01)}$ maka terdapat perbedaan yang sangat nyata diantara perlakuan.

Untuk mengetahui perbedaan pengaruh perlakuan maka dilanjutkan dengan uji Pasangan berganda atau uji Z, $\alpha = 0,05$.

$$\text{Rumus: } |\bar{R}_i - \bar{R}_j| = Z \sqrt{\frac{k \{N(N^2 - 1) - (t^3 - t)\}}{6N(N - 1)}}$$

Keterangan:

k: jumlah perlakuan

\bar{R}_i : rata-rata rank dari sample ke i

\bar{R}_j : rata-rata rank dari sample ke j

$$Z_{(0,05)} = \frac{\alpha}{k(k-1)} = \frac{0,05}{5(5-1)} = 0,0025 \rightarrow Z_{(0,05)} \text{ pada table} = 0,488$$

Perhitungan uji Z 5%:

$$|\bar{R}_i - \bar{R}_j| = 0,488 \sqrt{\frac{5 \{25(25^2 - 1) - 180\}}{625(25 - 1)}} \\ = 2,2629$$

Perbedaan rata-rata rank nilai skor histopatologis hati ikan kerapu tikus setelah diinfeksi *Vibrio alginolyticus*

Rank	\bar{X}	Beda				Uji Z 5%
		$\bar{X} - R_0$	$\bar{X} - R_4$	$\bar{X} - R_2$	$\bar{X} - R_3$	
R1	18.8 ^a	13.8*	5.6*	4.7*	2.9*	2.2629
R3	15.9 ^b	10.9*	2.7*	1.8		
R2	14.1 ^{bc}	9.1*	0.9			
R4	13.2 ^c	8.2*				
R0	5 ^d					

Notasi

R1	R3	R2	R4	R0
<u>a</u>				
	<u>b</u>			
		<u>c</u>		
			<u>c</u>	
				<u>d</u>

Lampiran 4. Relatif Percent Survival Ikan Kerapu Tikus Setelah Diinfeksi *Vibrio alginolyticus*

Ulangan	Perlakuan			Jumlah
	Ribosom	FKC	Ribosom dan FKC	
I	25%	25%	50%	100%
II	50%	50%	50%	150%
III	75%	50%	50%	175%
IV	50%	25%	75%	150%
V	100%	66.7%	100%	266.7%
Jumlah	300%	216.7%	325%	841.7%
Rata-rata	60%	43.34%	65%	-
SD	25.4951	16.1686	20	-

Data kemudian ditransformasi $\sqrt{\sin}$

Ulangan	Ribosom	FKC	Ribosom dan FKC	Jumlah
I	30.00	30.00	45.00	105.00
II	45.00	45.00	45.00	135.00
III	60.00	45.00	45.00	150.00
IV	45.00	30.00	60.00	135.00
V	90.00	54.76	90.00	234.76
Jumlah	270.00	204.76	285.00	759.76
Rata-rata	54.00	40.952	57.00	-
SD	± 20.3469	± 9.6263	± 17.4929	-

$$FK = \frac{759.76^2}{4 \times 5} = 28861.7629$$

$$JKT = 30^2 + 45^2 + \dots + 90^2 - FK = 14411.8947$$

$$JKP = \frac{270^2 + 204.76^2 + 285^2}{5} = 10348.5686$$

$$JKS = 1441.8947 - 10348.5686 = 4063.3261$$

$$KTP = \frac{10348.5686}{2} = 5174.2843$$

$$KTS = \frac{4063.3261}{12} = 338.6105$$

$$F_{hitung} = \frac{5174.2843}{338.6105} = 15.2809$$

Lampiran 5. Hasil Pengukuran Konsentrasi Protein Dalam Vaksin.

Antigen	A 280	A 260
Ribosom alginolyticus	0.352	0.359
Ribosom anguilarum	0.176	0.242
OMP alginolyticus	2.251	2.767
OMP anguilarum	2.069	2.659
LPS alginolyticus	0.177	0.226
LPS anguilarum	0.588	0.906
FKC alginolyticus	2.658	2.435
FKC anguilarum	3.913	4.000

Rumus konsentrasi protein

$$\text{Konsentrasi protein} = (1,55 \times A_{280}) - (0,76 \times A_{260})$$

Keterangan : A → absorban

Satuan: mg/ml

Dengan menggunakan rumus di atas , maka diperoleh konsentrasi protein antigen sbb:

Antigen	Kons. protein	Antigen	Kons. protein
Ribosomalginolyticus	0.27276	LPS alginolyticus	0.10259
Ribosom anguilarum	0.08888	LPS anguilarum	0.22284
OMP alginolyticus	1.38613	FKC alginolyticus	2.26930
OMP anguilarum	1.18611	FKC anguilarum	3.02515