

**PROTEKSI IKAN KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*)
SETELAH PEMBERIAN KOMBINASI VAKSIN RIBOSOMAL,
LIPOPOLISAKARIDA (LPS) DAN OUTER MEMBRANE PROTEIN (OMP)
DARI BAKTERI *Vibrio alginolyticus***

SKRIPSI

PROGRAM STUDI S-1 BUDIDAYA PERAIRAN



Oleh :

LISA MARGARETHA ARIYANTI
BOJONEGORO - JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2007**

**PROTEKSI IKAN KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*)
SETELAH PEMBERIAN KOMBINASI VAKSIN RIBOSOMAL,
LIPOPOLISAKARIDA (LPS) DAN OUTER MEMBRANE PROTEIN (OMP)
DARI BAKTERI *Vibrio alginolyticus***

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

Oleh :

LISA MARGARETHA ARIYANTI

NIM.060430178 P

Menyetujui,
Komisi Pembimbing



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



Tutik Juniastuti, M.Kes., Drh
Pembimbing II

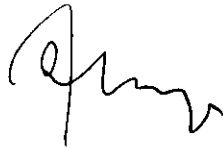
Mengetahui,
Ketua Program Studi S-I
Budidaya Perairan



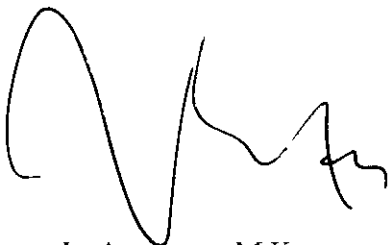
Prof. Dr. Hj. Sri Subekti B.S., DEA., Drh
NIP. 130 687 296

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,



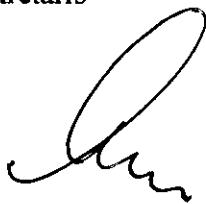
Ir. Rahayu Kusdarwati, M.Kes
Ketua



Ir. Agustono, M.Kes
Sekretaris



Ir. Gunanti Mahasri, M.Si
Anggota



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



Tutik Juniastuti, M.Kes., Drh
Anggota

Surabaya, 24 Juli 2007

Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, PhD., Drh
NIP. 130 687 305

RINGKASAN

LISA MARGARETHA ARIYANTI. Skripsi tentang Proteksi Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) Setelah Pemberian Kombinasi Vaksin Ribosomal, Lipopolisakarida (LPS) dan *Outer Membrane Protein* (OMP) dari Bakteri *Vibrio alginolyticus*. Dosen Pembimbing Dr. **HARI SUPRAPTO**, M.Agr., Ir dan **TUTIK JUNIASTUTI**, M.Kes.,Drh.

Ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) merupakan salah satu jenis ikan yang mempunyai nilai ekspor cukup tinggi. Ikan kerapu tikus sangat diminati oleh sebagian besar penduduk dunia untuk dikonsumsi karena nilai gizinya yang tinggi, dagingnya lembut dan rasanya yang enak. Kendala utama yang dihadapi dalam budidaya ikan kerapu tikus adalah tingginya angka kematian benih dalam waktu yang sangat singkat. Kematian benih lebih banyak disebabkan karena adanya infeksi patogen yang disebabkan oleh virus, bakteri, parasit dan jamur. Sebagian besar infeksi patogen pada benih ikan kerapu tikus yang disebabkan oleh bakteri yaitu dari genus *Vibrio* sp dan penyakit yang ditimbulkannya dinamakan Vibriosis. Salah satu spesies *Vibrio* yang menyerang ikan kerapu tikus adalah *Vibrio alginolyticus*. *Vibrio alginolyticus* dapat menyebabkan mortalitas sampai dengan 80 – 90% khususnya pada stadia benih.

Penelitian ini dilakukan untuk menjawab permasalahan yaitu 1. Apakah pemberian kombinasi vaksin Ribosomal dan Lipopolisakarida (LPS) dari bakteri *Vibrio alginolyticus* dapat memberikan proteksi terhadap infeksi bakteri *Vibrio alginolyticus* sehingga dapat meningkatkan sintasan dan titer antibodi pada benih ikan kerapu tikus. 2. Apakah pemberian kombinasi vaksin Ribosomal dan *Outer Membrane Protein* dari bakteri *Vibrio alginolyticus* dapat memberikan proteksi terhadap infeksi *Vibrio alginolyticus* sehingga dapat meningkatkan sintasan dan titer antibodi pada benih ikan kerapu tikus.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui proteksi yang ditimbulkan akibat pemberian Ribosomal vaccine, Lipopolisakarida vaccine dan *Outer Membrane Protein* vaccine dari *Vibrio alginolyticus* terhadap infeksi bakteri *Vibrio alginolyticus* sehingga dapat meningkatkan sintasan dan titer antibodi dari benih ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*).

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif. Parameter yang diamati pada penelitian ini terdiri dari parameter utama yaitu sintasan, titer antibodi dan *Relatif Presentatif Survival* (RPS), sedangkan parameter penunjang yaitu kualitas air, kerusakan histopatologi dan pengamatan berat molekul protein.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sintasan ikan kerapu tikus yang divaksin dengan kombinasi vaksin Ribosomal dan Lipopolisakarida yaitu sebesar 80% dan yang divaksin dengan kombinasi vaksin Ribosomal dan *Outer Membrane Protein* yaitu sebesar 86,67%. Hasil titer antibodi menunjukkan terjadi peningkatan pada ikan kerapu tikus yang divaksin dengan kombinasi vaksin Ribosomal dan Lipopolisakarida yaitu sebesar 32 sebelum vaksinasi, 128 pada hari ke-10 dan 512 pada hari ke-14, sedangkan yang divaksin dengan kombinasi vaksin Ribosomal dan *Outer Membrane Protein* yaitu sebesar 32 sebelum vaksinasi, 512 pada hari ke-10 dan 1024 pada hari ke-14. Hasil RPS menunjukkan hasil sebesar 72,72% pada ikan kerapu tikus yang divaksin kombinasi vaksin Ribosomal dan Lipopolisakarida dan 81,82% pada ikan kerapu tikus yang divaksin kombinasi vaksin Ribosomal dan *Outer Membrane Protein*.

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian kombinasi vaksin Ribosomal, Lipopolisakarida dan *Outer Membrane Protein* dapat meningkatkan sintasan, titer antibodi dan RPS ikan kerapu tikus yang diinfeksi bakteri *Vibrio alginolyticus*

SUMMARY

LISA MARGARETHA ARIYANTI. This thesis is about Humpback Grouper (*Cromileptes altivelis*) Protection after the Giving Ribosomal Combined Vaccine, Lipopolysaccharides (LPS), and *Outer Membrane Protein* (OMP) from *Vibrio alginolyticus* bacteria. Academic advisor: Dr. **HARI SUPRAPTO**, M. Agr., Ir and **TUTIK JUNIASTUTI**, M. Kes., Drh.

Humpback grouper fish (*Cromileptes altivelis*) is a kind of high-export-valued fish. It is very desired by most world citizen for consuming since it has high nutrition contain, soft meat, and delicious taste. However, main obstacle encountered in raising them is a high rate of seeds death which occurs only in short time. Most of the death is caused by pathogenic infection brought by virus, bacteria, parasite, and fungi. Major pathogenic infection that is exposure at grouper's seeds is carried by bacteria, one from genus *Vibrio* sp. The resulting disease from the exposure is named Vibriosis. One of *Vibrio* species that attack grouper is *Vibrio alginolyticus*. *Vibrio alginolyticus* is able to cause mortality rate up to 80 – 90%, especially at seeding stadium.

This research is aimed to answer some emerging problems: 1. does the giving of ribosomal combined vaccine and lipopolysaccharides from *Vibrio alginolyticus* can protect the grouper from the exposure to *Vibrio alginolyticus* bacteria infection so that it can enhance the survival rate and antibody titer of grouper seeds? 2. does the giving of ribosomal combined vaccine and *Outer Membrane Protein* from *Vibrio alginolyticus* bacteria is able to protect the grouper against the exposure to *Vibrio alginolyticus* infection so that it can enhance the survival rate and antibody titer of grouper seeds?

This research is also aimed to understand how the protection generated from the giving of Ribosomal vaccine, Lipopolysaccharide vaccine, and *Outer Membrane Protein* vaccine from *Vibrio alginolyticus* against the exposure to *Vibrio alginolyticus* infection so that it can enhance the survival rate and antibody titer of grouper seeds (*Cromileptes altivelis*)?

This research is a descriptive research. The observed parameter within the research comprise of main parameter, that are survival rate, antibody titer, and

Relative Presentative Survival (RPS), and supporting parameter that are water quality, histopathology and observation of molecule protein weight's.

It is shown within the results of the research that the survival rate of grouper which is vaccinated with the combination of Ribosomal and Lipopolysaccharides vaccine is around 80% and the one vaccinated with the combination of Ribosomal and *Outer Membrane Protein* vaccine is about 86,67%. While the antibody titer shown an increase on the Ribosomal-Lipopolysaccharides combined vaccinated grouper as many as 32 before vaccination, 128 on the 10th day and 512 on the 14th day. On the other hand, it is shown by the Ribosomal and *Outer Membrane Protein* vaccinated grouper that there is an increase as many as 32 before vaccination, 512 on the 10th day and 1024 on the 14th day. RPS result show an increase as many as 72,72 on the Ribosomal and Lipopolysaccharides combined vaccinated grouper and 81,82 on the Ribosomal and *Outer Membrane Protein* vaccinated grouper.

According to the result, it is concluded that the giving of Ribosomal, Lipopolysaccharides, and *Outer Membrane Protein* combined vaccine is able to enhance the sintasan, antibody titer and RPS on the *Vibrio alginolyticus*-infected grouper.

KATA PENGANTAR

Segala puji atas kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya kepada penulis untuk menyelesaikan Skripsi berjudul “Proteksi Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) Setelah Pemberian Kombinasi Vaksin Ribosomal, Lipopolisakarida (LPS) dan *Outer Membrane Protein* (OMP) dari Bakteri *Vibrio alginolyticus*” yang diajukan untuk memenuhi syarat guna memperoleh gelar Sarjana Perikanan pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Keberhasilan dalam penulisan ini tidak lepas dari bantuan dan kerjasama berbagai pihak. Dengan kerendahan hati penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. Hari Suprpto. M. Agr., Ir selaku Pembimbing I dan Tutik Juniastuti, M.Kes., drh selaku Pembimbing II yang telah membimbing penulis.
2. Prof. Hj. Romziah Sidik, PhD., Drh selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
3. Bapak, Ibu dan adik-adikku atas do'a restunya, nasehat, bimbingan dan kasih sayang yang berlimpah. “ I love U ALL “
4. Teman-teman “Tim Ruwet 04” , “MulUt 141B”, “Ex SMUGA 01” terima kasih atas persahabatan, dukungan, semangat dan bantuan yang diberikan selama pendidikan sampai berakhir.

5. Seluruh pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu, yang telah membantu terlaksananya penelitian dan penulisan makalah skripsi ini.

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

Surabaya, April 2007

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	iv
SUMMARY	vi
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan	5
1.4 Manfaat	6
II. STUDI PUSTAKA	7
2.1 Tinjauan Ikan Kerapu Tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>)	7
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi	7
2.1.2 Penyebaran dan Habitat	9
2.1.3 Biologi Reproduksi.	10
2.2 Vibriosis	11
2.3 <i>Vibrio alginolyticus</i>	13
2.4 Perkembangan vaksinasi pada ikan	14
III. KERANGKA KONSEPTUAL	21
IV. METODOLOGI	24
4.1 Tempat dan Waktu.....	24
4.2 Materi Penelitian.....	24
4.2.1 Bahan penelitian.....	25
4.2.2 Alat penelitian.....	25
4.3 Metode Penelitian	26
4.4 Prosedur Penelitian	26
4.4.1 Persiapan air media pemeliharaan	26
4.4.2 Persiapan ikan uji.....	26

4.4.3 Pembuatan vaksin	26
4.4.4 Cara pembuatan dosis vaksin.....	28
4.4.5 Tahap perlakuan	28
4.5 Parameter	29
4.5.1 Parameter Utama.....	29
4.5.2 Parameter Penunjang	31
V. HASIL DAN PEMBAHASAN	34
5.1 Hasil Penelitian.....	34
5.1.1 Sintasan (<i>Survival rate</i> /SR).....	34
5.1.2 <i>Relatif Persentase Survival</i> (RPS).....	34
5.1.3 Titer Antibodi.....	35
5.1.4 Kualitas air.....	36
5.1.5 Histopatologi insang	37
5.1.6 Pengamatan berat molekul protein (Elektroforesis).....	38
5.2 Pembahasan.....	38
VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	44
6.1 Kesimpulan	44
6.2 Saran	44
DAFTAR PUSTAKA.....	45

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Ikan Kerapu Tikus.....	8
2. Struktur Lipopolisakarida	18
3. Membran Luar Bakteri Gram Negatif	19
4. Bagan Kerangka Konseptual	23
5. Skema Prosedur Kerja Penelitian	33
6. Histopatologi Insang Normal Ikan Kerapu Tikus dengan Pewarnaan Hematoxylin Eosin Pembesaran 400x.....	37
7. Kerusakan Histopatologi Insang Kerapu tikus yang Terserang <i>Vibrio alginolyticus</i> dengan Pewarnaan Hematoxylin Eosin Pembesaran 400x	37
8. Hasil pemeriksaan SDS-PAGE	38

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil penghitungan sintasan (SR) secara keseluruhan.....	34
2. Hasil penghitungan <i>Relatif Presentase Survival</i> (RPS).....	35
3. Hasil pengukuran titer antibodi ikan kerapu tikus	35
4. Hasil pengukuran kualitas air.....	36

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Hasil uji biokimia bakteri <i>Vibrio alginolyticus</i>	50
2. Dosis vaksin yang digunakan dalam Penelitian Pendahuluan	51
3. Hasil penghitungan LD50	52
4. Langkah kerja Histopatologi	53
5. Skema kerja Elektroforesis SDS-PAGE	56

BAB I

PENDAHULUAN

BAB I

PENDAHULUAN

I.I Latar Belakang

Produksi perikanan Indonesia periode 1994-2000, 81% masih mengandalkan hasil penangkapan ikan di beberapa perairan (terutama Indonesia Barat) telah mendekati maksimal (Akbar dan Sudaryanto, 2000). Dirjen perikanan mencanangkan program peningkatan hasil perikanan tahun 2003 (PROTEKAN 2003), dimana 65% diharapkan dari perikanan budidaya, sedangkan 35% dari hasil penangkapan di laut. Menurut Kordi (2001), potensi areal yang memenuhi syarat untuk budidaya laut adalah 506.000 Ha dan yang telah diusahakan baru 29.000 Ha atau sekitar 5,73%. Bila potensi tersebut dimanfaatkan secara optimal dan benar, dapat meningkatkan pendapatan petani nelayan, membuka lapangan kerja, memanfaatkan daerah potensial, meningkatkan produktivitas perikanan, meningkatkan devisa negara dan membantu menjaga kelestarian sumber daya hayati perairan.

Ikan kerapu merupakan salah satu jenis ikan yang mempunyai nilai ekspor cukup tinggi. Salah satu jenis ikan kerapu yang mempunyai nilai ekonomis penting yaitu ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*). Ikan kerapu tikus sangat diminati oleh sebagian besar penduduk dunia untuk dikonsumsi karena nilai gizinya yang tinggi, dagingnya lembut dan rasanya banyak digemari oleh konsumen, oleh karena itu nilai harga jual ikan kerapu tikus di pasaran sangat tinggi (Akbar dan Sudaryanto, 2000). Ikan kerapu tikus memiliki nilai ekonomis tinggi di pasaran internasional, baik sebagai ikan konsumsi (ukuran 600-1200 g/ekor) maupun ikan

hias (ukuran panjang 5-10 cm/ekor). Dalam keadaan hidup, harga ikan kerapu tikus ukuran konsumsi mencapai Rp.280.000-350.000 per Kg

Ikan kerapu tikus mempunyai pangsa pasar yang menjanjikan, baik untuk pemasaran dalam negeri maupun luar negeri. Di lain pihak, sebagian besar produksi masih diperoleh dari penangkapan di alam, sedangkan kendala lain yang dihadapi adalah dalam hal pengadaan benih (Sudjiharno, 2001). Kebutuhan benih untuk usaha budidaya mutlak diperlukan mengingat perkembangan usaha budidaya kerapu tikus yang sudah berkembang pesat, baik dalam karamba jaring apung atau dalam kolam tambak. Kondisi benih penting sekali dalam usaha budidaya agar hasil produksi memuaskan. Benih harus bermutu baik, sehat dan seragam ukurannya. Benih yang sehat biasanya berwarna cerah, gerakannya lincah dan aktif, nafsu makan tinggi dan tidak ada cacat pada sirip, sisik maupun bagian tubuh lainnya. Kebutuhan akan benih semakin meningkat namun tidak diimbangi dengan hasil produksi benih yang tinggi dan kontinyu. Hal inilah yang menyebabkan harga benih ikan kerapu tikus tinggi (Gufron dan Kordi, 2001).

Berdasarkan fakta di lapangan (pusat pembenihan), rendahnya stok benih ikan kerapu tikus disebabkan oleh tingginya *mortalitas* (>50%) terutama pada fase kritis 1. Pada fase ini menurut Kordi (2001), larva tidak lagi memiliki cukup energi untuk memangsa dan mencerna pakan. Hal ini menurut Akbar dan Sudaryanto (2000), disebabkan karena makanan cadangan kuning telur habis, sementara bukaan mulut larva masih terlalu kecil untuk memangsa pakan yang diberikan seperti rotifera dan organ pencernaan masih belum berkembang sempurna.

Penyakit merupakan salah satu kendala utama dalam keberhasilan produksi perikanan yang sangat merugikan. Menurut Austin *and* Austin (1987), penyakit terjadi akibat adanya interaksi antara inang (ikan), patogen dan lingkungan. Kondisi lingkungan yang jelek dapat menyebabkan stress dan penurunan daya tahan tubuh ikan terhadap penyakit. Stress akibat lingkungan merupakan pemacu utama timbulnya penyakit bakterial, viral, jamur dan parasit, oleh karena itu pemeriksaan di lokasi secara teratur perlu dilakukan termasuk pengamatan atau monitoring harian pada waktu pemberian makanan sehingga tingkah laku atau respon ikan dapat langsung diamati.

Salah satu kendala utama budidaya ikan kerapu tikus adalah tingginya angka kematian benih dalam waktu yang sangat singkat. Kematian benih lebih banyak disebabkan karena adanya infeksi patogen yang disebabkan oleh virus, bakteri, parasit dan jamur. Sebagian besar infeksi patogen pada benih ikan kerapu tikus yang disebabkan oleh bakteri adalah dari genus *Vibrio* sp dan penyakit yang ditimbulkannya dinamakan Vibriosis. Bakteri patogen pada ikan air payau terutama yang menyerang ikan kerapu tikus yang berasal dari genus *Vibrio* ada 4 spesies yaitu *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio marinus* (Murdjani, 2002). Menurut Seng (1994), *Vibrio parahaemolyticus* dan *Vibrio alginolyticus* merupakan penyebab kematian yang potensial pada ikan kerapu tikus. Bakteri *Vibrio alginolyticus* dapat menyebabkan mortalitas sampai dengan 80-90% khususnya pada stadia benih.

Adanya serangan bakteri *Vibrio alginolyticus* pada ikan kerapu tikus mengakibatkan kerusakan pada kulit, insang, organ-organ pencernaan, otot dan ginjal. Tetapi kerusakan yang paling parah adalah yang terjadi pada insang dan

kulit, hal ini tentu saja dapat mengakibatkan terjadinya penurunan produksi ikan kerapu tikus. Oleh karena diperlukan berbagai upaya untuk menanggulangi.

Keberhasilan pengendalian penyakit pada budidaya ikan kerapu tikus ditentukan oleh pemilihan lokasi yang memenuhi persyaratan secara teknis, pengelolaan lingkungan budidaya ikan kerapu serta penerapan teknologi budidaya yang tepat. Usaha pengendalian penyakit pada kegiatan budidaya ikan kerapu tikus selama ini masih tertuju pada penggunaan bahan kimia dan antibiotik. Penggunaan antibiotik secara terus-menerus akan menimbulkan masalah yaitu timbulnya resistensi, penimbunan residu obat-obatan didalam tubuh ikan tersebut, pencemaran lingkungan yang akhirnya dapat mempengaruhi organisme perairan lainnya. Resistensi bakteri juga dapat meningkat karena penggunaan obat secara terus-menerus. Menurut Rukyani (1993), terdapat sekitar lebih dari 200 strain baru bakteri yang resisten terhadap lebih dari dua antibiotik.

Pengobatan bakteri dengan menggunakan bahan-bahan yang tidak menimbulkan pencemaran lingkungan dan timbulnya resistensi pada bakteri sangat diperlukan. Metode vaksinasi juga dapat digunakan untuk mencegah penyakit dan meningkatkan kekebalan ikan. Dilaporkan bahwa pemberian vaksin *Outer Membrane Protein* dapat meningkatkan sintasan benih ikan kerapu macan sampai 90% terhadap serangan bakteri *Vibrio anguillarum* (Dewantoro, 2006), selanjutnya Suprpto *et al.*, (2002) menyatakan bahwa vaksinasi dengan *Outer Membrane Protein* dapat meningkatkan sintasan sampai 80% pada ikan nila yang terinfeksi *Vibrio alginolyticus*. Hermawan (2006) menyatakan bahwa pemberian vaksin Lipopolisakarida juga dapat meningkatkan sintasan dan titer antibodi ikan kerapu macan sampai 100% terhadap infeksi bakteri *Vibrio alginolyticus*

sedangkan Lieberman *et al.*, (1978) menyatakan bahwa vaksinasi dengan Ribosomal dapat meningkatkan jumlah antibodi pada ikan salmon atlantic terhadap infeksi *Pseudomonas*.

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka dilakukan penelitian lanjutan tentang penggunaan kombinasi vaksin Ribosomal, Lipopolisakarida dan *Outer Membrane Protein* dari bakteri *Vibrio alginolyticus* sebagai vaksin untuk dapat memberikan proteksi pada benih ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*). Vaksinasi dilakukan secara *intramuscular*, cara ini sangat efektif untuk dapat merangsang respon imun humoral dan seluler.

I.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, maka dapat dikemukakan rumusan masalah yaitu sebagai berikut:

1. Apakah pemberian vaksin kombinasi Ribosomal dan Lipopolisakarida dari *Vibrio alginolyticus* dapat memberikan proteksi terhadap infeksi bakteri *Vibrio alginolyticus* sehingga dapat meningkatkan sintasan dan titer antibodi pada benih ikan kerapu tikus?
2. Apakah pemberian vaksin kombinasi dari Ribosomal dan *Outer Membrane Protein* dari *Vibrio alginolyticus* dapat memberikan proteksi terhadap infeksi bakteri *Vibrio alginolyticus* sehingga dapat meningkatkan sintasan dan titer antibodi pada benih ikan kerapu tikus?

I.3 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui proteksi yang ditimbulkan akibat pemberian kombinasi vaksin Ribosomal, Lipopolisakarida, *Outer Membrane Protein* dari *Vibrio alginolyticus* terhadap infeksi bakteri *Vibrio alginolyticus* sehingga dapat meningkatkan sintasan dan titer antibodi dari benih ikan kerapu tikus.

1.4 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah pemberian Ribosomal vaccine, Lipopolisakarida vaccine dan *Outer Membrane Protein* vaccine dapat di gunakan untuk meningkatkan proteksi dan meningkatkan sintasan benih ikan kerapu tikus dari infeksi bakteri *Vibrio alginolyticus* sehingga dapat meningkatkan produksi ikan kerapu tikus dan tidak mengandalkan benih dari alam.

BAB II

STUDI PUSTAKA

BAB II

STUDI PUSTAKA

2.1 Tinjauan Ikan Kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*)

2.1.1 Klasifikasi dan morfologi

Ikan kerapu tikus tergolong dalam famili Serranidae, tubuhnya tertutup oleh sisik-sisik kecil. Kebanyakan hidup di perairan terumbu karang dan sekitarnya, ada pula yang hidup disekitar muara sungai namun ikan kerapu tikus tidak menyukai perairan laut dengan salinitas yang rendah. Terdapat empat genus untuk famili Serranidae yaitu *Epinephelus*, *Variola*, *Plectropomus* dan *Cromileptes*. Sebagian besar anggota famili Serranidae hidup di perairan relatif dangkal dengan dasar terumbu karang, tetapi beberapa jenis diantaranya dapat ditemukan pada kedalaman sekitar 300 meter (Akbar dan Sudaryanto, 2000).

Menurut Heemstra *and* Randall (1993), sistematika ikan kerapu tikus adalah:

- Phylum : Chordata
- Sub Phylum : Vertebrata
- Class : Osteichthyes
- Sub Class : Actinopterygi
- Ordo : Percomorphi
- Sub Ordo : Percoidea
- Family : Serranidae
- Genus : *Cromileptes*
- Spesies : *Cromileptes altivelis*

Heemstra *and* Randall (1993) mendiskripsikan ikan kerapu tikus mempunyai bentuk badan yang memanjang gepeng (*Compressed*) atau agak membulat, lebar serong keatas dengan bibir bawah menonjol keatas dengan panjang tubuh 2,6 – 3,0 kali panjang standar ikan (panjang standar ikan 12-37 cm).



Gambar 1. Ikan kerapu tikus (Sumber: Sunyoto dan Mustamal, 2002)

Panjang kepala seperempat panjang total, leher bagian atas cekung dan semakin tua semakin cekung. Rahang bawah dan atas dilengkapi dengan gigi-gigi geratan berderet dua baris, lancip dan kuat serta ujung luar bagian depan adalah gigi-gigi yang terbesar. Sirip ekor umumnya membulat (*Rounded*), sirip punggung memanjang dimana bagian jari-jarinya yang keras berjumlah kurang lebih sama dengan jari-jari lunak, jari-jari sirip yang keras berjumlah 6-8 buah, sedangkan sirip dubur berjumlah 3 buah, jari-jari sirip ekor berjumlah 15-17 buah. Warna kulit terang abu-abu kehijauan dengan bintik-bintik hitam di seluruh kepala, badan, dan sirip. Bintik hitam ikan kerapu tikus muda lebih besar dan lebih sedikit semakin tua bertambah banyak.

2.1.2 Penyebaran dan habitat

Daerah penyebaran ikan kerapu tikus dimulai dari Afrika Timur, Kepulauan Ryukyu (Jepang Selatan), Australia, Taiwan, Mikronesia dan Polinesia (Sudjiharno, 2001). Di Indonesia ikan kerapu tikus banyak ditemukan di perairan pulau Sumatera, Jawa, Sulawesi, pulau Buru, dan Ambon. Salah satu indikator adanya ikan kerapu tikus adalah perairan berkarang. Indonesia memiliki perairan karang yang cukup luas sehingga potensi sumber daya ikan kerapu sangat besar. Daerah karang lepas digunakan benih ikan kerapu tikus sebagai tempat untuk berlindung dari pemangsa dan sebagai tempat persembunyian untuk mencari mangsanya (Kordi, 2001).

Dalam siklus hidupnya ikan kerapu tikus muda hidup di perairan karang pantai dengan kedalaman 0,5-3 meter dan selanjutnya menginjak masa dewasa beruaya (pindah) ke perairan yang lebih dalam antara 7-40 meter, biasanya perpindahan ini berlangsung pada siang dan sore hari (Tampubolon dan Mulyadi, 1989). Telur dan larva ikan kerapu tikus bersifat *pelagis* sedangkan ikan kerapu muda hingga dewasa bersifat *demersal*. Habitat yang disenangi larva dan ikan kerapu tikus muda adalah perairan pantai dekat muara sungai dengan dasar pasir berkarang yang banyak ditumbuhi padang lamun atau karang berlumpur. Ikan kerapu lebih suka menghindari dari sinar matahari langsung, kecuali sewaktu mencari makan dan saat memijah. Larva ikan kerapu muda pada umumnya menghindari permukaan air pada siang hari, sebaliknya pada malam hari lebih banyak ditemukan di permukaan air. Penyebaran *vertikal* tersebut sesuai dengan sifat ikan kerapu tikus sebagai organisme *nokturnal*, yaitu pada siang hari lebih

banyak bersembunyi di liang-liang karang, sedangkan pada malam hari aktif bergerak di permukaan air untuk mencari makan (Murtidjo, 2002).

Parameter ekologis yang cocok untuk pertumbuhan ikan kerapu tikus yaitu suhu antara 24-31°C, salinitas 30-33 ppt, DO lebih dari 3,5 ppm dan pH antara 7,8-8 dan perairan dengan kondisi tersebut di atas pada umumnya terdapat di perairan terumbu karang.

2.1.3 Biologi reproduksi

Ikan kerapu tikus bersifat hermaphrodit protogini, yaitu pada perkembangan pada saat larva hingga dewasa (matang gonad) berjenis kelamin betina dan akan berubah menjadi jantan apabila ikan tersebut tumbuh menjadi lebih besar atau semakin tua umurnya (Effendi, 1997). Fase reproduksi betina ukuran panjang tubuh minimum 450 mm dengan berat tubuh 3-10 kg, kemudian menjadi jantan matang kelamin pada ukuran panjang tubuh minimum 740 mm dan berat tubuh 11 kg. Fase reproduksi ikan kerapu tikus dapat dicapai pada ukuran berat 1-3 kg dengan fekunditas antara 300.000 sampai 700.000 telur (Subyakto dan Cahyaningsih, 2003).

Fenomena perubahan jenis kelamin pada ikan kerapu tikus sangat erat hubungannya dengan aktivitas pemijahan, umur, indeks kelamin dan ukuran. Ikan kerapu tikus melakukan pemijahan pada malam hari yaitu pada pukul 20.00-03.00 WIB. Ikan kerapu tikus jantan akan berputar-putar mengikuti ikan kerapu betina, kemudian ikan kerapu betina mengeluarkan telurnya maka ikan kerapu jantan akan mengeluarkan spermanya sehingga telur akan dibuahi oleh sperma tersebut (Akbar dan Sudaryanto, 2000).

Pada umumnya ikan kerapu bersifat *soliter* tetapi pada saat akan memijah bergerombol, di perairan Indo Pasifik puncak pemijahan berlangsung beberapa hari sebelum bulan purnama pada malam hari. Hasil pengamatan di wilayah Indonesia, musim-musim pemijahan ikan kerapu terjadi pada bulan Juni-September dan November-Februari terutama di perairan Kepulauan Riau, Karimun Jawa dan Irian Jaya. Beberapa spesies ikan kerapu mempunyai musim pemijahan 6-8 kali pertahun sedangkan pemijahan pertama (*prespawning*) 1-2 kali pertahun.

2.2 Vibriosis

Vibriosis disebabkan oleh infeksi bakteri *Vibrio* sp. *Vibrio* adalah bakteri dengan bentuk batang bengkok, Gram negatif, *aerob* dan *fakultatif anaerob* dan dapat bergerak karena mempunyai satu flagela kutub. *Vibrio* membentuk koloni yang konvek, halus, bulat dan bergranula pada permukaannya (Merchant and Packer, 1971). Bakteri *Vibrio* biasanya hidup dalam keadaan lingkungan yang kurang menguntungkan, namun demikian dalam kondisi normal masih dapat ditemukan bakteri tersebut. *Vibrio* sp dapat dijumpai dalam air tawar dan air asin. Bakteri yang terdapat di perairan tropis tergolong bakteri mesophilik yang dapat hidup pada suhu antara 20-45°C. Bakteri *Vibrio* banyak juga yang hidup pada kisaran suhu 4-42°C dan dapat menetap selama berminggu-minggu didalam lingkungan basah dengan sedikit atau tanpa makanan (Maftuch *dkk*, 2001).

Bakteri *Vibrio* sp bersifat oportunistik maka serangan akan timbul apabila bakteri telah berkembang cukup banyak dan daya tahan inang lemah. Bakteri *Vibrio* sp merupakan bakteri yang sangat ganas dan berbahaya pada budidaya air

payau dan laut karena dapat bertindak sebagai patogen primer dan patogen sekunder. Patogen ini menampilkan keanasannya apabila lingkungan mendukung dan dalam jumlah cukup untuk mengadakan penyerangan (Murdjani, 2002).

Menurut Kamiso (1996), vibriosis dapat mengakibatkan tingkat kematian lebih dari 80% pada budidaya ikan kerapu di jaring apung atau panti pembenihan. Vibriosis merupakan penyakit bakterial yang sering ditemukan pada budidaya ikan kerapu tikus mulai stadium telur, larva, benih, juvenil sampai induk. Pada stadium larva, serangan *Vibrio* sering menunjukkan serangan penyakit akut tanpa gejala klinis yang jelas.

Vibriosis biasa terjadi pada suhu tinggi, padat tebar tinggi, perubahan salinitas dan kandungan bahan organik yang tinggi. Bakteri dapat menular melalui persinggungan dengan ikan yang sakit atau yang paling sering adalah melalui air. Serangan dapat melalui luka, insang, kulit dan saluran pencernaan. Organ yang diserang yaitu insang, ginjal, hati dan saluran pencernaan. Gejala klinis pada ikan yang terserang Vibriosis adalah punggung kehitam-hitaman, bercak merah pada pangkal sirip, bergerak lamban, keseimbangan terganggu, nafsu makan menurun, exophthalmia, perut kembung berisi cairan, haemorrhagik pada insang, mulut. Kematian ikan terjadi terutama karena tidak berfungsinya organ tubuh dan kekurangan O_2 (Kamiso, 1996).

Metode pencegahan dan pengobatan telah banyak dilakukan misalnya dengan menjaga kualitas air tetap stabil, memutus atau mengurangi sumber penularan antara lain dengan membuang ikan yang terserang atau terinfeksi bakteri dan mencegah kontak dengan hewan liar yang membawa bakteri.

Vaksinasi dapat digunakan untuk pencegahan dan yang perlu diperhatikan adalah agar vaksin yang digunakan sesuai dengan bakteri yang menyerang. Vaksinasi dapat dilakukan baik secara rendaman, oral, suntikan atau dicampur dalam pakan. Pemberian vitamin C dosis tinggi dapat digunakan untuk meningkatkan daya tahan tubuh ikan yang dapat dicampur dengan pakan atau suntikan. Obat-obatan atau antibiotik dapat digunakan untuk pencegahan sebelum terserang (Triyanto *dkk*, 1996). Pencegahan dapat dilakukan pada saat benih berumur 12-43 hari karena bakteri mulai menyerang ikan kerapu saat fase I dimana cadangan kuning telur mulai habis sedangkan bukaan mulut masih kecil sehingga belum mampu menerima pakan yang diberikan (Triastutik *dkk*, 2003).

2.3. *Vibrio alginolyticus*

Menurut *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Buchanan and Gibbons, 1974), *Vibrio alginolyticus* adalah bakteri Gram negatif yang mempunyai klasifikasi sebagai berikut:

Divisi : Bacteria
 Class : Schizomycetes
 Ordo : Eubacteria
 Family : Vibrionaceae
 Genus : *Vibrio*
 Spesies : *Vibrio alginolyticus*

Vibrio alginolyticus sangat umum ditemukan di lingkungan perairan laut. Organisme ini tidak menyebabkan diare akan tetapi menyebabkan infeksi terhadap jaringan. *Vibrio alginolyticus* ditemukan pada ikan bersirip, kerang-kerangan dan makanan laut, sedimen laut (Bullock, 2005).

Vibrio alginolyticus merupakan bakteri Gram negatif, berbentuk batang, mempunyai sifat oksidase positif, fermentatif terhadap glukosa, sensitif terhadap 0/129 150 µg, tetapi resisten terhadap 0/129 10 µg, motil, tumbuh pada media TCBSA dengan warna koloni kuning, indol positif, reaksi asam pada penggunaan glukosa, sukrosa, dan laktosa (Frerichs and Millar, 1993)).

Sumber penularan dan penyebaran bakteri *Vibrio alginolyticus* adalah dari ikan liar. Kemudian juga air yang mengandung bakteri *Vibrio*, karena bakteri ini dapat hidup bebas dan berkembang di air dalam waktu yang lama. Lingkungan merupakan faktor yang sangat penting yang mempengaruhi wabah vibriosis. Lingkungan mempunyai dua pengaruh, pengaruh pertama menyebabkan ikan menjadi stress, sedangkan pengaruh kedua adalah keganasan. Stress merupakan faktor sangat penting yang merupakan timbulnya wabah penyakit dan beratnya infeksi (Kamiso, 1996).

2.4 Perkembangan vaksinasi pada ikan

Vaksinasi merupakan cara imunisasi aktif. Vaksinasi 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 (Ellis, 1988). Menurut Kamiso (1996), vaksinasi adalah proses pemasukan antigen (vaksin) kedalam tubuh ikan atau udang untuk mendapatkan kekebalan spesifik dan non spesifik sehingga ikan atau udang kebal terhadap patogen tertentu. Vaksinasi dapat dilakukan dengan cara injeksi, melalui pakan, pencelupan atau perendaman.

Vaksin adalah suspensi patogen yang sudah dilemahkan atau dimatikan, bagian dari patogen atau substrat yang merupakan produk dari patogen yang

bersifat antigenik, imunogenik dan protektif (Kamiso,1996). Suatu vaksin yang bersifat imunogen apabila dapat merangsang dalam pembentukan antibodi. Selanjutnya dijelaskan oleh Astuti *dkk* (2000) bahwa vaksin adalah sediaan yang mengandung bibit penyakit yang masih hidup atau telah dimatikan dengan maksud dapat memperoleh kekebalan aktif dan khas yang berguna untuk perlindungan terhadap serangan suatu penyakit. Penggunaan vaksin atau Imunoprofilaksis untuk mencegah penyakit infeksi, berkembang dari pengamatan bahwa individu yang telah sembuh dari suatu infeksi spesifik tidak menderita penyakit itu lagi. Vaksinasi dengan organisme pembentukan yang telah diinaktifkan/dilemahkan telah terbukti merupakan cara yang efektif untuk meningkatkan daya tahan hospes (Bellanti, 1993).

Tujuan dari pengembangan vaksin adalah untuk mencapai tingkat perlindungan tertinggi dengan angka terendah terhadap pengaruh yang tidak menguntungkan. Penggunaan vaksin didasarkan pada rangsangan respons imun spesifik dalam hospes (imunisasi aktif), ini berbeda dengan pemindahan antibodi yang dibuat lebih dahulu (imunisasi pasif).

Sujudi (1994) mengemukakan bahwa syarat suatu vaksin adalah harus bersifat imunogen, artinya harus dapat merangsang pembentukan antibodi yang bertujuan untuk mendapatkan kekebalan secara aktif, dimana antigen tersebut bersama dengan limfoid membentuk antibodi. Selanjutnya dijelaskan oleh Astuti *dkk* (2000) bahwa syarat suatu vaksin adalah aman, tidak *toxic* dan tidak mengganggu kesehatan; kebal terhadap infeksi alam yang ganas; kebal cukup lama; mudah penggunaan dan biaya rendah; stabil dalam ruangan; tidak timbul efek samping pasca imunisasi. Vaksin yang baik adalah yang mampu memberikan

proteksi terhadap ikan selama minimal 2 tahun dan harus efektif bisa membunuh bakteri. Dalam imunisasi aktif untuk mendapatkan proteksi dapat diberikan vaksin hidup atau dilemahkan. Baratawidjaja (2006) menyatakan bahwa vaksin yang baik harus mudah diperoleh, murah, stabil dalam cuaca ekstrim dan non patogenik.

Ribosom adalah struktur makromolekuler didalam sel yang memimpin berbagai interaksi yang ada hubungannya dengan sintesa protein, oleh karena itu ribosom mengandung faktor-faktor yang berfungsi sebagai enzim (Suryo, 1984). Ribosom adalah suatu granula kecil berdiameter 18-22 nm yang berfungsi mensintesa protein. Ribosom mengandung asam Ribonukleat dan sejumlah molekul protein yang merupakan tempat melangsungkan sintesa protein sel (Lehninger, 1982). Dalam menjalankan fungsinya, ribosom-ribosom berderet membentuk kelompok yang dinamakan poliribosom atau polisom. Susunan ribosom dalam poliribosom dapat membentuk gambaran deretan butir-butir dalam susunan spiral. Jumlah ribosom dalam poliribosom dapat memberikan informasi tentang ukuran molekul protein yang di sintesis ditempat itu. Makin banyak jumlah ribosomnya dalam satu ribosom makin panjang bentuk molekul protein yang di sintesis. Begitu pentingnya organela ini sehingga dalam satu sel bakteri dapat ditemukan sekitar 10.000 ribosom (Subowo, 1995).

Ukuran ribosom yang terbesar sekitar 250 nm dan ribosom ini tersusun dari 2 sub unit yaitu sub unit besar dan sub unit kecil. Sub unit kecil mengandung satu molekul rRNA atau disebut RNA "18S" dan bertugas mengartikan kode triplet sedangkan sub unit besar mengandung satu copy dari setiap tiga molekul rRNA yang berlainan yang ditandai 5S, 5,8S, dan 28S dan bertugas mensintesis ikatan peptida. Ribosom merupakan situs dan tempat berlangsungnya sintesis protein.

Didalam sel-sel yang khusus aktif dalam protein, ribosom dapat merupakan 25% dari bobot kering sel (Kimball, 1983).

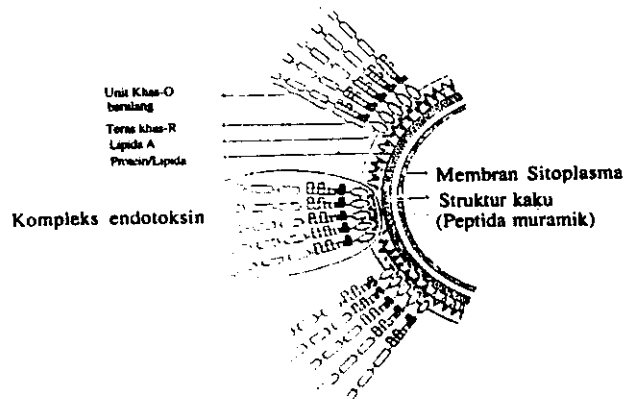
Protein dalam Ribosomal sangat imunogen dan efektif digunakan sebagai vaksin. Penggunaan vaksin Ribosomal dari bakteri *Pseudomonas aeruginosa* terbukti dapat meningkatkan titer antibodi (Gonggrijp *et al.*, 1981) selanjutnya dilaporkan oleh Kusuda *et al.*, (1988) bahwa pemberian vaksin Ribosomal pada ikan *Yellow tail* dapat memberikan proteksi dari serangan bakteri *Pasteurella piscicida*.

Menurut Burgess (1995), bahwa permukaan sel bakteri kaya dengan antigen permukaan yang secara kolektif disebut determinan virulensi, yang memudahkan penempelan (fimbria), penetrasi dan invasi (enzim ekstrasel), perlindungan terhadap pertahanan inang (kapsul, enzim ekstrasel) dan menyebabkan penyakit (eksotoksin, endotoksin, enterotoksin).

Salah satu perlindungan terhadap pertahanan inang (kapsul, enzim ekstrasel) dan menyebabkan penyakit (toksisitas) seperti eksotoksin, endotoksin, enterotoksin. Toksisitas ini merupakan endotoksin, yaitu suatu toksin yang dihasilkan didalam organisme dan hanya dibebaskan bila organisme tersebut hancur. Salah satu antigen permukaan dari bakteri terdapat pada dinding sel dimana mengandung peptidoglikan merupakan tempat bekerjanya penisilin dan lisozim, membran luar yang berupa LPS (Lipopolisakarida), OMP (*Outer Membrane Protein*) dan lipoprotein.

Lipopolisakarida merupakan komponen struktur terluar dari dinding sel bakteri. Dinding sel bakteri terdiri dari lipopolisakarida (LPS), *Outer Membrane Protein* (OMP), pori protein (PP), lipoprotein (LP), ikatan protein, peptidoglikan

(PG). Lipopolisakarida merupakan bagian terbesar antigen permukaan pada banyak bakteri Gram negatif dan juga memainkan peran penting dalam menstabilkan membran luar, sebagai reseptor untuk berbagai bakteriofag serta LPS sangat imunogenik (Burgess, 1995).



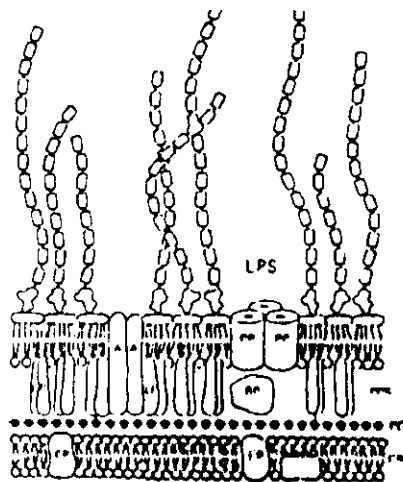
Gambar 2. Struktur Lipopolisakarida (Sumber: Hirst, 1995).

Menurut Burgess (1995), Lipopolisakarida merupakan imunostimulan yang dapat meningkatkan sel-sel pertahanan non spesifik dimana meningkatkan aktivitas makrofag (meningkatkan kekebalan non spesifik dalam kemampuannya untuk fagositosis), pelepasan sitokin seperti IL-1 dan IL-2 serta meningkatkan produksi sumsum tulang.

Protein Lipopolisakarida dari bakteri *Vibrio alginolyticus* dapat digunakan sebagai vaksin karena bersifat imunogen. Hermawan (2006), menjelaskan bahwa penggunaan Lipopolisakarida dapat meningkatkan titer antibodi dan sintasan ikan kerapu macan dari serangan bakteri *Vibrio alginolyticus* sampai 100%. Lebih lanjut Gonggrijp *et al.*, (1981) menjelaskan bahwa protein dari Lipopolisakarida dapat meningkatkan jumlah antibodi ikan salmon atlantik dari serangan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Steine *et al.*, (2001), menjelaskan bahwa pemberian vaksin Lipopolisakarida dari bakteri *Vibrio salmonicida* dapat meningkatkan

jumlah antibodi pada ikan Atlantik salmon (*Salmon salar* L.) dibandingkan ikan yang tidak divaksin dimana jumlah antibodinya lebih rendah.

Dinding sel bakteri Gram negatif mengandung tiga komponen khusus pada lapisan luar peptidoglikan yaitu lipoprotein, membran luar dan lipopolisakarida. Membran luar merupakan salah satu komponen dari dinding luar bakteri, membran luar berfungsi sebagai penghalang permeabilitas dan mempunyai karakteristik yang menarik. Permukaan dalam membran luar tersusun dari fosfolipid sama dengan fosfoliserida yang menyusun plasma membran (Baratawidjaja, 2000).



Gambar 3. Membran luar bakteri Gram-negatif (Sumber: Hirst, 1995).

Membran luar bakteri Gram-negatif terletak diatas lapisan tipis PG. Di samping mempunyai banyak kesamaan ciri dengan membran sel, terutama berupa dua lapis fosfolipid, membran luar bakteri juga mempunyai struktur lipopolisakarida unik (LPS), *Outer Membrane Protein* dan lipoprotein (LP). Membran luar mempunyai 3 fungsi utama:

1. Membentuk batas luar pada ruang periplasma, daerah antara kedua membran.
2. Memberikan permukaan bermuatan negatif terhadap lingkungan yang anti fagositik dan anti komplementer.
3. Merupakan penghalang permeabilitas terhadap substansi hidrofobik yang meliputi sejumlah bahan beracun, misalnya protein lisozime dan leukosit.

Membran luar juga memberi tempat protein, yaitu protein kanal yang bertanggung jawab terhadap lewatnya kelompok substansi tertentu (Burgess, 1995).

Protein membran luar atau *Outer Membrane Protein* dapat digunakan sebagai vaksin karena memiliki berat molekul lebih dari 5000 dalton dan bersifat imunogen. Lebih lanjut dijelaskan oleh Yanuhar *dkk* (2003) bahwa *Outer Membrane Protein* bersifat imunogen karena mempunyai berat molekul sampai 45000 dalton. Dewantoro (2006) menjelaskan bahwa *Outer Membrane Protein* dengan dosis 0,1 ml/ikan dari bakteri *Vibrio anguillarum* dapat meningkatkan titer antibodi dan sintasan ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*).

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 KERANGKA KONSEPTUAL

Salah satu jenis ikan kerapu yang mempunyai nilai ekonomis penting adalah ikan kerapu tikus dan banyak diminati oleh sebagian besar masyarakat dunia, karena selain dikonsumsi, ikan kerapu tikus muda juga dapat dijadikan ikan hias dalam akuarium. Permintaan pasar internasional yang meningkat, menarik minat petani untuk membudidayakan ikan kerapu tikus.

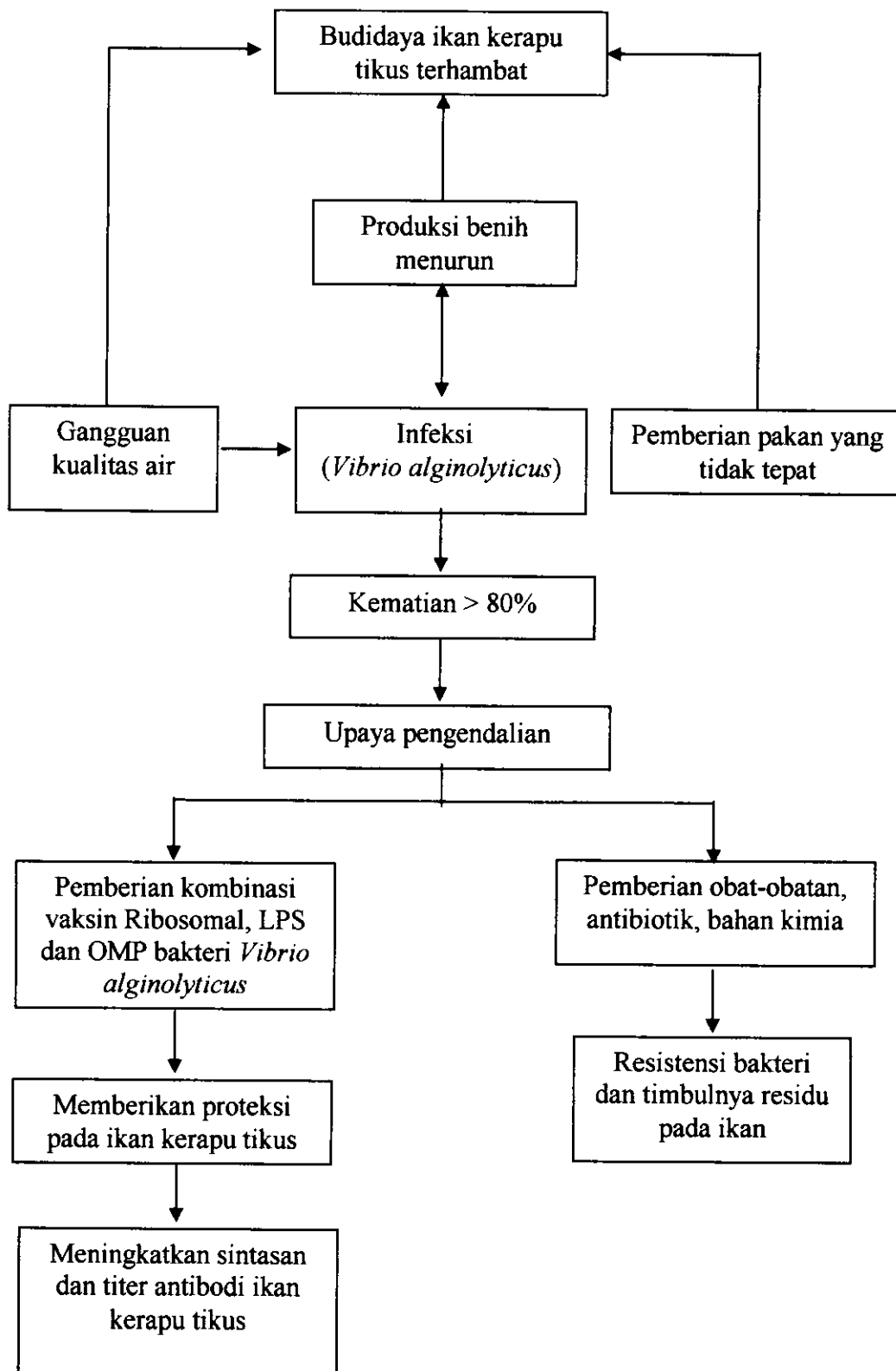
Kendala yang dihadapi dalam membudidayakan ikan kerapu tikus adalah ketersediaan benih. Selama ini benih didapat dari alam dan sangat tergantung pada cuaca, karena benih yang didapat dari panti pembenihan mempunyai SR (*Survival Rate*) yang rendah, hal ini disebabkan adanya serangan bakteri patogen, gangguan kualitas air dan pemberian pakan yang tidak tepat. Tingginya tingkat kematian pada stadia benih yang dibudidayakan di panti pembenihan mencapai 80% yang disebabkan oleh infeksi patogen yaitu dari genus *Vibrio* dan penyakit yang ditimbulkan dinamakan Vibriosis. Salah satu jenis *Vibrio* sp yang sering menginfeksi benih ikan kerapu tikus adalah bakteri *Vibrio alginolyticus*.

Beberapa usaha yang sering dilakukan adalah pengobatan dengan pemberian antibiotik dan bahan kimia, namun usaha tersebut kurang efektif karena akan menimbulkan resistensi pada bakteri dan timbulnya residu pada tubuh ikan yang dapat membahayakan manusia bila dikonsumsi. Metode yang efektif untuk pengendalian Vibriosis pada ikan kerapu yaitu dengan meningkatkan kekebalan tubuh ikan kerapu. Beberapa alternatif pengembangan vaksin, antara lain dengan

Ribosomal, Lipopolisakarida, *Outer Membrane Protein*, whole cell atau sel hidup yang telah diinaktifkan.

Penggunaan metode vaksinasi merupakan cara yang sangat efektif untuk mendapatkan kekebalan secara aktif, dimana antigen tersebut bersama dengan limfoid membentuk antibodi, sehingga dapat mencegah *mortalitas* ikan dari penyakit Vibriosis, baik dengan cara perendaman, penyemprotan, oral maupun dengan injeksi.

Penggunaan kombinasi vaksin Ribosomal dengan *Outer membrane Protein* dan kombinasi vaksin Ribosomal dengan Lipopolisakarida dari *Vibrio alginolyticus* diharapkan dapat meningkatkan sintasan dan titer antibodi benih ikan kerapu tikus. Bagan kerangka konseptual dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Bagan Kerangka Konseptual

BAB IV
METODOLOGI

BAB IV

METODOLOGI

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini di laksanakan pada tanggal 1 Agustus 2006 sampai dengan tanggal 31 Desember 2006, di Laboratorium Gastroenteritis Tropical Diseases Centre (TDC) Universitas Airlangga Surabaya, Laboratorium Pendidikan Perikanan Universitas Airlangga Surabaya.

4.2 Materi Penelitian

Materi penelitian ini meliputi alat dan bahan yang dibutuhkan selama penelitian ini meliputi:

4.2.1 Bahan penelitian

a. Ikan coba

Ikan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah benih ikan kerapu tikus, umur berkisar 2-3 bulan dengan panjang rata-rata 6-7 cm, berat badan rata-rata 10 g, sebanyak 60 ekor, yang diperoleh dari Balai Budidaya Air Payau Situbondo Jawa Timur.

b. Isolat Bakteri *Vibrio* sp

Isolat bakteri *Vibrio* sp yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah *Vibrio alginolyticus* yang diperoleh dari Balai Budidaya Air Payau Situbondo Jawa Timur. Hasil uji biokimia bakteri *Vibrio alginolyticus* tercantum pada Lampiran 1.

c. Media Kultur

Media kultur yang akan digunakan pada penelitian ini meliputi: BHI *Broth* (*Brain Heart Infusion*) mengandung 3% NaCl dan TCBSA

d. Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan antara lain *Phosphate Buffer Saline* (PBS), *Ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA), *aquadest*, Deoxyribonuclease I dan II, alkohol 70%, formalin 3%, SDS, MgCl₂, Larutan penyangga Elektroforesis.

4.2.2 Alat penelitian

Alat-alat yang digunakan selama penelitian antara lain: Akuarium, cawan petri, erlenmeyer, autoclave, sentrifuse, *freezer*, inkubator, spuit disposable 1 ml, *oven*, mikroskop, sonikator, *object glass*, *cover glass*, diluter, mikroplate dan mikropipet, tabung appendorf, vortex, alat elektroforesis, haematocrit, termometer, kertas lakmus, refraktometer

4.3 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif yang berfungsi untuk mendiskripsikan dan menggambarkan suatu keadaan, mengenai apa dan bagaimana, berapa banyak, sejauh mana variabel yang diteliti (menjelaskan dan menerangkan peristiwa) serta menyajikan fakta secara sistemik agar mudah untuk disimpulkan (Nazir, 1983).

4.4 Prosedur Penelitian

4.4.1 Persiapan air media pemeliharaan.

Akuarium yang akan digunakan berukuran 40 x 50 x 50 cm yang dicuci dengan air tawar kemudian di sterilkan terlebih dahulu dengan kaporit dosis 10 ppm (Subyakto dan Cahyaningsih, 2003) untuk menghilangkan kotoran, bakteri dan jamur yang menempel pada dinding akuarium, setelah itu dibilas dengan menggunakan air tawar sampai bersih. Akuarium di keringkan selama 24 jam agar bau kaporit hilang kemudian akuarium diisi air laut sebanyak 50 liter.

4.4.2 Persiapan ikan uji

Benih ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) sehat dan tidak terkontaminasi bakteri, virus dan parasit dipelihara dalam akuarium, setiap akuarium berisi 20 ekor benih ikan kerapu tikus. Sebelum diberi perlakuan, benih diaklimatisasikan terlebih dahulu selama satu minggu.

4.4.3 Pembuatan vaksin

a. Pembuatan Ribosomal vaccine

Ekstraksi Ribosomal dilakukan dengan metode Kusuda *et al.*, (1988), *Vibrio alginolyticus* dikultur pada Brain Heart Infusion Broth yang mengandung 2% NaCL pada suhu 25°C selama 24 jam, kemudian sel bakteri dikumpulkan dan dicuci dengan Phosphate Buffered Saline (PBS, 0,01 M pH 7,1) yang mengandung 2% NaCL. Bakteri yang telah dicuci kemudian diencerkan pada Phosphate Buffered (PB 0,01 M, pH 7,1) yang mengandung 0,01 M MgCL₂, 0,25 % Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 1µg ml⁻¹ deoxyribonuclease I dan 0,5 1µg ml⁻¹ deoxyribonuclease II kemudian dipecah dengan homogenizer 0,2 mm glass

beads. Bakteri yang telah pecah kemudian disentrifuse pada 27.000 x g selama 15 menit. Supernatan yang terbentuk disentrifuse pada 45.000 x g selama 15 menit dan 100.000 x g selama 3 jam. Endapan yang terbentuk dilarutkan pada PB yang mengandung 0,25% SDS dan 0,01 M MgCL₂ pada suhu kamar selama 1 jam kemudian disimpan 4°C selama semalam, kemudian lapisan dua pertiga atas dikumpulkan. Pellet yang didapat sebanyak 0,4360 g dilarutkan pada PBS sebanyak 5 ml dan dipakai sebagai Ribosomal Vaksin (RV). Konsentrasi protein Ribosomal sebesar 0,27276 mg/ml.

b. Pembuatan Lipopolisakarida (LPS)

Ekstraksi LPS dilakukan dengan metode *Hot phenol methods* (Westpal and Jann, 1965), sebagai berikut: Bakteri ditanam pada 20 ml *broth culture* selama 24 – 48 jam. Bakteri dipanen dengan sentrifugasi pada 6000 xg selama 10 menit dan dicuci dengan PBS selama 10 menit sebanyak 3 kali. Pellet yang didapatkan ditambah PBS dengan konsentrasi akhir 5 % dipanaskan dalam *waterbath* 68° C, tambahkan dengan larutan ekstraksi pada suhu 68° C dan diaduk pada suhu 68° selama 20 menit. Bakteri dipisahkan dengan sentrifugasi pada 3000 xg selama 5 menit. Supernatan yang didapatkan didialisis dengan *tap water* semalam dan di lyophiliz. Lyophilize crude LPS dicampur sampai homogen dengan larutan ekstraksi B selama 2 -5 menit dalam suhu kamar. Pisahkan chloroform dan petroleum dengan *rotary evaporator* dan presipitasi dengan *distilled water*. Kumpulkan presipitat yang didapatkan dengan sentrifugasi 100.000 xg selama 3 jam, pellet yang didapatkan dicuci dengan air kemudian di lyophilisasi. Pellet sebanyak 0,39008 g dilarutkan dalam PBS sebanyak 5 ml. Konsentrasi protein Lipopolisakarida sebesar 0,10259 mg/ml.

c. Pembuatan *Outer Membrane Protein*

Pembuatan *Outer Membrane Protein* menurut Suprpto *et al.*, (1996). Bakteri ditanam pada kultur BHI *broth* dan ditumbuhkan semalam, kemudian bakteri dipanen dengan sentrifugasi 6000 x g selama 10 menit, dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali selama 10 menit. Tambahkan pada pellet bakteri 2 ml dari 10 mM EDTA dan inkubasi selama 30 menit pada suhu 45°C. Sel bakteri dipecah dengan sonikasi selama 60 detik dan sel dipisahkan dengan sentrifugasi 6000 x g selama 30 menit. Supernatan sebanyak 0,5250 g kemudian ditambahkan dengan PBS sebanyak 5 ml. Konsentrasi protein *Outer Membrane Protein* sebesar 1,38613 mg/ml.

4.4.4 Cara pembuatan dosis vaksin

Dosis vaksin kombinasi yang diberikan pada benih ikan kerapu tikus sebanyak 0,1 ml/ikan. Dosis vaksin berdasarkan penelitian pendahuluan, lebih lanjut dapat dilihat pada Lampiran 2. Dosis ini terdiri dari 0,05 vaksin Ribosomal dan 0,05 Lipopolisakarida. 0,05 ml vaksin Ribosomal dan 0,05 ml *Outer Membrane Protein* dicampur kemudian diinjeksikan pada benih ikan kerapu tikus.

4.4.4 Tahap penelitian

Sebanyak 3 akuarium dengan volume air 50 liter air laut diisi dengan 20 ekor benih ikan kerapu tikus, diaklimatisasi selama satu minggu kemudian diberikan perlakuan sebagai berikut:

Perlakuan I (K1) : Vaksinasi dengan kombinasi vaksin Ribosomal dan Lipopolisakarida.

Perlakuan II (K2) : Vaksinasi dengan kombinasi vaksin Ribosomal dan *Outer Membrane Protein*

Perlakuan III (K3) : Tanpa vaksinasi (kontrol)

Pada hari ke-14 pada semua perlakuan diinjeksikan dengan bakteri *Vibrio alginolyticus* 0,1 ml/ikan dengan kepadatan bakteri 10^8 sel/ml. Dosis bakteri diberikan sebanyak 100 kali LD_{50} yaitu 10^8 , dosis LD_{50} berdasarkan hasil uji pendahuluan yang telah dilakukan. Dosis tersebut dapat membunuh sebanyak 50% benih ikan kerapu tikus dalam waktu 4 hari.. Hasil penghitungan LD_{50} tercantum pada Lampiran 3.

4.5 Parameter

Parameter yang akan diamati pada penelitian ini terdiri dari parameter utama dan parameter penunjang.

4.5.1 Parameter utama

Parameter utama yang akan diamati dalam penelitian ini adalah parameter kuantitatif, yaitu sintasan benih ikan kerapu tikus, *Relatif Presentase Survival* (RPS), titer antibodi.

a. Sintasan

Sintasan disebut juga tingkat kelangsungan hidup atau *Survival Rate* (SR) Penghitungan SR benih ikan kerapu tikus yaitu jumlah benih ikan kerapu tikus yang masih hidup setelah uji tantang. Sintasan biasanya dicantumkan dalam bentuk persentase (%), dihitung satu kali pada saat akhir penelitian. Zooneveld *et al*, (1991) merumuskan sintasan sebagai berikut :

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

b. *Relatif Presentase Survival (RPS)*

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. Varvarigos (2003) merumuskan RPS sebagai berikut :

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

c. *Titer Antibodi*

Pengukuran titer antibodi dilakukan pada saat sebelum vaksinasi, setelah vaksinasi dan setelah ujiantang. Hal ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh vaksinasi terhadap jumlah antibodi dalam serum benih ikan kerapu tikus. Pengukuran titer antibodi menggunakan uji aglutinasi yaitu mereaksikan antara antigen dengan serum (Tizard, 1988). Pengukuran titer antibodi dilakukan dengan metode “*Direct agglutination test*” menggunakan microplate.

Serum benih ikan kerapu tikus yang akan digunakan sebagai uji aglutinasi diperoleh dengan cara, darah diambil melalui jantung dengan *haematocrite*. Darah benih ikan kerapu tikus yang telah diperoleh ditampung dalam tabung *appendorf*. Darah yang terkumpul dalam tabung *appendorf* selanjutnya dilakukan sentrifuge selama 5 menit dengan kecepatan 5000 g, cairan dipermukaan berwarna bening adalah serum. Serum yang sudah terpisah dengan darah diambil secara hati-hati dengan menggunakan pipet. Sebagai antigen adalah bakteri *Vibrio alginolyticus*

yang telah dimatikan dengan formalin dan dicuci dengan Phosphat Buffer Saline (PBS).

Pengukuran titer antibodi dilakukan sebagai berikut : 0,025 ml dari 0,01 M PBS dimasukkan dalam setiap well. Diluter dipanaskan terlebih dahulu sampai merah menyala untuk mencegah kontaminasi, kemudian serum dimasukkan dan diencerkan mulai dari well pertama sampai well terakhir. Untuk satu tetes antigen dimasukkan dalam setiap well, kemudian dikocok selama 5 menit dan diinkubasikan pada suhu 37° C selama 2 jam. Mengenai kontrol dilakukan sama dengan diatas sedangkan serum yang digunakan diganti dengan PBS.

4.5.2 Parameter penunjang

Parameter penunjang yang akan diamati dalam penelitian ini meliputi antara lain: Kualitas air, kerusakan histopatologi dan pengamatan berat molekul vaksin.

a. Kualitas air

Pengukuran kualitas air menggunakan alat yaitu kertas lakmus untuk mengukur pH, Termometer untuk mengukur suhu, Refraktometer untuk mengukur salinitas dan DO meter untuk mengukur kandungan DO.

b. Histopatologi

Pengamatan histopatologi dilakukan dengan menggunakan metode Harris pewarnaan Hematoxylin eosin. Langkah kerja Histopatologi dapat dilihat pada Lampiran 4.

c. Pengamatan berat molekul vaksin

Karakteristik Protein Antigen dapat dilakukan dengan metode elektroforesis SDS-PAGE. Prosedur elektroforesis SDS - PAGE yang dilakukan

menggunakan metode Laemmli (1970) adalah 10 µl antigen Ribosomal, LPS , dan OMP ditambahkan buffer (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 yang mengandung 2,5% SDS, 10 % gliserol dan 5 % mercaptoetanol) dengan perbandingan 1 : 1, kemudian di vortex selama 5 detik. Setelah itu di panaskan pada air mendidih (suhu 100° C) selama 2 menit, kemudian di dinginkan. Elektroforesis dilakukan pada gel poliakrilamid 12 % dan di running pada voltase 220V selama 2 jam. Band protein yang didapat dilakukan dengan pewarnaan *Cromaste Brilliant blue* 0,1 % selama 8 jam, kemudian dilanjutkan dengan proses destaining dengan larutan methanol 50% , asam asetat glasial dalam aquades sampai latar belakang terlihat jernih. Hasil gel yang telah menunjukkan adanya band protein, selanjutnya disimpan dalam larutan gliserol 10% sebanyak 10 ml agar gel tidak rusak. Dokumentasi dilakukan dengan menggunakan peralatan scan yang dihubungkan dengan komputer. Penghitungan berat molekul dilakukan dengan membandingkan band protein yang dimaksud dengan standar Marker yaitu "*New England Bio Lab*". Skema kerja elektroforesis SDS-PAGE dapat dilihat pada Lampiran 5.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian

5.1.2 Sintasan (*Survival Rate*/SR)

Hasil penghitungan sintasan pada ikan kerapu tikus secara keseluruhan menunjukkan bahwa 11 ekor dari 15 ekor ikan kerapu tikus (26,67 %) yang dipelihara pada akuarium tanpa perlakuan (kontrol) terserang oleh bakteri *Vibrio alginolyticus*, sedangkan pada perlakuan I yaitu dengan pemberian kombinasi vaksin Ribosomal dan Lipopolisakarida (LPS) menunjukkan bahwa 3 ekor dari 15 ekor ikan kerapu tikus (80%) terserang oleh *Vibrio alginolyticus*, sedangkan pada perlakuan II yaitu pemberian kombinasi vaksin Ribosomal dan *Outer Membrane Protein* menunjukkan bahwa 2 ekor dari 15 ekor ikan kerapu tikus (86,87%) terserang *Vibrio alginolyticus*. Hasil penghitungan sintasan secara keseluruhan pada ikan kerapu tikus selengkapnya disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil penghitungan sintasan (SR) secara keseluruhan.

Perlakuan	Jumlah ikan	Jumlah ikan yang mati	Sintasan /SR (%)
Ribosomal-LPS	15	3	80
Ribosomal-OMP	15	2	86,67
Kontrol	15	11	26,67

5.1.2 Relatif Presentase Survival (RPS)

Setelah diketahui nilai sintasan (SR) maka dapat dihitung nilai RPS. Hasil penghitungan dari RPS dapat dilihat pada Tabel 2 sebagai berikut:

Tabel 2. Hasil penghitungan *Relatif Presentase Survival* (RPS).

Perlakuan	RPS (%)
Ribosomal-LPS	72,72
Ribosomal-OMP	81,82
Kontrol	0

Dari tabel diatas dapat dilihat bahwa nilai RPS pada ikan kerapu tikus yang divaksin dengan kombinasi Ribosomal dan LPS sebesar 72,72% dan kombinasi Ribosomal dan OMP sebesar 81,82%, hal ini berarti bahwa vaksin yang diberikan pada ikan kerapu tikus memberikan proteksi yang tinggi terhadap serangan bakteri *Vibrio alginolyticus*.

5.1.3 Titer antibodi

Hasil pengukuran titer antibodi pada masing-masing perlakuan dan kontrol dilakukan sebelum vaksinasi, sesudah vaksinasi dan setelah uji tantang dengan bakteri *Vibrio alginolyticus* dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil pengukuran titer antibodi ikan kerapu tikus.

Perlakuan	Sebelum vaksinasi	Sesudah vaksinasi (hari ke-10)	Sesudah uji tantang (hari ke-28)
Ribosomal-LPS	32	128	512
Ribosomal-OMP	32	512	1024
Kontrol	32	32	64

Hasil pengukuran titer antibodi pada pemberian kombinasi vaksin Ribosomal dan LPS bakteri *Vibrio alginolyticus* menunjukkan adanya peningkatan titer antibodi pada hari ke-10 sesudah vaksinasi yaitu sebesar 128 dan pada hari ke-14 sesudah uji tantang yaitu sebesar 512. Pada pemberian kombinasi

vaksin Ribosomal dan OMP menunjukkan adanya peningkatan titer antibodi pada hari ke-10 sesudah vaksinasi yaitu sebesar 512 dan pada hari ke-14 sesudah ujiantang yaitu sebesar 1024, sedangkan tanpa perlakuan (kontrol) titer antibodi sebesar 32 sesudah vaksinasi dan meningkat menjadi 64 setelah ujiantang.

5.1.4 Kualitas air

Hasil pengamatan kualitas air selama masa pemeliharaan dapat dilihat pada Tabel 4 sebagai berikut:

Tabel 4. Hasil pengukuran kualitas air selama masa pemeliharaan.

Hari	Parameter	Perlakuan			Normal
		K1	K2	K3	
1	Suhu (°C)	27	27,5	27	24 - 30
	pH	7,5	8	8	7,5 - 8
	Salinitas (ppt)	32	32	32,5	32 - 33
	DO (ppm)	6,5	6,5	6,6	6,1 - 6,7
7	Suhu (°C)	28	28	28	24 - 30
	pH	8	7,5	7,5	7,5 - 8
	Salinitas (ppt)	32	32,5	32,5	32 - 33
	DO (ppm)	6,5	6,7	6,6	6,1 - 6,7
14	Suhu (°C)	28	28,2	28,5	24 - 30
	pH	7,5	7,5	7,5	7,5 - 8
	Salinitas (ppt)	32,5	32,8	32,5	32 - 33
	DO (ppm)	6,1	6,6	6,5	6,1 - 6,7
28	Suhu (°C)	27	27,5	27	24 - 30
	pH	8	7,5	8	7,5 - 8
	Salinitas (ppt)	32	32,5	32	32 - 33
	DO (ppm)	6,1	6,7	6,5	6,1 - 6,7

Keterangan : K1 : Kombinasi vaksin ribosomal dan lipopolisakarida
 K2 : Kombinasi vaksin ribosomal dan *Outer Membrane Protein*
 K3 : Tanpa vaksinasi (kontrol)
 Data kualitas air normal menurut Murtidjo (2002)

Dapat dilihat bahwa selama masa pemeliharaan kualitas air masih dalam kondisi yang normal. Suhu air pada media pemeliharaan berkisar antara 28-30°C, pH antara 7,5-8, salinitas 32-33 dan DO antara 6,1-6,7.

5.1.5 Histopatologi insang

Histopatologi dari insang diambil setelah ujiantang dari ikan yang mengalami kerusakan insang akibat terserang *Vibrio alginolyticus*. Histopatologi dapat digunakan untuk mendeteksi organ target spesifik, sel dan organel serta bermanfaat untuk membedakan luka yang disebabkan oleh bakteri dengan struktur normal organ target (Murdjani, 2002). Hasil pemeriksaan histopatologi insang dapat dilihat pada Gambar 6 dan 7 berikut ini.



Gambar 6. Histopatologi Insang normal ikan kerapu tikus dengan pewarnaan Hematoxylin eosin pembesaran 400x

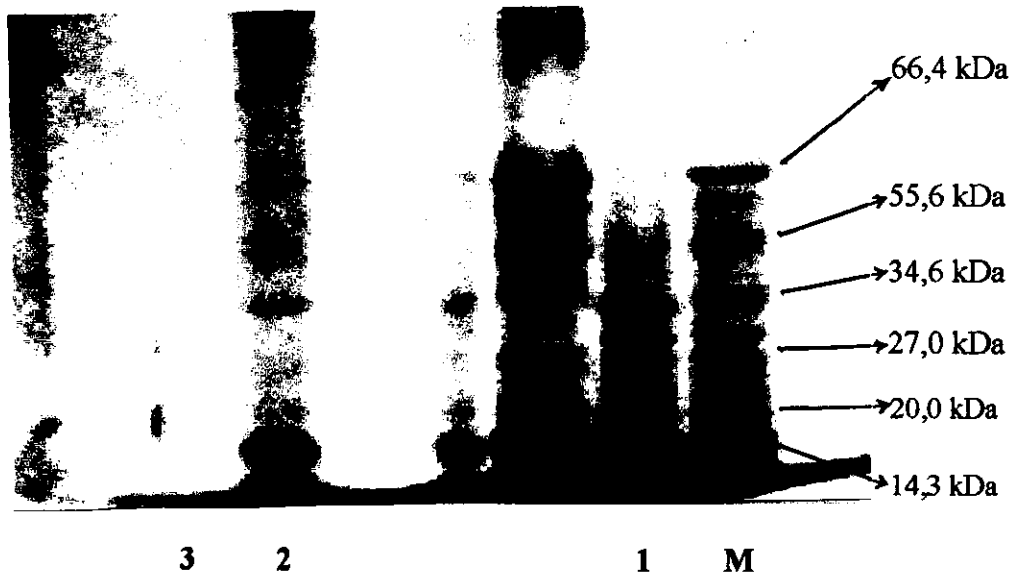


Gambar 7. Kerusakan histopatologi Insang kerapu tikus yang terserang *Vibrio alginolyticus* dengan pewarnaan Hematoxylin eosin pembesaran 400x.

Keterangan: —————> Distal hiperplasia

5.1.6 Pengamatan berat molekul protein (Elektroforesis)

Elektroforesis sering digunakan untuk karakterisasi protein berdasarkan berat molekulnya. Salah satu metode elektroforesis yang sering digunakan yaitu *sodium polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Hasil elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 8 berikut ini.



Gambar 8. Hasil pemeriksaan SDS-PAGE

Keterangan :

- M. Marker
- 1. Ribosom
- 2. LPS
- 3. OMP

5.2 Pembahasan

5.2.1 Sintasan (*Survival Rate/SR*)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sintasan (SR) ikan kerapu tikus pada kelompok K3 (kontrol) yang diuji tantang dengan *Vibrio alginolyticus* dengan dosis 0,1 ml/ikan menunjukkan bahwa terjadi kematian sampai 73,33%. Pada ikan

kerapu tikus yang divaksin dengan kombinasi vaksin Ribosomal dan Lipopolisakarida menunjukkan bahwa kematian hanya sekitar 20% dan sintasannya sebesar 80%. Ikan kerapu tikus yang divaksin dengan kombinasi vaksin Ribosomal dan *Outer Membrane Protein* menunjukkan bahwa kematian yang terjadi hanya sekitar 13,33% dan sintasannya sebesar 86,67%. Hal ini didukung oleh Dewantoro (2006) yang menyatakan bahwa penggunaan vaksin *Outer Membrane Protein* dari bakteri *Vibrio anguillarum* memberikan sintasan tertinggi yaitu 90 % bila dibandingkan dengan kontrol (tanpa vaksin) yaitu 30 %. Tingginya sintasan ini berarti bahwa vaksin dari *Outer Membrane Protein* dari bakteri *Vibrio anguillarum* dapat menekan *mortalitas* ikan kerapu macan. Hermawan (2006) juga menyatakan bahwa pemberian vaksin Lipopolisakarida (LPS) dari bakteri *Vibrio alginolyticus* dapat meningkatkan sintasan sampai 100% bila dibandingkan dengan kontrol (40%). Vaksinasi dengan Ribosomal dapat meningkatkan sintasan sampai 80% pada ikan kerapu tikus. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian vaksin memberikan proteksi sampai 100% terhadap benih ikan kerapu tikus, ikan yang divaksin mempunyai nilai SR yang lebih tinggi dibanding ikan yang tidak divaksin (kontrol). Hasil penelitian penggunaan vaksin terhadap ikan kerapu tikus menunjukkan hasil yang positif dalam mencegah *mortalitas* ikan dari penyakit Vibriosis baik dengan cara perendaman, penyuntikan, maupun secara oral atau lewat pakan.

Berdasarkan hasil penghitungan *Relatif Presentase Survival* (RPS) diatas didapatkan bahwa perlakuan dengan pemberian kombinasi vaksin Ribosomal dan *Outer Membrane Protein* sebesar 81,82% sedangkan untuk pemberian kombinasi vaksin Ribosomal dan Lipopolisakarida sebesar 72,72%, hal ini berarti bahwa

pemberian kombinasi vaksin Ribosomal, *Outer Membrane Protein* dapat menekan angka kematian pada benih ikan kerapu tikus. Varvarigos (2003) menyatakan bahwa nilai RPS yang lebih dari 70% berarti bahwa vaksin yang diberikan tersebut mempunyai nilai ekonomis dan dapat diaplikasikan di lapangan.

Titer antibodi adalah pengenceran tertinggi yang menunjukkan aglutinasi atau presipitasi. Untuk menentukan titer antibodi, dibuat pengenceran serial serum dan selanjutnya ditambahkan sejumlah antigen yang konstan dan campuran larutan tersebut diinkubasikan dan diperiksa untuk aglutinasi atau presipitasi (Baratawidjaja,2000).

Hasil penelitian menunjukkan terjadi peningkatan titer antibodi pada ikan kerapu tikus yang divaksin dengan kombinasi vaksin Ribosomal dan Lipopolisakarida bakteri *Vibrio alginolyticus* yaitu sebelum vaksinasi sebesar 32 dan meningkat pada hari ke-10 sebesar 128 dan hari ke-28 sebesar 512. Sedangkan dengan kombinasi vaksin Ribosomal dan *Outer Membrane Protein* menunjukkan peningkatan titer antibodi yaitu sebesar 512 pada hari ke-10 dan 1024 pada hari ke-28. Pada perlakuan yang tidak divaksin titer antibodi awal sebesar 32, kemungkinan merupakan imunitas bawaan dari induknya yang pernah divaksin sebelumnya atau ikan tersebut sudah pernah terserang bakteri sejenis yang mempunyai serotipe yang sama. Menurut Ellis (1988), sistem pertahanan humoral kemungkinan dapat diturunkan dari induk keanakan ikan, beberapa *C-Reactive Protein* dan lektin pada ovarium ikan, bahkan dalam ovarium beberapa jenis ikan ditemukan imunoglobulin. Hasil pengukuran titer antibodi pada hari ke-28 dapat diketahui bahwa ikan uji yang divaksinasi menunjukkan tingkat titer antibodi yang tinggi dibandingkan ikan uji yang tidak divaksin.

Tingginya titer antibodi yang tercapai karena vaksinasi terkontrol, baik dosis yang diberikan, kualitas air dan kecukupan umur ikan untuk merespon antigen yang masuk sehingga merangsang terbentuknya antibodi.

Produksi antibodi dipengaruhi oleh tingkat stress ikan yang divaksin, ikan yang stress produksi antibodinya cenderung akan menurun karena pada kondisi stress ikan akan mengeluarkan kortisol yang dapat menghambat kerja limfosit untuk menghasilkan antibodi. Pembentukan antibodi juga tergantung pada kualitas air. Antibodi dapat ditemukan di serum, tissue fluid dan mucus (Hernayanti *dkk*, 2000).

Kerusakan Histopatologi dari hasil penelitian menunjukkan kerusakan pada organ insang ikan kerapu tikus yang mati setelah dilakukan uji tantang dengan bakteri *Vibrio alginolyticus*. Dari gambar 6 diatas dapat dilihat bahwa insang mengalami kerusakan distal hiperplasia yang merupakan penebalan jaringan epitelium pada ujung lamella yang menyebabkan menjadi seperti gada. Pada ikan kerapu tikus yang diperlakukan dengan injeksi *Vibrio alginolyticus* terjadi perubahan seperti pembengkakan pembuluh darah pada lamella sekunder. Lebih lanjut dijelaskan oleh Murdjani (2002), bahwa pada ikan kerapu tikus yang diperlakukan dengan injeksi bakteri *Vibrio alginolyticus* terjadi perubahan seperti pembengkakan pembuluh darah pada lamella sekunder, hyperplasia pada beberapa sel epitel dan nekrosis pada sel-sel epitel atau sel basal. Akibat adanya kerusakan tersebut, maka organ insang tidak berfungsi dalam proses respirasi. Lapisan epitel insang yang tipis untuk mempermudah pertukaran gas, namun hal inipun menjadikan insang sangat rawan terhadap invasi dari hama-hama penyakit.

Kerusakan struktur insang yang ringan sekalipun dapat sangat mengganggu pengaturan osmose dan kesulitan bernafas (Nabib, 1989).

Hasil elektroforesis-SDS PAGE menunjukkan berat molekul protein antigen yang dominan pada kisaran 14,3 kDa sampai 34,6 kDa untuk Ribosomal, sedangkan untuk Lipopolisakarida pada kisaran 14,3 sampai 27,0 kDa. Ketebalan pita yang terwarnai pada gel merupakan gambaran ekspresi suatu protein oleh gen penyandi protein tersebut, semakin tebal pita protein yang terlihat maka semakin banyak ekspresi gen penyandi protein (Nafsiyah, 2005).

Adapun hasil dari elektroforesis SDS PAGE untuk *Outer Membrane Protein* yang tidak keluar hasilnya disebabkan oleh kebersihan isolat yang mengakibatkan didapatkan protein spesifik rendah dan tidak sesuai dengan protein yang dihasilkan. Kusnoto (2003) mengemukakan bahwa faktor yang mempengaruhi keberhasilan SDS-PAGE adalah kemurnian isolat, kebersihan isolat dan konsentrasi protein dalam ekstrak. Isolat yang murni akan menghasilkan pita protein yang baik, tidak terdapat pita protein yang menggelembung sehingga dapat mempermudah analisa massa molekul relatif (MR) pada pita protein yang terbentuk. Keberhasilan isolat mempengaruhi kualitas pita protein yang terbentuk dalam gel, pita terlihat tajam dengan gel yang terang sehingga mempengaruhi analisis protein. Konsentrasi protein ekstrak mempengaruhi kualitas pita protein yang terbentuk pada proses analisis maupun karakterisasi protein juga kecepatan pembentukan pita protein

Dilihat dari hasil kualitas airnya maka kualitas air pada akuarium perlakuan K1, K2 dan K3 menunjukkan bahwa kualitas air masih dalam kondisi normal untuk kelangsungan hidup ikan kerapu tikus, sehingga kematian yang terjadi pada

benih ikan kerapu tikus disebabkan oleh infeksi dari bakteri *Vibrio alginolyticus*. Kualitas air merupakan faktor yang harus diperhatikan dalam pemeliharaan ikan. Beberapa parameter yang diamati selama penelitian yaitu suhu, oksigen terlarut (DO), derajat keasaman (pH), salinitas.

Kisaran suhu pada media pemeliharaan ikan kerapu tikus selama penelitian antara 28-30 °C. Kondisi ini berada dalam kisaran hidup yang dibutuhkan ikan kerapu tikus. Menurut Murtidjo (2002), suhu yang cocok untuk pertumbuhan ikan kerapu tikus antara 24-31°C. Dalam kaitannya dengan reaksi kekebalan terhadap *Vibrio*. Ellis (1998), menyatakan bahwa lamanya reaksi kekebalan tubuh hewan *poikiloterm* sangat dipengaruhi oleh temperatur lingkungan. Semakin rendah temperatur akan memperpanjang waktu dari reaksi kekebalan tubuhnya. Pada temperatur sangat rendah, 4°C atau kurang, sistem imun tidak akan memberi respon.

Salinitas air selama penelitian antara 32-33 ppt yang mana masih dalam kondisi normal untuk pertumbuhan ikan kerapu tikus sedangkan kandungan oksigen terlarut (DO) dalam air selama penelitian yaitu 6,1-6,7. Kelarutan oksigen dipengaruhi oleh salinitas dan temperatur air. Kelarutan oksigen didalam air menurun seiring dengan meningkatnya suhu dan salinitas. Menurut Kordi (2001), kandungan oksigen terlarut yang cocok untuk budidaya ikan kerapu tikus yaitu minimal 3 ppm.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dan pembahasan diatas dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Kombinasi vaksin Ribosomal dan Lipopolisakarida dengan dosis 0,1 ml/ikan dapat memberikan proteksi pada benih ikan kerapu tikus, sehingga sintasan (SR) sebesar 80% dan titer antibodi menjadi 512.
2. Kombinasi vaksin Ribosomal dan *Outer Membrane Protein* dengan dosis 0,1 ml/ikan dapat memberikan proteksi pada benih ikan kerapu tikus, sehingga sintasan (SR) sebesar 86,67% dan titer antibodi menjadi 1024.

6.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efektifitas dari kombinasi vaksin Ribosomal, Lipopolisakarida (LPS) dan *Outer Membrane Protein* di lapangan atau panti pembenihan.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut cara pemberian vaksin secara oral atau melalui pakan.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, S., dan Sudaryanto. 2000. *Pembenihan dan Pembesaran Kerapu Bebek*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Astuti, S.M. Retna, H. Coco, K. 2000. *Rekayasa Teknologi Aplikasi Vaksin Immunostimulan Pada Komoditi Air Payau*. Balai Besar Budidaya Air Payau. Jepara. Hal 11.
- Austin and D.A. Austin, 1987. *Bacterial Fish Pathogen Disease of Farmed and Will*. Praxis Publising. London.
- Baratawidjaja. 2000. *Imunologi Dasar Edisi 4*. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- . 2006. *Imunologi Dasar Edisi 7*. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Bellanti, J.A.1993. *Imunologi III*. Diterjemahkan oleh A.S. Wahab. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons. 1974. *Bergey's Manual for Determinative Bacteriology*. Eight Edition. Williams and Wilkins. Baltimore.
- Burgess, G.W. 1995. *Teknologi ELISA dalam Diagnosa dan Penelitian*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Dewantoro, A. 2006. *Respon Imun Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) terhadap Komponen Intraselular dan Protein Membran Luar bakteri *Vibrio anguillarum**. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Program Studi Budidaya Perairan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Effendy, M.I., 1997. *Biologi Perikanan*. Yayasan Pustaka Nusantara. Yogyakarta.
- Ellis, E.A. 1988. *Optimizing Factor for Fish Vaccination in Fish Vaccination*. Academic Press Ltd. 71 Pp.
- Frerichs, G.N. and S.D. Millar. 1993. *Manual for the Isolation and Identification of Fish Bacterial Pathogen*. Pisces Press. Strirling.
- Gonggrijp, R., Mat, P.W.V., Paul, J.M.R., Van Boven. 1981. *Evidence for the Presence of Lipopolysaccharide in a Ribonuclease-Sensitive Ribosomal Vaccine of *Pseudomonas aeruginosa**. *Infection and Immunity*. 31.896-905p.
- Gufron dan Kordi, 2001. *Usaha Pembesaran Kerapu di Tambak*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.

- Heemstra, P. C and J.E, Randal, 1993. Grouper of the World. FAO Species Catalogue. Rome.
- Hermawan, T. 2006. Pemberian Whole Cell Vaccine (WCV) dan Lipopolisakarida (LPS) untuk Meningkatkan Titer Antibodi dan Kelangsungan Hidup Ikan kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) terhadap *Vibrio alginolyticus*. Skripsi. Fakultas Kadokteran Hewan. Program Studi Budidaya Perairan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Hernayanti. Agus, I dan Elin, H. 2000. Respon Imun Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) terhadap Vaksin "Whole Cell" *Aeromonas hydrophila* yang Diberikan Secara Rendaman Dengan Dosis Yang berbeda. Jurnal Penelitian Universitas Jenderal Soedirman. Purwokerto.
- Hirst. 1995. Teknologi ELISA dalam Diagnosa dan Penelitian. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Istiqomah, I. Triyanto. Isnansetyo, A. Kamiso, H.N dan M. Murdjani. 2004. Patogenitas *Vibrio fluvialis* yang Diisolasi dari Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*). Jurnal perikanan Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Kabata, Z. 1985. Parasites and Diseases of Fish Cultured Tropis. Taylor and Francis LTD. London.
- Kamiso, H.N. 1996. Vibriosis Pada Ikan dan Alternatif Cara Penanggulangannya. Jurnal Perikanan UGM (1).
- _____. 2004. Status Penyakit Ikan dan Pengendaliannya di Indonesia. Prosiding Seminar Nasional Penyakit Ikan dan Udang IV. Universitas Jenderal Sudirman. Purwokerto.
- Kimball, J.W., 1983. Biologi Edisi Kelima Jilid I. Erlangga. Jakarta.
- Kordi, H.G.M., 2001. Pembesaran Kerapu Bebek Di Karamba Jaring Apung. Kanisius. Yogyakarta.
- Kusuda, R.,Ninimiya, M., Hamaguchi, M. And Maraoka, M. 1988. Efficacy of Ribosomal vaccine prepared from *Pasteurella piscicida* againt Pseudotuberculosis in cultured Yellow tail. Fish Pathology. 23, 191-196.
- Kusnoto. 2003. Isolasi dan Karakteristik Protein Immunogenik Larva Stadium II *Toxocara cati* Isolat Lokal. Tesis. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Protein During Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227.
- Lehninger, A.L. 1982. Dasar-dasar Biokimia Jilid 1. Diterjemahkan oleh Maggy Thenawijaya. Penerbit Erlangga. Jakarta.

- Liebermen, M.M., Donna, C.M. and Gwendolyn, L.W. 1978. Passive Immunization Against *Pseudomonas* with a Ribosomal Vaccine-Induced Immune Serum and Immunoglobulin Fractions. *Infection and Immunity*. 23. 509-521p.
- Maftuch. Uun, Y. Satuman. Sukoso. Sumarno. 2001. Karakteristik Pili *Vibrio alginolyticus* dan *Vibrio parahaemolyticus* sebagai faktor virulensi bakteri patogen. Makalah Seminar Nasional Penyakit Ikan dan Udang IV. Purwokerto. 18-19 Mei 2004. Hal 128-135.
- Merchant and Parker. 1971. *Veterinary Bacteriology and Virology*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Murdjani. 2002. Identifikasi dan Patologi Bakteri *Vibrio alginolyticus* Pada Ikan Kerapu Tikus. Disertasi. Program Pasca Sarjana. Universitas Brawijaya. Malang.
- Murtidjo, B.A., 2002. *Budidaya Kerapu dalam Tambak*. Kanisius. Yogyakarta.
- Nabib, R. 1989. *Bahan Pengajaran Patologi dan Penyakit Ikan*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat Atar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Nafsiyah, U.E. 2005. Analisis Protein Intestine Cacing *Toxocara cati* Dewasa dengan Teknik SDS-PAGE. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Nazir, M. 1988. *Metode Penelitian*. Ghalia Indonesia. Jakarta.
- Rantam, F.A. 2003. *Metode Immunologi*. Airlangga University Press. Surabaya. 174 hal
- Reed, L.J. and H. Muench. 1938. A Simple Methods of Estimating Fifty Percent Endpoint. *The American Journal of Hygiene*.
- Rukyani A., 1993. Penanggulangan Penyakit Udang Windu (*Penaeus monodon*) dalam Prosiding Seminar Hasil Penelitian Budidaya Pantai. Maros. 16-19 Juli 1993.
- Seng, L.T. 1994. *Parasities and Disease of Culture Marine Finfish In South East Asia*. Pusat Pengkajian Sains Kajihayat. University Sains. Malaysia.
- Smith, P.D. 1982. Vaccination Against Vibriosis. In Ellis, A.E. (Eds). *Fish Vaccination*. Academic Press Ltd. London.

- Steine, N.O., Geir. O.M., and Heidrun, L.W. 2001. Antibodies against *Vibrio salmonicida* Lipopolysaccharide (LPS) and Whole Bacteria in Sera from Atlantic Salmon (*Salmon salar* L.) vaccinated during the smolting and early post-smolt period. *Fish and Shellfish Immunology*. 11. 39-52p.
- Subyakto, S. dan S. Cahyaningsih. 2003. *Pembenihan Kerapu Skala Rumah Tangga*. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Sudjiharno. 2001. *Pembenihan Ikan Kerapu Bebek (Cromileptes altivelis)*. Balai Budidaya Laut. Lampung.
- Sunyoto, P.1994. *Pembesaran Kerapu dengan Karamba Jaring Apung*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Sunyoto, P. dan Mustamal, 2002. *Pembenihan Ikan Laut Ekonomis Kerapu Kakap Baronang*. Penerbit Swadaya. Jakarta.
- Suprpto, H., Dadik, R., Yudi, C., Petrus, W., Henock, W. 2002. *Pembuatan Vaksin Polyvalent dan Monovalent Bakteri Vibrio spp untuk Mencegah Vibriosis pada Penaeus monodon dan Beberapa Ikan Ekonomis Penting Lain*. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Surabaya.
- Suryo. 1984. *Genetika Strata I*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Sujudi. 1994. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi Revisi. Binarupa Aksara. Jakarta. 61 hal.
- Tampubolon, G.H. dan E. Mulyadi. 1989. *Synopsis Ikan Kerapu di Perairan Indonesia*. Balitbangkan. Semarang.
- Tizard, I. 1988. *Pengantar Imunologi Veteriner*. Diterjemahkan oleh Soehardjo Hardjosworo. Airlangga University Press. Surabaya.
- Triastuti, G. Yani, L.N dan Ari, P.W. 2003. *Jenis Bakteri Pada Pemeliharaan Kerapu Tikus (Cromileptes altivelis)*. Warta Balai Budidaya Air Payau Situbondo. Situbondo.
- Triyanto, Kamiso, H. N., dan Isnansetyo, A. 1996. *Pengaruh Vaksinasi Induk Lele Dumbo (Clarias gariepinus) terhadap Kelulushidupan, pertumbuhan benih dan produksi ikan*. *Jurnal Perikanan Universitas Gadjah Mada* I (1): 42-48
- Varvarigos, P. 2003. *Immersion Or Injection? Practical Considerations of Vaccination Strategies*. 28 Mei 2005.
- Volk, W.A. and M.F. Wheeler. 1993. *Mikrobiologi Dasar*. Edisi Lima. Penerbit Erlangga. Jakarta.

- Westphal, O. and Jann, K. 1965. Bacterial Lipopolysaccharides: Extraction with Phenol-Water and Further Applications of the Procedure. *Methods in Carbohydrate Chemistry* 5, 83-96.
- Yanuhar, U. Sumarno dan Maftuch. 2003. Karakteristik Pili dan Membran Luar Protein (OMP) bakteri *Vibrio alginolyticus* (Studi Awal untuk Vibriosis pada Ikan Kerapu). *Jurnal Penelitian Universitas Brawijaya* 6 (II). Malang. Hal 10-15.
- Zonneveld, N.E.A Huisman dan J.H. Boon. 1991. Prinsip-Prinsip Budidaya Ikan. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Uji Biokimia Bakteri *Vibrio alginolyticus*

Karakterisasi	Hasil
Warna koloni (TCBSA)	Kuning
Bentuk sel	Batang
Gram	-
Katalase	+
Oksidase	+
Motilitas	+
Sensitivitas dari :	
0/129	S
Novobiocin	S
O/F Test	F
Reduksi Indol	+

Keterangan:

- = Negatif

+ = Positif

S = Sensitif

F = Fermentatif

Lampiran 2. Dosis vaksin yang digunakan pada penelitian pendahuluan

Dosis vaksin (ml)	Kombinasi vaksin Ribosomal dan LPS	Kombinasi vaksin Ribosomal dan OMP	<i>Vibrio alginolyticus</i> Mortalitas (mati/tes)
0,05	0,025	0,025	4/10
0,075	0,0375	0,0375	3/10
0,1	0,05	0,05	1/10

Lampiran 3. Hasil Penghitungan LD₅₀

Penghitungan nilai LD₅₀ menggunakan rumus menurut Reed *and* Muench (1938).

Kepadatan bakteri	Σ mortalitas	%mortalitas
10 ⁷	8/8	100 %
10 ⁶	5/8	62,5 %
10 ⁵	3/8	37,5 %
10 ⁴	2/8	25 %

% Positif yang terinfeksi pada pengenceran > 50% - 50%

$$PD = \frac{\% \text{ Positif yang terinfeksi pada pengenceran } > 50\% - 50\%}{\% \text{ Positif yang terinfeksi pada pengenceran } > 50\% - \% \text{ positif yang terinfeksi dibawah } 50\%}$$

$$= \frac{62,5 - 50}{62,5 - 37,5}$$

$$= \frac{12,5}{25}$$

$$= 0,5$$

$$LD_{50} = 10^{6-0,5}$$

$$= 10^{5,5} \text{ CFU/ml}$$

Dosis bakteri yang di berikan sebanyak 100 kali LD₅₀ yaitu $10^{5,5} \times 10^2$

Jadi uji tantang dilakukan dengan kepadatan bakteri 10⁸

Lampiran 4. Langkah pembuatan preparat histopatologi.

Prosedur pembuatan preparat histopatologi adalah sebagai berikut:

1. Fiksasi dan pencucian. Tujuannya adalah untuk mempertahankan struktur dan komponen sel.

Cara kerja: Ikan yang telah terinfeksi diseksio, organ diambil dan dimasukkan dalam formalin sekurang-kurangnya 24 jam, kemudian insang dipotong membujur dengan ketebalan 0,5 cm setelah dilakukan pencucian dengan air mengalir selama 30 detik.

2. Dehidrasi dan *clearing*. Tujuannya adalah agar air dalam jaringan dapat ditarik, dibersihkan dan dijernihkan.

Cara kerja: Organ yang dicuci dengan air dimasukkan dalam reagen dengan urutan alkohol 70%, 80%, 90%, 96%, alkohol absolut I, alkohol absolut II, masing-masing 30 menit.

3. Infiltrasi. Tujuannya adalah jaringan diinfiltrasi dengan parafin, ruang antar dan dalam sel dapat ditembus oleh parafin sehingga jaringan lebih tahan pada waktu dipotong.

Cara kerja: Potongan insang dimasukkan dalam parafin I yang masih cair, dimasukkan dalam oven pada suhu 60°C selama 30 menit, kemudian dipindahkan ke parafin II yang masih cair, setelah itu dimasukkan dalam oven dengan suhu 60°C selama 30 menit.

4. Pembuatan blok parafin. Tujuannya adalah karingan mudah dipotong.

Cara kerja: Disiapkan beberapa cetakan besi yang telah diolesi dengan gliserin supaya nanti parafin tidak melekat pada besi cetakan. Besi cetakan

diisi dengan parafin cair dan kemudian insang dimasukkan dalam cetakan hingga parafin jadi beku atau keras.

5. Pengirisan dengan mikrotom. Tujuannya adalah jaringan dapat dipotong setipis mungkin supaya mudah dilihat dibawah mikroskop.

Cara kerja: Blok parafin diiris dengan mikrotom dengan ketebalan 4-7 mikron, jaringan dicelupkan kedalam air hangat dengan suhu 42-45°C sampai jaringan mengembang dengan baik, albumin telur dioleskan pada gelas obyek, jaringan diletakkan pada gelas obyek, kemudian jaringan dikeringkan diatas hot plate.

6. Pewarnaan. Tujuannya adalah perubahan pada jaringan lebih mudah dilihat. Sediaan insang diwarnai dengan metode Harris dengan pewarnaan Hematoxylin Eosin, sehingga dapat dilihat dengan jelas bentuk masing-masing selnya.

Cara kerja: Jaringan yang telah dikeringkan, dimasukkan kedalam Xylol I selama 3 menit, jaringan dimasukkan dalam Xylol II selama 1 menit, jaringan dimasukkan berturut-turut alkohol absolut I, alkohol absolut II, alkohol 96%, 90%, 80%, 70%, dan air kran selama 1 menit. Kemudian jaringan dimasukkan kedalam zat warna Harris selama 5-10 menit, diletakkan dalam air kran selama 5 menit, dicelupkan kedalam alkohol asam sebanyak 3-10x celupan, jaringan dicelupkan kedalam air kran sebanyak 4x celupan, jaringan dicelupkan kedalam amoniak sebanyak 4x celupan, kemudian jaringan dimasukkan kedalam air kran selama 10 menit, jaringan dimasukkan kedalam aquades selama 5 menit, dimasukkan berturut-turut kedalam alkohol 70%, 80%, 90%, 96%, alkohol absolut I, alkohol absolut II, masing-masing selama 0,5 menit.

Kemudian dimasukkan kedalam Xylol I dan II masing-masing selama 2 menit dan sisa-sisa pewarnaan dibersihkan dengan air.

7. **Mounting** adalah penutupan dengan gelas obyek dengan gelas penutup yang sebelumnya telah ditetesi dengan kanada balsam.
8. Pemeriksaan mikroskop dengan pembesaran 100x dan 400x.

Lampiran 5. Skema Kerja Elektroforesis SDS-PAGE