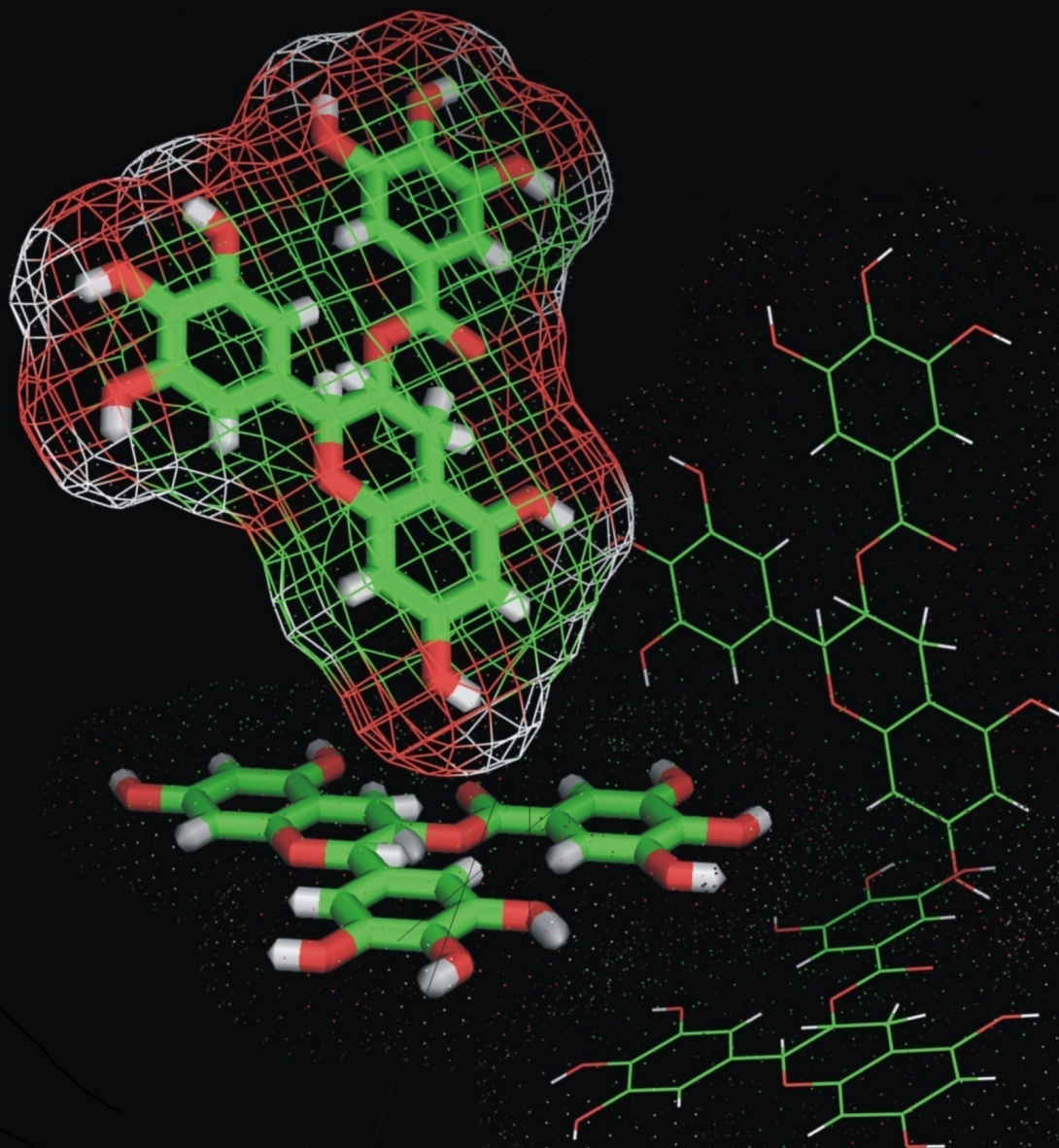


The Journal of Experimental Life Science

Discovering Living System Concept through Nano, Molecular and Cellular Biology



J. Exp. Life. Sci.	Vol. 2	No. 1	pages. 1-55	June 2012
--------------------	--------	-------	-------------	-----------

Published by
Graduate Program, University of Brawijaya
in Cooperation With
Masyarakat Nano Indonesia (MNI)

The Journal of **Experimental** Life Science

Discovering Living System Concept through Nano, Molecular and Cellular Biology

Editorial Board

Chief Editor

Dr. Ir. M. Sasmito Djati, MS.

Editorial Team

Aida Sartimbul, M.Sc. Ph.D - UB
Adi Santoso, M.Sc. Ph.D - LIPI
Nurul Taufiq, M.Sc. Ph.D - BPPT
Arifin Nur Sugiharto, M.Sc. Ph.D -UB

Sukoso, Prof. MSc. Ph.D-UB
Etik Mardiyati, Dr. - BPPT
Soemarno, Ir., MS., Dr., Prof. - UB
Dr. Bagyo Yanuwadi

Reviewer

Ahmad Faried, MD. Ph.D – UNPAD
Trinil Susilawati, Ir., MS., Dr., Prof. - UB
Muhaimin Rifai, Ph.D - UB
Rer.nat. Ronny Martien, Dr. – UGM
Moch. Ali, Dr. - UNRAM
Widodo, S.Si., M.Si., Ph.D MED Sc - UB
Irwandi Jaswir, Prof. – UII Malaysia
Sarjono, Dr. - ITB
Muhammad Askari, Dr. – UTM Malaysia
Sutiman Bambang S., Dr., Prof. - UB
Moh. Aris Widodo, Sp.FK., Ph.D., Prof. - UB
Yanti, Dr. – UNIKA ATMAJAYA

Brian Yulianto, Dr. - ITB
Bambang Prijambudi, Dr. - ITB
Arief Boediono, drh., PhD., Prof. - IPB
M. Yedi Sumaryadi, Ir., Dr., Prof. - UNSOED
Wasmen Manalu, Dr., Prof. - IPB
Moch. Syamsul Arifin Zein, Ir., M.Si. - LIPI
Gono Semiadi, Ir. MSc. PhD. - LIPI
Yaya Rukayadi, MS., Dr. – Yonsei University Seoul
Muhaimin Rifa'i, Ph.D - UB
Widjiati, drh.,MS.,Dr. – UNAIR
Amin Setyo Leksono, S.Si.,M.Si.,Ph.D - UB

Editor Pelaksana

Afidatul Muji Astuti, S.Si.

Illustrator

M. Qomaruddin, S.Si.

Address

The Journal of Experimental Life Science
Building E, 2nd Floor, Graduate Program, University of Brawijaya
Jl. Mayor Jenderal Haryono 169, Malang, 65145
Telp: (0341) 571260 ; Fax: (0341) 580801
Email: jels@ub.ac.id
Web: <http://www.jels.ub.ac.id>

Table of Content

Aktivitas Antibakteri Ekstrak Teripang <i>Holothuria</i> sp Terhadap Bakteri <i>Vibrio harveyi</i> Secara <i>In vitro</i> (Siti Roihanah, Sukoso Sukoso, S. Andayani)	1-5
DOI: http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2012.002.01.01	
Kajian Penggunaan Ciprofloxacin terhadap Histologi Insang dan Hati Ikan Botia (<i>Botia macracanthus</i>, Bleeker) yang Diinfeksi Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i> (Sukarni Sukarni, Maftuch Maftuch, Happy Nursyam)	6-12
DOI: http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2012.002.01.02	
Isolasi dan Karakterisasi Protein 100kDa dari Membran Kepala Spermatozoa Kambing (Bayyinatul Muchtaromah, Sutiman Bambang Sumitro, Soemarno Soemarno, Trinil Susilawati)	13-19
DOI: http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2012.002.01.03	
Diatomae <i>Chaetoceros ceratosporum</i> dalam Formula Pakan Meningkatkan Respon Imun Seluler Udang Windu (<i>Penaeus monodon</i> Fab.) (Arning Wilujeng Ekawati, Happy Nursyam, Edi Widjayanto, Marsoedi Marsoedi)	20-28
DOI: http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2012.002.01.04	
Regenerasi Kalus Berfilamen Rumput Laut <i>Kappaphycus alvarezii</i> Pada berbagai Perbandingan Zat Pengatur Tumbuh Auksin (Indole Acetic Acid) dan Sitokinin (Kinetin, Zeatin) (Sri Redjeki Hesti Mulyaningrum, Andi Parenrengi, Yenny Risjani, Happy Nursyam)	29-35
DOI: http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2012.002.01.05	
Histologi Organ Hepatopankreas Kepiting Bakau (<i>Scylla serata</i>) pada Konsentrasi Sublethal Fenol sebagai Peringatan Dini (<i>Early warning</i>) Toksisitas Fenol di Estuaria (Alfi Hermawati, Yenny Risjani, Agung Pramana Warih Mahendra)	36-41
DOI: http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2012.002.01.06	
Penampilan Kandungan Protein Dan Kadar Lemak Susu Pada Sapi Perah Mastitis Friesian Holstein (Puguh Suryowardojo)	42-48
DOI: http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2012.002.01.07	
Analisis Titer Antibodi Bovine Zona Pellusida 3 (Anti-bZP3) Hasil Induksi Bovine Zona Pellusida 3 (bZP3) pada Kera (<i>Macaca fascicularis</i>) (Maris Kurniawati, Sutiman Bambang Sumitro, Aulanni'am Aulanni'am)	49-55
DOI: http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2012.002.01.08	

Aktivitas Antibakteri Ekstrak Teripang *Holothuria* sp. Terhadap Bakteri *Vibrio harveyi* Secara *In vitro*

Roihanah S., Sukoso, Andayani S.

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang

Abstrak

Bakteri adalah salah satu penyebab penyakit pada makhluk hidup yang mematikan. Salah satu alternatif yang dapat dilakukan untuk mengatasi masalah tersebut adalah dengan menggunakan Teripang (*Holothuria* sp.) yang memiliki kandungan bioaktif sebagai bahan antibakteri. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak Teripang terhadap *Vibrio harveyi*, mempelajari karakter dan struktur bakteri yang dihambat oleh ekstrak bioaktif Teripang dan mempelajari komponen bioaktif yang terkandung dalam Teripang. Hasil uji cakram menunjukkan rerata zona hambat sebesar 8.502 mm sedangkan hasil uji MIC dan MBC menunjukkan bahwa pada dosis 0,55 mg.ml⁻¹ mampu menghambat (Bakteriostatik) dan dosis 0,60 mg.ml⁻¹ mampu membunuh (bakterisidal). Ekstrak kasar Teripang berpengaruh terhadap karakter dan struktur bakteri *Vibrio harveyi* yaitu dengan merusak dinding sel dan membran sel bakteri. Hasil analisis Spektrofometri Infra Merah dari ekstrak teripang dan Ultra Violet dengan pelarut *n*-heksan serapan diduga mengandung senyawa Triterpenoid.

Kata kunci: Aktivitas Antibakteri, Teripang, *Vibrio harveyi*

Abstract

*Bacteria are one potential deadly cause of disease in organism. One alternative to overcome these problems is to use sea cucumbers (*Holothuria* sp.) which contain bioactive as antibacteria. Aim of this study was to determine the antibacterial activity of sea cucumber's extracts against *Vibrio harveyi*, studying the character and bacterial structure which is inhibited by the bioactive extract of sea cucumbers and assess the bioactive components contained in the sea cucumber. The test results show mean zone of inhibition discs of 8,502 mm while the MIC and MBC test results show doses of 0,55 mg.ml⁻¹ is inhibit (bacteriostatic) and 0,60 mg.ml⁻¹ dose capable of killing (bactericidal). Crude extract of sea cucumbers effect on the character and structure of the bacterium *V. harveyi* – by destroying the cell walls and cell membranes of bacteria. Results of analysis of sea cucumbers' extract Spektrofometry on Infra Red and Ultra Violet with *n*-hexane uptake solvent is assumed to contain Triterpenoid compounds.*

Key words: Antibacterial Activity, Sea Cucumber, *Vibrio harveyi*

PENDAHULUAN

Sumber daya alami lautan merupakan sumber daya yang belum dikembangkan secara maksimal, padahal berbagai bahan bioaktif yang terkandung dalam biota perairan laut seperti protein, omega-3, vitamin dan hormon sangat bermanfaat bagi kesehatan, terutama sangat berpotensi bagi penyediaan bahan baku untuk industri farmasi dan kosmetik [1]. Salah satu biota laut Indonesia yang berpotensi sebagai sumber daya alam penyedia bahan baku untuk industri farmasi adalah Teripang (*Holothuria* sp.).

Teripang digunakan sebagai sumber obat tradisional. Menurut kepercayaan masyarakat pesisir, cairan selom Teripang digunakan ketika

nelayan terluka agar lukanya cepat sembuh di daerah Langkawi. Obat ini disebut "gamat" yang berasal dari beberapa jenis mentimun laut yang digunakan, terutama *Holothuria scabra*, *Stichopus hermannii* dan *Stichopus horrens*.

Teripang mengandung bahan aktif antibakteri, antifungi (antijamur), antitumor dan antikoagulan (antipenggumpal) [2]. Penelitian Zancan dan Mourao [3] telah menunjukkan bahwa selain penyembuhan luka, ekstrak Teripang mengandung senyawa antikoagulan dan antithrombosis. Teripang juga mengandung senyawa yang dapat mereduksi kolesterol dan lipid, antikanker dan senyawa antitumor [4], serta senyawa antibakteri [5]. Seorang peneliti Rusia menunjukkan bahwa cucumarioside berasal dari spesies *Cucumaria japonica* memiliki sifat imunomodulator yang kuat, menunjukkan efektivitas yang tinggi terhadap *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Neisseria meningitidis* BT-2, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium*

* Alamat korespondensi: S. Roihanah

Email : Roihanah@ub.ac.id

Alamat : Program Studi Pascasarjana S2 Biomedik
Universitas Brawijaya

dan *Pertusis meningoencephalitis* [6]. Menurut Han et al. [7] senyawa yang biasa terkandung dalam Teripang adalah *Triterpeneglycoside*. Senyawa *triterpeneglycoside* yang terdapat dalam Teripang ternyata bermanfaat sebagai anti tumor, anti jamur, anti bakteri dan anti virus.

Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk:

1. Mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak Teripang (*Holothuria* sp.) terhadap *Vibrio harveyi*
2. Mempelajari karakter dan struktur bakteri yang dihambat oleh ekstrak bioaktif Teripang (*Holothuria* sp.)
3. Mempelajari komponen bioaktif yang terkandung dalam Teripang

MATERI DAN METODE PENELITIAN

Materi Penelitian

Bahan utama yang digunakan adalah Teripang (*Holothuria* sp.) yang diperoleh dari perairan Socah, Kabupaten Bangkalan, Jawa Timur. Biakan murni bakteri *Vibrio harveyi* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.

Metode Penelitian

Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi (perendaman) dengan lima pelarut yang berbeda dari yang bersifat polar hingga non polar, yaitu air, methanol, etanol, kloroform dan heksan. Ekstraksi dilakukan dengan merendam masing-masing 500 gr Teripang segar dengan 500 ml pelarut, selama 3 kali 24 jam. Selanjutnya dilakukan penyaringan dan pemekatan untuk tahap ekstraksi yang terakhir, yaitu dengan pelarut etanol dan methanol yang dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* vakum. Pelarut non polar heksana dan kloroform dipekatkan dengan cara ditiup dengan gas N_2 , sedangkan ekstrak air dipekatkan dengan cara stirer, karena air jika menggunakan *rotary evaporator* tidak dapat menguap.

Uji Cakram (Metode difusi)

Uji cakram, yaitu pengujian antimikroba dengan mengukur diameter daerah hambatan yang terjadi di sekitar kertas cakram yang sudah mengandung bahan antimikroba dan dibandingkan dengan antibiotik kanamycin. Lempeng *Trypton Soya Agar* (TSA) ditandai dengan nama, tanggal dan mikroorganisme yang akan diuji. Kapas lidi (*cotton*

swab) steril dicelupkan dalam suspensi biakan uji, dengan OD: $0,1 \text{ CFU.ml}^{-1}$, kemudian kapas lidi diputar pada dinding tabung (diperas) agar cairan tidak menetes dari bagian kapas tersebut. Mikroorganisme kemudian disebar pada seluruh permukaan lempeng agar dengan cara dioleskan. Untuk mendapatkan pertumbuhan yang merata, kapas lidi dioleskan secara mendatar, kemudian lempeng agar diputar 90° dan dibuat olesan kedua, dengan lempeng agar diputar 45° dan dibuat olesan ketiga. Lempeng agar dibiarkan mengering kurang lebih 5 menit, kemudian tempatkan kertas cakram yang sudah direndam dengan sampel yang diujikan pada permukaan lempeng agar.

Dalam 1 lempeng agar dapat digunakan 5-6 macam dosis perlakuan jarak antara kertas cakram harus cukup luas sehingga wilayah jernih tidak saling berhimpitan yang nantinya akan menyulitkan dalam proses pengukuran zona hambatan. Kertas cakram ditekan dengan pinset, tidak perlu terlalu keras karena akan merusak permukaan agar. Lempeng yang sudah ditempelkan kertas cakram diinkubasi pada suhu tumbuh optimal dari bakteri patogen yang sedang diujikan. Setelah bakteri uji sudah tumbuh merata dan terlihat adanya zona jernih di permukaan agar, maka luas zona jernih dapat diukur dengan mengukur diameternya.

Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bacterial Concentration* (MBC)

Tabung reaksi steril disiapkan sebanyak 24 buah dan telah diberi label konsentrasi. Dibuat konsentrasi bahan uji sesuai dengan tabel preparasi, masing-masing 1 ml. Dimasukkan 1 ml suspensi bakteri 10^6 CFU.ml^{-1} ke dalam masing-masing tabung reaksi dan vortex hingga homogen. Semua tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Setelah 18-24 jam, diamati dan dicatat derajat kekeruhan pada semua tabung.

Selain itu dicatat nilai MIC yang merupakan konsentrasi terendah dari tabung yang tidak menunjukkan adanya kekeruhan. Untuk mengetahui nilai MBC, dilakukan *streak* pada medium TSA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah koloni yang tumbuh pada media agar dengan *colony counter*. Dari hasil perhitungan koloni tersebut dapat ditentukan MIC dan MBC dari ekstrak kasar bahan antibakteri tersebut.

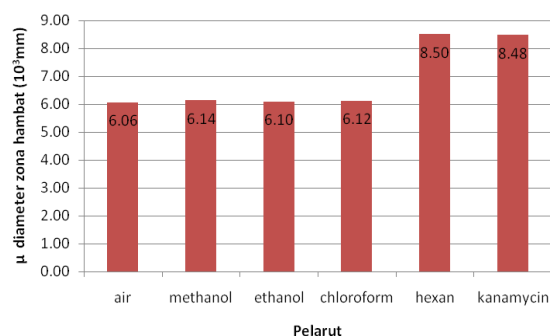
Pengamatan dengan Mikroskop Elektron (SEM)

Sebelum pengamatan mikroskopis SEM dilakukan pewarnaan gram. Sediaan dibuat di atas *cover glass* dan dikeringkan pada suhu kamar, jika

sudah kering difiksasi dengan cara dipanaskan diatas nyala api 3-4 kali lalu dibiarkan dingin. Setelah dingin diletakan di atas rak pewarnaan. Dituangkan larutan kristal violet di atas sediaan, diamkan selama 1 menit. Sediaan dibilas dengan air, kemudian dituangi larutan Lugol dan didiamkan 1 menit dan dibilas dengan air. Sediaan dilunturkan dengan Alkohol 96% hingga warna violet memudar dan dibilas dengan air. Kemudian sediaan dituangi larutan safranin, didiamkan 30 detik, dibilas dengan air, dikering anginkan. Setelah sediaan kering dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop SEM.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Diameter zona hambat dari ekstrak teripang dengan pelarut air dengan rerata sebesar 6.062 mm, methanol 6.142 mm, etanol 6.096 mm, cloroform 6.122 mm dan n-heksan 8.502 mm (Gambar 1). Pelarut n-heksan adalah yang paling efektif menghambat bakteri. Hal ini disebabkan bioaktif yang terdapat pada teripang berfungsi sebagai bahan antibakteri dan tidak bisa terlarut pada pelarut yang bersifat polar. Menurut Kimball [8], senyawa antibakteri (Triterpenoid) larut dalam pelarut non polar. Martoyo [9] juga menyatakan bahwa Teripang dari Famili Holothuriidae genus *Holothuria*, *Actinopyga* dan *Stichopus* banyak mengandung zat-zat ekstraktif seperti senyawa Terpenoid, yang hasil hidrolisisnya mudah larut dalam pelarut organik (seperti Cloroform, eter dan n-heksan) dan tidak larut dalam air [10].



Gambar 1. Diameter daerah hambat ekstrak Teripang terhadap *Vibrio harveyi*

Zona jernih pada lapisan agar yang terbentuk karena senyawa antibakteri berdifusi ke dalam lapisan tersebut dan menghambat pertumbuhan bakteri, sedangkan lapisan agar yang ditumbuhi mikroorganisme akan tampak keruh [11]. Kanamycin sebagai antibakteri kontrol dapat menghambat seluruh bakteri uji. Kanamycin dengan konsentrasi 0,2 mg.ml⁻¹ dengan daya

penghambatan rata-rata 8,482 mm (Gambar 1). Ekstrak Teripang menunjukkan aktivitas yang lebih tinggi daripada Kanamycin. Hal ini dikarenakan *Vibrio harveyi* merupakan bakteri Gram Negatif yang memiliki *Bacteriocins-Like Inhibitor Substances* (BLIS), yaitu "harveyicin SY" dengan berat molekul 24 kDA yang berfungsi menghalangi substansi asing dari organisme lain dalam satu strain, antar spesies atau dari lingkungan masuk ke sel [12].

Uji MIC dan MBC

Pengujian MIC terhadap bakteri *Vibrio harveyi* pada konsentrasi 0,55 mg.ml⁻¹ sudah terlihat sedikit jernih, yang menandakan bahwa pertumbuhan bakteri dapat dihambat oleh ekstrak Teripang (bakteriostatik) dengan total bakteri sebesar 8,7.10¹ CFU.plate⁻¹ dan pada konsentrasi 0,60 mg.ml⁻¹ baru dapat terlihat jernih, menandakan bahwa pertumbuhan bakteri telah dapat dihentikan oleh ekstrak Teripang (bakterisidal). Menurut Pelczar dan Chan [13], antibakteri bersifat bakteriostatik atau bakterisida bergantung dari konsentrasinya. Ekstrak kasar bersifat bakterisidal karena ekstrak mampu membunuh bakteri dan bakteristatis karena ekstrak kasar hanya mampu menghambat pertumbuhan bakteri.

Edberg [14] menjelaskan bahwa senyawa antibakteri bekerja dengan cara berinteraksi dengan dinding sel bakteri sehingga mengakibatkan permeabilitas pada sel bakteri dan juga berdifusi ke dalam sel sehingga mengakibatkan pertumbuhan bakteri terhambat (bakteriostatik) dan atau mati (bakteriosidal). Selain itu senyawa antibakteri juga dapat menembus membran dan berinteraksi dengan material genetik sehingga bakteri mengalami mutasi.

Golongan bakteriostatik bekerja dengan jalan menghambat sintesis protein pada ribosom bakteri melalui proses difusi pasif melalui kanal hidrofilik dan sistem transportasi aktif. Setelah antibakteri masuk ke dalam ribosom, maka akan berikatan dengan ribosom dan menghalangi masuknya kompleks tRNA-asam amino pada lokasi asam amino, sehingga bakteri tidak dapat berkembang biak [8].

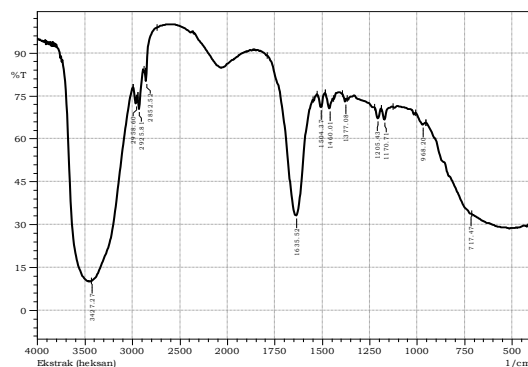
Karakter dan Struktur Bakteri yang Terhambat

Hasil penelitian ekstrak dari pelarut n-heksan diduga mengandung senyawa Triterpenoid. Efek penghambatan yang terjadi pada koloni bakteri *Vibrio harveyi* disebabkan oleh kandungan senyawa aktif Teripang, yang salah satunya adalah

Triterpenoid. Secara umum golongan Triterpenoid mampu merusak membran sel, mengnon-aktifkan enzim dan mendenaturasi protein sehingga dinding sel mengalami kerusakan akibat penurunan permeabilitas. Perubahan permeabilitas membran sitoplasma memungkinkan ion-ion organik yang penting masuk ke dalam sel sehingga berakibat terhambatnya pertumbuhan bahkan hingga mematikan sel.

Hasil Pengujian Spektrofotometri Inframerah

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak Teripang (*Holothuria* sp.) dengan menggunakan alat FT-IR = 8400 S Shimadzu dapat terdeteksi sebanyak 12 peak dan hasil identifikasinya dapat dilihat pada Gambar 2 berikut :



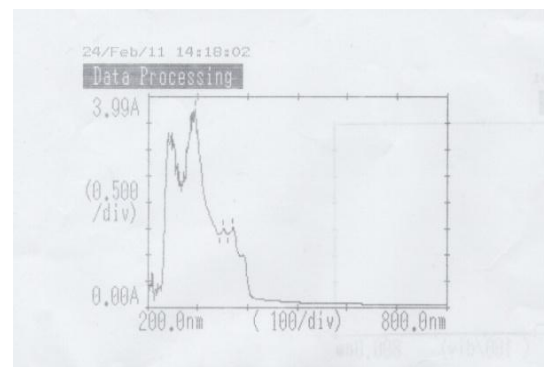
Gambar 2. Spektrofotometri Inframerah dari ekstrak n-heksan

Berdasarkan data yang muncul pada Gambar 2 menunjukkan adanya serapan pada daerah bilangan gelombang (cm^{-1}) 2958,60; 2925,81; 2852,52 yang diduga serapan dari gugus CH_2 . Pita serapan yang tajam pada daerah gelombang (cm^{-1}) 1635,52 dengan intensitas kuat mengidentifikasi gugus karbonil ($\text{C}=\text{O}$) yang pita serapannya diperkuat oleh pita serapan pada bilangan gelombang (cm^{-1}) 1205,43 ; 1170,71. Pita serapan pada bilangan gelombang 1377,08 cm^{-1} menunjukkan serapan oleh gugus CH_3 . Pita serapan pada daerah gelombang 3427,27 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus Karboksilat. Pita serapan tersebut diperkuat oleh serapan pada daerah gelombang 1635 cm^{-1} dengan adanya gugus $\text{C}=\text{O}$.

Hasil Pengujian Spektrofotometri Ultra Violet

Hasil analisis ekstrak teripang dengan pelarut *n*-heksan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis memberikan tiga puncak serapan. Spektrum spektrofotometri UV-Vis dari ekstrak *n*-heksan ditunjukkan pada Gambar 3. Munculnya

serapan maksimum pada panjang gelombang 241,0 nm diduga diakibatkan oleh adanya transisi elektron dari $\pi - \pi^*$ yang disebabkan oleh adanya suatu kromofor $\text{C}=\text{O}$. Hal ini didukung dari hasil analisis spektrofotometri inframerah yang menunjukkan isolat mempunyai gugus pada panjang gelombang 1635,52 nm. Serapan Ultra Violet yang landai pada panjang gelombang 352 nm dan 371 nm kemungkinan diakibatkan oleh terjadinya transisi elektron dari $n - \pi^*$ dari ikatan rangkap $\text{C}=\text{O}$ [15]. Pengujian dengan Spektrofotometri Ultra Violet menunjukkan ekstrak *n*-heksan mengandung senyawa Triterpenoid.



Gambar 3. Spektrum spektrofotometri UV-Vis dari ekstrak n-heksan

Kesimpulan

1. Ekstrak kasar Teripang (*Holothuria* sp.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Vibrio harveyi*
2. Ekstrak kasar teripang berpengaruh terhadap karakter dan struktur bakteri *Vibrio harveyi* yaitu dengan merusak dinding sel dan membran sel bakteri
3. Hasil analisis Spektrofotometri Infra Merah dan Spektrofotometri Ultra Violet dengan pelarut *n*-heksan serapan dari ekstrak Teripang diduga mengandung senyawa Triterpenoid.

Saran

Disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut secara *In-Vivo* dan melakukan purifikasi pada ekstrak kasar teripang.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Rosmiati dan Suryati, 2001. Isolasi identifikasi dan pengaruh senyawa bioaktif spons *Callyspongia pseudoreticulata* terhadap bakteri patogen dari udang. *Jurnal Bioteknologi Pertanian*, 6 (1).
- [2] Farrouk Abd Hamid Ghous and B.H. Ridzwan. 2007. New species isolated from Malaysian

- Sea Cucumber with optimized secreted antibacterial activity, *American J. of Biochem. and Biotech.*, 3(2): 60-65.
- [3] Zancan, P. and P.A. Mourao, 2004. Venous and arterial thrombosis in rat models: dissociation of the antithrombotic effects of glycosaminoglycans. *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 15: 45-54.
- [4] Hatakeyama, T., N. Matsuo, K. Shiba, S. Nishinohara, N. Yamasaki, H. Sugawara and H. Aoyagi. 2002. Amino acid sequence and carbohydrate-binding analysis of the N-acetyl-D-galactosamine-specific C-type lectin, CEL-I, from the Holothuroidea, *Cucumaria echinata*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66: 157-163.
- [5] Afiyatullo, S. S., A. I. Kalinovsky, T. A. Kuznetsova, V. V. Isakov, M. V. Pivkin, P. S. Dmitrenok and G. B. Elyakov, 2002. New diterpene glycosides of the fungus *Acremonium striatisporum* isolated from a sea cucumber. *J Nat. Prod.*, 65: 641-4.
- [6] Sedov, A. M., I. B. Shepeleva, N. S. Zakharova, O. G. Sakandelidze and V. V. Sergeev. 1984. Effect of Cucumarioside (a triterpene glycoside from the Holothurian *Cucumaria japonica*) on the development of an immune response in mice to corpuscular pertussis vaccine. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, 9: 100-104.
- [7] Han Hua, Yi Yang-hua, Li Ling, Liu Bao-shu, La Ming-ping, Zhang Hong-wei. 2009. Antifungal active triterpene glycosides from sea cucumber *Holothuria scabra*. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 44 (6): 620-624.
- [8] Kimball, John W.. 2008. Bacteria, Kimball's Biology Pages. Creative Commons Attribution 3.0 Unported (CC BY 3.0) and The Saylor Foundation. <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/E/Eubacteria.html>.
- [9] Martoyo, J., N. Aji, dan T. Winanto, 2006, Budidaya Teripang, Cet. 6, edisi revisi, Penebar Swadaya, Jakarta.
- [10] Trease, G. E., W. C. Evans. 1983. Drugs of Biological Origin. In: Pharmacognosy 12th Ed. United Kingdom: Balliere Tindall, 309-540.
- [11] Zweig, G. and J.R. Whitaker, 1971. Paper Chromatography and Electrophoresis. Academic Press. London, 397-400.
- [12] Prasad, S., P. C. Morris, R. Hansen, P. G. Meaden and B. Austin. 2005. A novel bacteriocin-like substance (BLIS) from a pathogenic strain of *Vibrio harveyi*. *Microbiology*, 151 (9): 3051-3058.
- [13] Pelczar, M. J dan E.C.S. dan Chan. 1988. Dasar-Dasar Mikrobiologi Jilid 2. Alih Bahasa R.S. Hadioetomo, T. Imas, S.S. Tjitrosomo dan S.L. Angka. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta. 88 hal.
- [14] Edberg, S. C. 1983. Tes kerentanan antimikroba. Dalam Antibiotika dan Infeksi. Alih bahasa: Chandra Sanusi. CV. EGC. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. 219 hal.
- [15] Sastrohamidjojo, H. 1985, Spektroskopi, Liberty, Yogyakarta.

Kajian Penggunaan Ciprofloxacin terhadap Histologi Insang dan Hati Ikan Botia (*Botia macracanthus*, Bleeker) yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*

Sukarni^{1*}, Maftuch², Happy Nursyam²

¹ Stasiun Karantina Ikan Sulthan Thaha Jambi

² Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya

Abstrak

Aeromonas hydrophila mampu menyebabkan terjadinya infeksi dan kematian ikan botia dalam waktu yang relatif singkat pada konsentrasi yang tinggi, terbukti dengan konsentrasi 10^8 sel/ml¹ menyebabkan 50% ikan uji mati. Hasil pengamatan histopatologi pada ikan terinfeksi menunjukkan ginjal yang mengalami degenerasi *hyaline*, munculnya vakuola yang disebabkan lisis pada glomerulus dan kemudian hancur, nekrosis pada glomerulus, terdapat banyak koloni bakteri *A. hydrophila* di dalam ginjal, serta terjadi infiltrasi limfosit. Sel hati tidak terlihat jelas karena tertutup infiltrasi limfosit dan koloni bakteri *A. hydrophila* yang sangat banyak, nekrosis yang menyebabkan vakuola, terdapat infeksi sekunder bakteri yang belum teridentifikasi, serta terjadi *cloudy swelling*. Pada bagian insang, nekrosis lamela primer menyebabkan munculnya vakuola, kongesti pada lamela primer dan edema pada lamela sekunder, infiltrasi limfosit, proliferasi sel/fusi lamela serta hiperplasia pada lamela primer. Sementara itu pada ikan botia yang terinfeksi *A. hydrophila* tetapi kemudian diobati, ginjal mengalami perbaikan glomerulus dan kapsula bowman sehingga terlihat jelas, tubuli berbentuk seperti donat dengan corak titik dan garis, tidak ada lagi nekrosis dan vakuola, tidak ditemukan lagi koloni bakteri, terjadi perbaikan *hyaline* yang mengalami degenerasi, jaringan *hematopoietic* (pembentuk sel-sel darah merah) terlihat jelas dengan inti yang bulat. Pada bagian hati, tidak ditemukan lagi koloni bakteri *A. hydrophila* dan bakteri sekunder lainnya sehingga hepatosit terlihat jelas dengan bentuk polyhedral dengan inti 1-2, jumlah eritrosit terlihat normal, karena tidak ada lagi infiltrasi limfosit. Akan tetapi masih terdapat penyumbatan pada vena centralis yang dipenuhi oleh eritrosit. Pada insang tidak ada lagi nekrosis dan vakuola pada lamela primer sehingga jaringan terlihat solid, namun ditemukan infeksi sekunder parasit *Monogenea* sp. Tidak ada lagi infiltrasi limfosit, lapisan epitelium terlihat 1-2 lapis, tidak ada lagi edema dan fusi lamela sehingga lamela tampak jelas dengan ukuran panjang yang bervariasi.

Kata Kunci : histopatologi, *Aeromonas hydrophila*, Ikan Botia

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang mempunyai sumber daya alam yang melimpah. Salah satu diantaranya adalah sumber daya perairan, baik tawar, laut maupun payau yang menunjang pembangunan perikanan sehingga dapat meningkatkan devisa negara melalui ekspor non migas. Pemanfaatan sumberdaya perikanan di Indonesia sudah mengarah ke perikanan budidaya dimana input teknologi dimasukan untuk mencapai hasil yang maksimal. Dampak dari adanya input tersebut adanya ketidakseimbangan ekosistem budidaya yang berakibat pada timbulnya penyakit pada komoditas yang dipelihara [1]. Peningkatan usaha budidaya menyebabkan adanya arus

perpindahan produk tersebut sehingga akan mengakibatkan perpindahan hama dan penyakit ikan dan tersebar ke daerah lain yang dapat menimbulkan kerugian yang sangat besar [2].

Di Indonesia *A. hydrophila* merupakan pathogen yang masuk dalam daftar Hama dan Penyakit Ikan [2,3,4]. Sampai sekarang ini, upaya penanggulangan *A. hydrophila* belum ditemukan. Pengobatan yang selama ini digunakan adalah menggunakan antibakteri yang berasal dari tanaman obat [5]. Mengingat bahwa komposisi kandungan dari tanaman obat yang kompleks dan hanya bahan aktifnya saja yang bisa digunakan, sehingga sulit menentukan dosis yang tepat.

Penanggulangan dengan modifikasi lingkungan untuk penyakit infeksi kurang cepat dalam proses penyembuhannya, mengingat perkembangan penyakit yang disebabkan *A. hydrophila* sangat cepat menyebar [6]. Demikian pula penanggulangan dengan penggunaan probiotik (secara biologis) menggunakan bakteri

* Alamat korespondensi:

Sukarni

Alamat : Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,
Universitas Brawijaya, Jl. Veteran, Malang, 65145

lain yang bersifat senergis/ antagonis terhadap *A. hydrophila* juga sangat lambat. Maka dari itu digunakan antibiotik yang efektif untuk mengendalikan *A. Hydrophila*. Penelitian sebelumnya menemukan bahwa penggunaan antibiotik jenis *amoxylone*, *clavulanic acid*, *penicilline*, *erythromycime*, *oxytetracycline*, dan *cefuroxime sodium* telah mengalami resistensi dibandingkan *ciprofloxacin*, *cefotaxim* dan *cotrimoxazole* [7,8,9,10]. Antibiotik *Ciprofloxacin* merupakan pilihan yang tepat untuk pengobatan *A. hydrophila*.

Penelitian secara *in vivo*, ikan Botia (*Botia macracanthus*, Bleeker) digunakan sebagai inang uji dikarenakan ikan ini merupakan ikan hias yang sangat banyak jumlahnya [11,12] yang dilalulintaskan melalui wilayah kerja Stasiun Karantina Ikan Jambi. Ikan ini biasanya dikirim ke Jakarta dan diekspor ke Singapura. Peredarannya mencapai 70% dari seluruh ikan hias yang keluar melalui Stasiun Karantina Ikan Jambi. Jenis ikan hias yang merupakan andalan ekspor Provinsi Jambi meliputi ikan hias Botia (70%), Selusur Batang (20%) dan Ikan Caka-Caka (5%), dimana realisasi ekspor ikan hias botia di Prov. Jambi pada 2009 mencapai \$3.620,83 Amerika. Nilai ekspor terus bertambah, namun jumlah produksi ikan tersebut cenderung turun, dengan rata-rata produksi 2.462.200 ekor/tahun. Produksi tertinggi dicapai pada tahun 1983, yaitu 12 juta ekor [13]. Oleh karena itu diperlukan sebuah penelitian yang mendukung kelestarian komoditi tersebut.

Analisa histopatologi dapat digunakan sebagai biomarker untuk mengetahui kondisi kesehatan ikan melalui perubahan struktur yang terjadi pada organ-organ yang menjadi sasaran utama dari penyakit infeksius dan pengobatan dengan antibiotik seperti insang, hati, ginjal dan sebagainya [14]. Selain itu, penggunaan biomarker histopatologi dapat digunakan dalam memonitoring perubahan pada jaringan organ dengan mengamati organ-organ tersebut yang memiliki fungsi penting dalam metabolisme tubuh sehingga dapat digunakan sebagai diagnosis awal terjadinya gangguan kesehatan pada suatu organisme [15,16].

METODE PENELITIAN

Pembuatan Preparat Histologi

Tahap pertama pembuatan preparat histologi adalah organ target dengan ukuran 0,5 x 0,5 cm². Jaringan tersebut kemudian direndam dalam larutan fiksasi yaitu larutan formalin 10% selama 24 jam. Jaringan direndam dalam alkohol 70%

selama 24 jam, kemudian jaringan direndam dalam alkohol 80%, 95%, 100%, larutan campuran alkohol Xylol dan alkohol (3:1), larutan xylol dan alkohol (1:1), serta xylol masing-masing 30 menit.

Selanjutnya tahap parafinasi, pada tahap ini jaringan direndam dengan parafin xylol, parafin I, parafin II, parafin III dalam oven bersuhu 50-60 °C selama 30 menit. Selanjutnya terhadap jaringan tersebut dilakukan *embedding* atau pengeblokan dengan cara memasukan jaringan dalam cetakan berisi parafin cair. Jaringan kemudian didinginkan hingga mengeras dalam suhu kamar selama minimal 24 jam. Tahap selanjutnya adalah deparafinasi. Pada tahap ini blok parafin berisi jaringan dipotong dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 5 mikron. Jaringan yang terpotong diletakan di air hangat untuk mencegah hasil pemotongan melengkung, selanjutnya diletakan di dalam kaca benda dan dikeringkan sampai jaringan menempel sempurna pada permukaan kaca benda. Preparat jaringan dicelupkan secara berturut-turut pada larutan xylol, alkohol 100%, 95%, 80%, 70% masing-masing selama 3-5 menit. Preparat jaringan dicelupkan didalam akuades selama 5 menit.

Preparat potongan jaringan dicelupkan kedalam pewarna hematoksilin selama 5-10 menit kemudian dibilas dengan air mengalir. Preparat potongan jaringan kemudian dicelupkan kedalam eosin selama 5-10 menit lalu dibilas dengan air mengalir. Preparat potongan jaringan dicelupkan kembali secara berturut-turut pada larutan etanol 70%, 80%, 95%, 100% selama 3-5 menit dilanjutkan dengan alkohol absolut selama 3 menit. Preparat potongan jaringan selajutnya dicelupkan dalam xylol selama 5 menit.

Preparat dilekatkan dengan menggunakan *DPX mounting medium* atau entelan, kemudian ditutup dengan kaca penutup, dan dijaga jangan sampai terjadi gelembung. Preparat dibiarkan dalam suhu ruang sampai perekat mengering kemudian diamati dengan mikroskop *compound* dengan perbesaran 40-1000 kali. Indikator pewarnaan hematoksilin dan eosin adalah inti sel berwarna ungu tua sedangkan sitoplasma berwarna merah [17].

HASIL DAN PEMBAHASAN

Histopatologi insang

Selain berfungsi sebagai alat pernapasan, insang juga memiliki fungsi sebagai pengatur pertukaran garam dan air antara tubuh dengan lingkungan serta memiliki peran dalam

pengeluaran limbah-limbah yang mengandung nitrogen. Kerusakan struktur pada insang ikan sangat berpengaruh terhadap pengaturan osmosis sehingga proses pernafasan dan osmoregulasi ikan terganggu.

Pada kelompok ikan yang sehat (Gambar 1a), insang teramati normal. Bagian-bagian dari struktur insang masih lengkap belum mengalami kerusakan. Insang yang normal dari ikan botia yaitu satu lembar insang terdiri dari beberapa lamela primer dan satu lamela primer terdiri dari beberapa lamela sekunder. Sel-sel pernapasan (insang) ikan yang sehat hanya terdiri dari dua atau tiga lapis epitel yang rata dan terletak di membran basal (1e). Panjang lamela insang bervariasi, umumnya lamela insang yang terletak pada ujung filamen lebih pendek dibandingkan lamela yang terletak di tengah.

Organ insang pada ikan botia yang terinfeksi *A. hydrophila* mengalami atrofi, kongesti, fusi lamela, infiltrasi limfosit, dan nekrosis yang menyebabkan vakuola pada lamela primer akibat adanya infeksi bakteri *A. hydrophila* dalam konsentrasi yang tinggi dan lama (Gambar 1f-j). Atrofi yang dimaksud yaitu penyusutan sel-sel penyusun lamela primer pada insang akibat adanya zat toksik yang masuk ke dalam insang.

Selain itu insang juga mengalami edema disebabkan oleh infiltrasi bakteri ke dalam insang yang mengakibatkan sel bersifat iritatif sehingga sel membengkak. Akibatnya adalah perubahan morfologis yang disebut dengan edema atau pembengkakan sel. Edema yang berlanjut mengakibatkan sel-sel epitel mengalami nekrosis atau kematian sel [3]. Edema mengakibatkan eritrosit menjadi mudah pecah dan berubah bentuk sehingga terjadi degenerasi hal ini dapat menyebabkan asphyxia (kesulitan bernafas karena kekurangan oksigen), sehingga dapat menyebabkan kematian ikan.

Insang juga mengalami pembendungan darah pada lamela insang. Pembendungan tersebut ditandai dengan adanya penumpukan sel-sel darah merah yang sangat padat pada pembuluh darah. Penumpukan sel darah itu dapat berlanjut pada kongesti pembuluh darah [17].

Insang juga mengalami fusi lamela sekunder (Gambar 1g) akibat adanya pembengkakan pada sel-sel insang (edema). Terjadinya fusi lamela sekunder mengakibatkan fungsi lamela sekunder terganggu dalam hal proses pengambilan oksigen. Hal tersebut menyebabkan ikan sulit bernafas dan kandungan oksigen dalam darah berkurang. Akibatnya ikan mengalami hipoksia, merangsang organisme untuk mengikat sel darah

merah, dan merangsang hematokrit dan hemoglobin untuk meningkatkan mekanisme transfer oksigen di dalam tubuh. Oleh karena itu, lamela sekunder menyatu sehingga struktur lamela sekunder secara keseluruhan nampak seperti "daun".

Hyperplasia abnormal pada insang diduga diakibatkan adanya bakteri. Infeksi tersebut mengakibatkan organ insang mengalami iritasi dan mengeluarkan mucus (lendir) sebagai perlindungan terhadap serangan bakteri. Akan tetapi mucus yang dihasilkan justru menutup permukaan lamela insang sehingga pertukaran O₂ dengan CO₂ terhambat. Akibatnya tidak ada pengikatan oksigen oleh hemoglobin darah. Hal ini menyebabkan transportasi oksigen ke seluruh tubuh tidak lancar.

Infiltrasi limfosit (Gambar 1h) pada insang terjadi karena adanya perlawanan ikan terhadap infeksi bakteri *A. Hydrophila*. Secara otomatis fungsi limfosit adalah bertugas sebagai sistem pertahanan di dalam tubuh, yang cara kerjanya adalah dengan memakan/memfagosit benda asing yang masuk ke dalam tubuh.

Vakuola atau ruang yang kosong pada lamela primer terjadi karena adanya nekrosis/kematian suatu sel atau sekelompok sel (Gambar 1j). Sel yang mengalami nekrosis dapat dikenali dari bentuk intinya yang mengecil (piknotik), membesar, kabur atau hilang (karyolisis). Nekrosis juga dikenali dari hilangnya sitoplasma sehingga tidak menyerap zat warna HE yang diberikan dalam proses pembuatan preparat histologi.

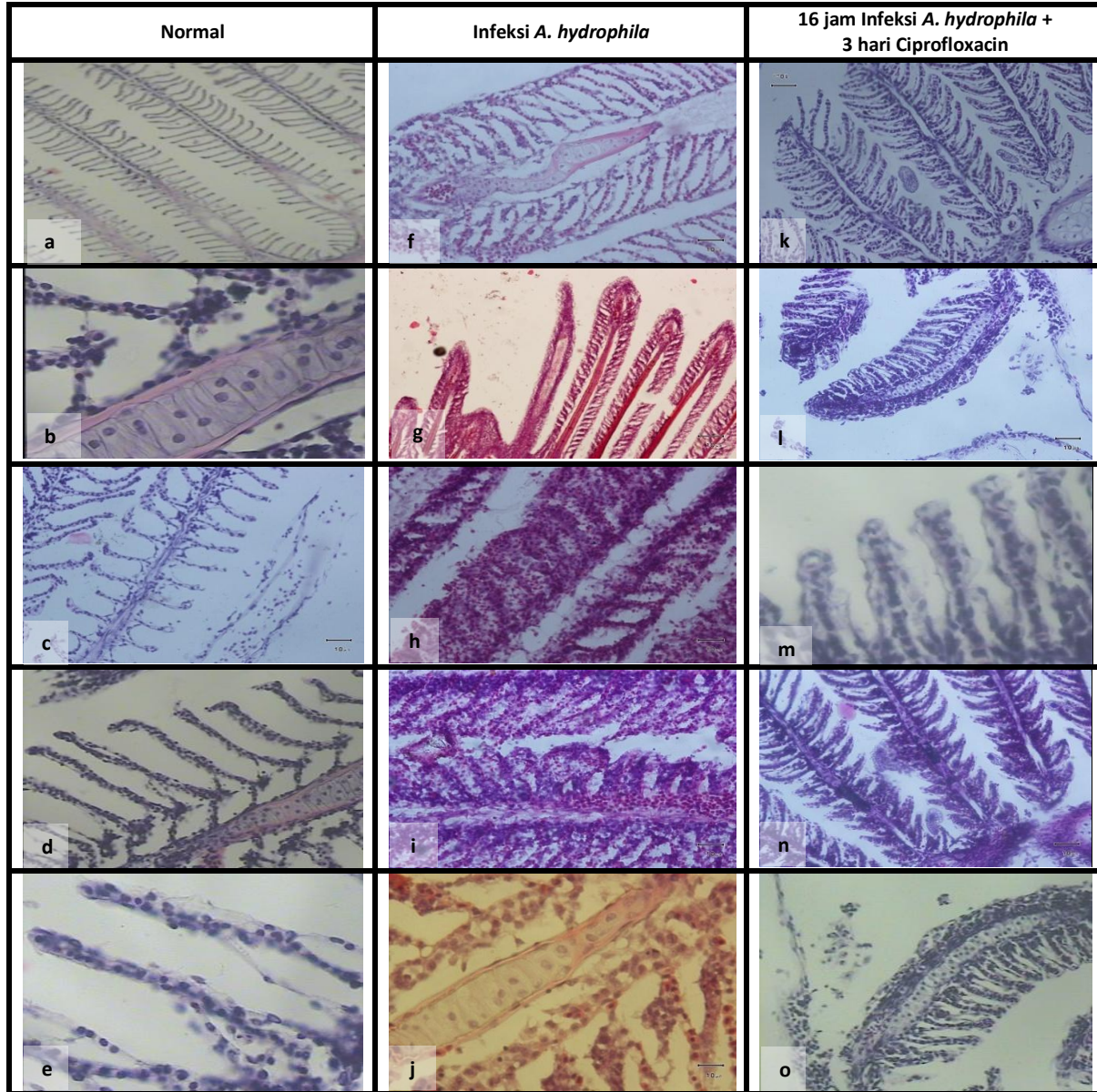
Jaringan insang ikan botia dipapar dengan bakteri *A. hydrophila* selama 16 jam, setelah terlihat gejala klinis infeksi, dilakukan pengobatan dengan antibiotik ciprofloxacin selama tiga hari. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa lamela primer tersusun dengan baik, tidak lagi menunjukkan adanya poliferasi sel/fusi lamela (Gambar 1k). Sel-sel tersebut terbungkus oleh selaput epidermis yang tipis dan bersifat semipermeabel. Ukuran panjang dan besarnya lamela sekunder cenderung hampir sama.

Lamela sekunder juga tidak lagi mengalami edema (Gambar 1l), selain itu terlihat adanya infeksi sekunder oleh parasit *Monogenea* sp (Gambar 1n). Infeksi ini terjadi seiring dengan menurunnya daya tahan tubuh ikan akibat infeksi *A. hydrophila*. Adanya parasit ini diduga terbawa dari pakan yang berupa tubifek yang terkontaminasi parasit.

Ikan yang sudah diobati dengan antibiotik juga menunjukkan adanya perbaikan pada lamela

primer. Sel-sel pada lamela primer tampak terlihat kompak (Gambar 1o), inti sel terlihat central, sitoplasma jelas, serta tidak ditemukan adanya piknotik, karyolisis dan vakuola pada lamela primer. Epithelium rata dan rapi, terdiri dari 1-2 lapis epithel. Hal ini mengindikasikan bahwa insang ikan dalam kondisi baik, sehingga

ikan dapat mengabsorpsi dan mengikat molekul oksigen dengan baik. Tidak terjadi lagi infiltrasi limfosit, karena diperkirakan infeksi yang terjadi pada insang sudah sembuh setelah pengobatan. Jumlah eritrosit terlihat normal, tidak terlihat pekat, sehingga dengan sendirinya sirkulasi darah berjalan normal, serta tidak ada kongesti.



Gambar 1. Histopatologi Insang Ikan Botia

Keterangan:

(a) Susunan struktur lamela sangat teratur dengan panjang dan pendek lamela sekunder bervariasi; (b) Jaringan pada lamela primer yang berisi pembuluh darah terlihat solid; (c) Lamela primer dan sekunder terlihat jelas; (d) Tidak terjadi atropi ataupun hiperplasia pada lamela primer; (e) Epithelium terdiri dari 1-2 lapis; (f) Hiperplasia pada pembuluh darah; (g) Poliferasi sel atau fusi lamela (lamela tampak menyatu); (h) Infiltrasi limfosit pada pembuluh darah dan lamela; (i) Kongesti dan edema pada lamela; (j) Nekrosis pada lamela primer yang menyebabkan munculnya vakuola; (k) Lamela tampak normal dengan ukuran yang hampir sama, dan tersusun dengan teratur (tidak ada fusi lamela); (l) Tidak ada edema; (m) Infiltrasi limfosit pada pembuluh darah berkurang, epithelium terdiri dari 1-2 lapis; (n) Ditemukan infeksi parasit *Monogenea* sp; (o) Tidak ada nekrosis dan vakuola pada lamela primer, jaringan terlihat solid.

Histopatologi hati

Hasil pengamatan histopatologi hati ikan botia yang sehat (Gambar 2a-d) menunjukkan hepatosit (sel parenkim hati) terletak diantara sinusoid yang berisi darah dan saluran empedu. Sinusoid adalah pembuluh darah kapiler yang merupakan percabangan dari vena porta dan arteri hepatica, sinusoid terlihat jelas dengan aliran sejumlah eritrosit (Gambar 2b). Sel hati berbentuk polihedral (Gambar 2a), dengan enam permukaan atau lebih. Sel hati mempunyai satu/dua buah inti bulat, banyak retikulum endoplasma halus dan kasar.

Sel hati berkelompok saling berhubungan sedemikian rupa sehingga membentuk bangunan lobulus hati. Struktur jaringan hati yang normal menunjukkan vena sentralis sebagai pusat lobulus tampak berbentuk bulat dan kosong (Gambar 2c).

Histopatologi hati ikan botia yang diinfeksi dengan *A. hydrophila* selama 16 jam menunjukkan hati mengalami degenerasi parenkim yang ditandai dengan adanya perubahan bentuk *hepatosit*, degenerasi lemak berupa vakuola (ruang kosong), infiltrasi limfosit, nekrosis. Selain itu ditemukan banyak koloni bakteri serta infeksi bakteri sekunder lainnya (Gambar 2e). Sinusoid tersusun tidak teratur dan terdapat eritrosit akibat pecahnya dinding sinusoid. Vena sentralis juga dipenuhi oleh eritrosit akibat penyumbatan vena hepatica. Apabila penyumbatan ini berlangsung cukup lama, maka sel-sel hati tampak hilang karena tekanan dan gangguan-gangguan pembawaan zat gizi. Hal ini disebabkan darah yang mengalir dari perifer lobulus hati ke pusat (vena sentralis) sudah kehilangan zat-zat gizi sewaktu tiba di pertengahan lobulus, sehingga di pertengahan lobulus menjadi kekurangan zat gizi. Kondisi ini menyebabkan sel-sel hati mengalami nekrosis (Gambar 2g) yang kemudian menyebabkan terjadinya degenerasi vakuola.

Degenerasi vakuola atau pembekakan sel merupakan salah satu indikasi terjadinya perlemakan hati, pada keadaan ini sel hati tampak membesar. Perlemakan hati merupakan tahap awal terjadinya kerusakan dalam hati. Perlemakan yang berlangsung lama dapat menyebabkan terjadinya kerusakan hati yaitu kongesti. Pada sel hati, kongesti didahului dengan pembengkakan sel hati dimana sel hati membesar mengakibatkan sinusoid menyempit sehingga aliran darah terganggu.

Selain itu juga ditemukan bagian hati yang mengalami nekrosis akibat adanya infeksi bakteri *A. Hydrophila*. Daerah tersebut rusak,

merenggang dan sel-selnya mati. Semakin sering suatu daerah jaringan mengalami nekrosis, maka menimbulkan respon peradangan pada bagian jaringan yang berdekatan.

Pembengkakan sel hati ditandai dengan adanya vakuola akibat hepatosit membengkak yang menyebabkan sinusoid menyempit, sehingga sitoplasma tampak keruh (Gambar 2f). Pembengkakan sel terjadi karena muatan elektrolit di luar dan di dalam sel berada dalam keadaan tidak setimbang, menyebabkan peningkatan masuknya cairan dari ekstraseluler ke dalam sel sehingga sel tidak mampu memompa cukup ion natrium ke luar. Hal ini menyebabkan sel kehilangan integritas membrannya. Sel akan mengeluarkan materi sel kemudian akan terjadi kematian sel (nekrosis). Pembengkakan sel atau degenerasi vakuola bersifat reversibel sehingga apabila infeksi bakteri tidak berlanjut maka sel dapat kembali normal. Namun jika pengaruh infeksi berlangsung lama maka sel tidak dapat mentolerir kerusakan yang diakibatkan oleh infeksi tersebut.

Adanya nekrosis menyebabkan respon peradangan pada jaringan yang masih hidup di sekitar nekrosis. Respon peradangan ditunjukkan dengan adanya jaringan berwarna merah karena banyak eritrosit. Respon peradangan ini bertujuan untuk pemulihan jaringan serta menekan agen penyebab nekrosis. Sel-sel yang mengalami nekrosis tidak mampu diabsorpsi oleh sel fagosit sehingga dapat melarutkan unsur-unsur sel sehingga dapat mengeluarkan enzim litik. Akan tetapi, apabila infeksi terus menerus maka menyebabkan sel kehilangan kemampuan dalam regenerasi sehingga akan memicu terjadinya fibrosis.

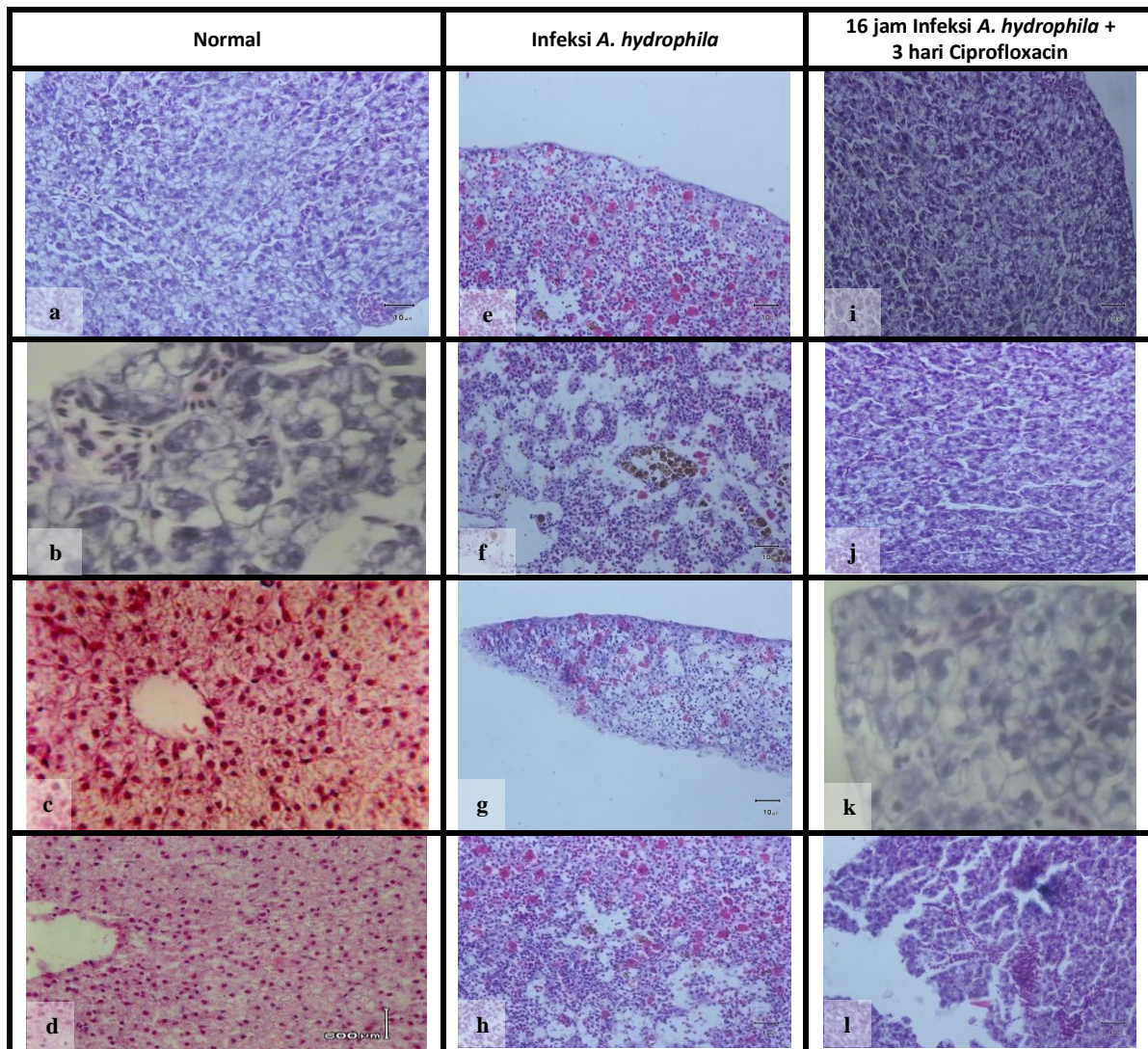
Hasil pengamatan histopatologi ketiga adalah hati ikan botia yang terinfeksi *A. hydrophila* selama 16 jam dan kemudian diobati dengan menggunakan antibiotik ciprofloxacin selama tiga hari. Hasil pengamatan menunjukkan perbaikan pada sel hati, tidak ditemukan lagi adanya koloni bakteri *A. hydrophila* ataupun bakteri lainnya (Gambar 2i). Hal ini mengindikasikan bahwa bakteri tersebut sudah mati akibat adanya aktivitas dari ciprofloxacin.

Selain itu juga tidak ditemukan lagi adanya infiltrasi limfosit pada sel hati sehingga hepatosit terlihat dengan jelas berbentuk lempengan-lempengan yang polihedral (Gambar 2i) dengan 1-2 inti. Hal ini menunjukkan kerja fagositosis limfosit pada benda asing sudah tidak diperlukan lagi. Aliran eritrosit normal (Gambar 2j), tidak pekat dan tidak berlebihan pada sinusoid, artinya

bahwa peredaran darah pada sinusoid sudah berjalan normal kembali.

Hati ikan botia yang diobati juga menunjukkan perbaikan dengan tidak adanya vakuola-vakuola pada sel hati, serta tidak diketemukan adanya nekrosis. Hal tersebut menunjukkan bahwa sel hati bersifat reversibel, sehingga apabila infeksi bakteri tidak berlanjut maka sel hati dapat kembali normal. Namun jika pengaruh infeksi berlangsung lama maka sel tidak dapat mentolerir infeksi tersebut.

Histopatologi hati ikan botia yang diobati, menunjukkan masih adanya sejumlah eritrosit yang memenuhi vena sentralis (Gambar 2k). Hal ini menunjukkan bahwa masih ada penyumbatan pada pembuluh darah akibat adanya infeksi. Banyaknya eritrosit tersebut disebabkan oleh penyumbatan pada vena hepatika. Hal ini terjadi dikarenakan pengobatan hanya dilakukan selama tiga hari. Apabila pengobatan dilakukan lebih lama maka diduga penyembuhan jaringan ini akan lebih baik.



Gambar 2. Histopatologi Hati Ikan Botia

Keterangan:

(a) Hepatosit terlihat jelas dengan bentuk polyhedral dengan 1-2 inti; (b) Sinusoid terlihat jelas dengan aliran eritrosit; (c) Vena centralis kosong; (d) Tidak terdapat vakuola ataupun nekrosis; (e) Sel hati tertutup oleh bakteri *A. hydrophila*, sehingga terlihat samar; (f) Infeksi bakteri sekunder dan *cloudy swelling*; (g) Vakuola dan nekrosis; (h) Infiltrasi limfosit; (i) Tidak ditemukan koloni bakteri *A. hydrophila* pada sel hati, sel hati terlihat dengan jelas dengan bentuk polyhedral, tidak ditemukan lagi infeksi sekunder bakteri lain; (j) Eritrosit yang mengalir dalam sinusoid normal; (k) Tidak ditemukan infiltrasi dalam hati; (l) Masih ada penyumbatan pada pembuluh darah, vena centralis berisi banyak eritrosit.

KESIMPULAN DAN SARAN

Ciprofloxacin efektif dalam mengendalikan *A. hydrophila* yang menginfeksi ikan botia dengan waktu yang relatif singkat. Hal ini ditunjukkan dengan adanya perbaikan organ yang terinfeksi kembali ke kondisi normal.

Penelitian lebih lanjut disarankan mengenai gambaran histologi pada organ lainnya seperti usus, limpa, jantung sebagai pembanding. Perlu pula dilakukan pengujian terhadap antibiotik lainnya sehingga diperoleh antibiotik yang benar-benar efektif untuk mengendalikan *A. hydrophila* yang menyerang ikan botia.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Effendie. 1979. Biologi Perikanan Bagian I. *Study Natural History*. Fakultas Perikanan, Institut Pertanian Bogor: Bogor.
- [2] Afrianto E., Liviawaty E. 1992. Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan. Kanisius: Yogyakarta. 89 hal.
- [3] Angka S.L. 1990. The Pathology of The Walking Catfish *Clarias batracus* (L), Infected Intraperitoneally With *Aeromonas hydrophila*. *Asian Fisheries Science*. 343-351.
- [4] Austin B., Austin D.A. 1987. Bacterial Fish Pathogens in Diseases Farmed and Wild Fish. Heriot-Watt University: Edinburgh.
- [5] Yohanis B. 2007. Gambaran Hematologi dan Histologi Ikan Patin (*Pangasius pangasius*) Yang Terinfeksi *Aeromonas hydrophila* dan Setelah Penambahan Antibakteri Phenol dari Alga Coklat (*Sargassum Polycystum*). Universitas Brawijaya: Malang.
- [6] Djajadireja R., Cholik F. 1982. Penanggulangan Wabah Penyakit Ikan. *Jurnal Penelitian dan Pengembangan Pertanian Bogor*, 56-60.
- [7] Inglis V., Richards R.H. 1991. The In Vitro Susceptibility of *Aeromonas* and Other Fish Pathogenic Bacteria To 29 Antimicrobial Agents. *Journal of Fish Diseases*, 14.
- [8] Jawetz, E., Maelnick, J.L., and Adelberg. F.A., 2001. Medical Mikrobiologi 20th edition. McGraw-Hill. USA. Page 582-584.
- [9] Yanong R.P.E. 2003. Use of Antibiotic In Ornamental Fish Aquaculture. University Of Florida: Florida.
- [10] Teguh S. 2003. Efektifitas Nalidixid Acid Pada Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) Yang Diinfeksi *Aeromonas caviae* Isolat Blitar. 25 hal.
- [11] Darti L., Mudriyanto S., Subandiyah H., Chumaidi S., Sudarto, Taufik P. 2007. Teknologi Pembenihan Ikan Botia Skala Laboratorium. Loka Riset Budidaya Ikan Hias Air Tawar, Depok.
- [12] Ghufuran M., Kardi K.H. 2009. Berbisnis Dari Budidaya Ikan Botia. Kanisius: Yogyakarta.
- [13] Antara News. 2009. Ikan Botia Primadona Ekspor Ikan Hias Indonesia. Edisi 19 November 2009.
- [14] Miyazaki T., Kageyama T., Miura M., Yoshida T. 2001. Histopathology of Viremia-Associated Ana-Aki-Byo In Combination With *Aeromonas hydrophila* In Color Carp *Cyprinus carpio* In Japan. *Dis Aquatic. Org.* 100-120.
- [15] Takshima F., Hibiya T. 1995. An Atlas of Fish Histology Normal and Phatology Feature. Tokyo Kodansha Ltd.
- [16] Suidiana I.K. 1998. Teknik Pembuatan Sediaan Histologi. Laboratorium Patologi Kedokteran Universitas Airlangga: Surabaya.
- [17] Das S.S., Hall D.V., Wareham D.W., Britton K.E. 2002. Infection Imaging With Radiopharmaceutical In The 21st Century. *Brazilian Archiver of Biology and Technology*, 223-228.

Isolasi dan Karakterisasi Protein 100kDa dari Membran Kepala Spermatozoa Kambing

Bayyinatul Muchtaromah^{1*}, Sutiman B. Sumitro², Soemarno³, Trini Susilawati⁴

¹Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Malang

²Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya

³Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya

⁴Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya

Abstrak

Antigen adalah protein yang dapat menginduksi terbentuknya antibodi. Berat molekul protein sebesar 100 kDa dapat bertindak sebagai imunogen yang kuat. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mencari kandidat vaksin imunokontrasepsi dan melakukan isolasi serta karakterisasi protein 100 kDa yang diduga mempunyai peranan penting di dalam interaksi spermatozoa-ovum. Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif. Materi Protein 100 kDa diisolasi dari membran spermatozoa kambing menggunakan detergen *N-Octyl-glycopiranoside* kemudian *dirunning* menggunakan metode SDS-PAGE dan dikoleksi dengan elektroelusi. Karakterisasi Protein 100 kDa meliputi penentuan berat molekul melalui SDS-PAGE, penentuan titik isoelektrik (pI) dengan IEF (*isoelectric focusing*) dan kandungan protein dengan metode Biuret. Hasil *running* isolat protein membran spermatozoa kambing menggunakan metode SDS-PAGE diperoleh pita protein yang terdiri atas 7 pita dengan berat molekul 166,7; 122; 100; 82,8; 60,4; 29,9 dan 14,8 kDa. Isolat Protein 100 kDa diperoleh dengan purifikasi menggunakan metode elektroelusi. Hasil IEF gel elektroforesis Protein 100 kDa dari membran spermatozoa kambing yang diejakulasikan ini mempunyai tiga titik isoelektrik yaitu 6,37; 6,05 dan 5,64. Kandungan protein dalam isolat Protein 100 kDa sebesar $2375 \pm 5,65$ $\mu\text{g/mL}$. Hasil ini menunjukkan bahwa isolat protein 100 kDa dapat digunakan sebagai imunogen.

Kata Kunci : isolasi, karakterisasi, membrane spermatozoa, protein 100kDa

PENDAHULUAN

Dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Mitra *et al.* [1] diketahui bahwa membran plasma spermatozoa kambing memiliki aktivitas enzim *ecto-cAMP independent protein kinase* (ecto-CIK) yang menyebabkan fosforilasi dari protein endogenous (fosfoprotein). Substrat dari enzim ecto-CIK (MPS ecto-CIK), berhasil diisolasi oleh Maiti *et al.* [2] dengan menggunakan enzim kinase endogen [γ -³²P]-ATP dari membran plasma spermatozoa kambing di cauda epididimis. Untuk melarutkan ³²P-labeled substrat diperlakukan dengan Triton X-100 1% kemudian dimasukkan *Sepacryl S-300 molecular sieve chromatography*. Dari perlakuan tersebut berhasil ditemukan tiga titik isoelektrik MPS ecto-CIK yaitu 6,37; 6,05 dan 5,14.

Dengan menggunakan *Sepacryl S-200* diketahui bahwa MPS ecto-CIK merupakan

fosfoprotein monomer dengan berat molekul 100 kDa, hasil yang sama juga didapatkan dengan menggunakan elektroforesis SDS PAGE. Fosfoprotein hasil isolasi membran plasma spermatozoa cauda epididimis ini menunjukkan tingkat kemurnian yang tinggi seperti yang ditunjukkan pada band protein tunggal (monomer) di bawah kondisi *native* dan *denaturing gel* [2].

Analisis Western Blot terhadap tiga isoform protein MPS ecto-CIK yang mempunyai harga pI (*point isoelectric*) berbeda memperlihatkan bahwa ketiga isoform tersebut berikatan dengan anti MPS ecto-CIK [2].

Pada penelitian pendahuluan telah diisolasi protein dengan berat molekul (BM) 100 kDa dari membran kepala spermatozoa kambing yang sudah diejakulasikan. Antigen adalah protein yang dapat menginduksi terbentuknya antibodi. Timbulnya antibodi dapat digunakan sebagai petunjuk bahwa protein yang dimaksud mempunyai sifat imunogenik. Berat molekul protein sebesar 100 kDa dapat bertindak sebagai imunogen yang kuat. Subowo [3] mengatakan

* Alamat korespondensi:
Bayyinatul Muchtaromah
Email: Bayyinatul_m@yahoo.com
Alamat : Fakultas Sains dan Teknologi UIN Malang

protein dengan berat molekul lebih dari 10 kilo dalton merupakan imunogen kuat. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mencari bahan kandidat vaksin imunokontrasepsi sehingga perlu dilakukan isolasi dan karakterisasi protein 100 kDa tersebut.

METODE PENELITIAN

Variabel Penelitian

Parameter yang diamati untuk karakterisasi Protein 100 kDa dari membran spermatozoa kambing yang sudah diejakulasikan meliputi berat molekul, penentuan titik isoelektrik dan kandungan protein.

Spermatozoa yang dipakai dalam penelitian ini berasal dari semen yang ditampung dari kambing yang berumur 1,5-2 tahun, berat badan \pm 50 kg dengan kondisi sehat.

Untuk mengetahui karakter biokimiawi protein 100 kDa dari membran kepala spermatozoa kambing yang sudah diejakulasikan dilakukan elektroforesis SDS PAGE untuk menentukan berat molekulnya. *Isoelectric Focusing* (IEF) untuk menentumkan titik isoelektriknya dan metode Biuret untuk mengukur kandungan proteinnnya.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian tahap I ini adalah: semen kambing peranakan etawah (PE) umur 1,5-2 tahun yang dipelihara oleh peternak desa Sumber Sekar, vaselin, air hangat, NaCl fisiologis 0,9%, *eosin negrosin*, *Brackett and Oliphant's Medium* (NaCl, KCl, CaCl₂, NaH₂PO₄, MgCl₂, NaHCO₃, Glukosa, Sodium piruvat, Penisilin (Meiji), Streptomisin (Meiji), *Phenol red*, *PBS Dulbeccoes*, NaCl 3%, *aprotinin*, *leupeptin*, *pepstatin*, *phenyl methyl sulfonil fluoride* (PMSF), *N-Octyl-Glycopiranoside* (NOG), akuades steril, *sodium azida* (sigma), buffer tris-glisin, buffer fosfat, bis akrilamid, poliakrilamid, *sodium dedosil sulfat* (SDS), metanol 15%, asam asetat glacial 3% (Merck), *β -mercaptoetanol*, *Phosfet Buffer Salin*, NaHCO₃, alkohol 70%, *Teepol* 1%, *Tris base*, Tween 20, *glycine*, etanol (Merck), *bromophenol blue*, *Reducing Sample Buffer* (RSB), membran nitroselulose, urea, akrilamid 30%, bisakrilamid 0,2%, *ampholine* pH 3,5 – 10, *ampholine* pH 4 – 6, APS 10%, *Amonium persulfat* (APS), *N,N,N', N' tetrametiletlen diamina* (TEMED), TCA 10%, TCA 1%, KCl 10 mM, CuSO₄.5H₂O, NaKC₄O₆4H₂O, *Bovine Serum Albumin* (BSA).

Alat yang digunakan adalah satu unit vagina buatan, mikroskop cahaya, gelas obyek, *cover glass*, ose, *haemositometer thoma*, *handly counter*, kertas lakmus, kertas tissue,

seperangkat alat gelas, *timer*, *ependorf*, tip, *sonication bath*, *homogenizer*, *magnetic stirrer*, tabung sentrifuse, sentrifuse tipe T-C kecepatan maks 5000 rpm, sentrifuse dingin merk Jovan MR 1822 (maks 18000 rpm), neraca analitik merk Mettler AE-50, mini 2D elektroforesis proteon II (Biorad), spektrofotometer UV-VIS *Thermo Spectronic Genesys 10 UV*, *waterbath*, vorteks, pipet mikro 10-1000 μ l, pipet mikro 10 μ l, pipet mikro 20 μ l, pH meter, *shaker*, *water bath* dan inkubator CO₂.

Penampungan Semen Kambing

Penampungan semen pada kambing jantan dilakukan dengan menggunakan vagina buatan. Pejantan yang akan ditampung dipersiapkan dengan membersihkan preputium dengan air kemudian dikeringkan. Vagina buatan yang telah dilengkapi dengan tabung penampung semen diisi dengan air hangat sampai mendapatkan suhu kira-kira 40°C dan sepertiga bagian depan selubung diberi vaselin. Penampungan semen dilakukan setelah 3-5 kali *false mounting* dan semen ejakulat pertama ditampung untuk diperiksa [4].

Uji Kualitas Semen Segar

Pemeriksaan kualitas meliputi pemeriksaan secara makroskopis dan mikroskopis merujuk pada Partodihardjo [4]. Pemeriksaan secara makroskopis meliputi: volume, warna, pH serta uji kekentalan atau konsistensi. Volume diukur dengan melihat langsung pada tabung berskala, warna dilihat langsung pada tabung penampung, pH diukur dengan menggunakan kertas lakmus yang kemudian dicocokkan dengan warna standar pada pH pen. Konsistensi diperiksa dengan menggoyangkan tabung berisi semen secara perlahan.

Pemeriksaan mikroskopis yang meliputi persentase motilitas, dengan melihat persentase motilitas individu, motilitas massa, uji viabilitas dan konsentrasi spermatozoa. Penentuan persentase motilitas spermatozoa dilakukan dengan melihat gerakan individu spermatozoa, yang diperiksa menggunakan mikroskop dengan pembesaran 400 x. Penilaian dilakukan dengan menghitung 100 spermatozoa yang bergerak aktif maju ke depan (gerakan maju progressif) dan dipersentasakan.

Motilitas massa dengan melihat gerakan spermatozoa yang berupa gelombang, dengan pembesaran 100 x. Penilaian sangat baik (+++) bila terlihat gelombang besar, banyak, gelap, jelas dan bergerak cepat, baik (++) bila terlihat

gelombang kecil, tipis, jarang, kurang jelas dan bergerak lamban; sedang (+) bila terlihat gerak individu aktif progresif dan buruk; (0) tidak ada gerakan sama sekali.

Uji viabilitas spermatozoa dilakukan dengan pewarnaan eosin negrosin. Spermatozoa yang hidup tidak menyerap warna, sedangkan yang mati menyerap warna. Pengamatan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 100x, dihitung sebanyak 100 spermatozoa, sehingga dapat diketahui proporsi spermatozoa yang hidup dan yang mati.

Pemeriksaan konsentrasi spermatozoa dilakukan menggunakan *haemocytometer*. Dengan cara pipet eritrosit yang berskala 0,5-101 dihubungkan dengan selang penghisap. Semen dihisap hingga skala 0,5 lalu diteruskan dengan NaCl fisiologis sampai pada skala 101. Setelah itu digoyang dengan gerakan menyerupai angka 8 selama 2-3 menit. Pada saat akan dilakukan perhitungan, beberapa tetes dibuang dan dikocok lagi. Selanjutnya "kamar hitung *Neubauer*" yang sudah dipasang *cover glass* ditetesi isi pipet eritrosit. Kemudian gelas penutup ditekan perlahan. Perhitungan konsentrasi dengan menghitung lima kotak besar secara diagonal di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x.

Isolasi membran kepala spermatozoa kambing

Metode Isolasi ini merupakan metode modifikasi dari Jayendran *et al.* [5], Hinsch *et al.* [6] dan Gatti *et al.* [7]. Mula-mula spermatozoa diperkaya dan dimurnikan dari sel yang lain dengan metode *Swim Up*. Satu ml semen diencerkan dengan *PBS dulbeccoes* 1:5 diikuti dengan sentrifugasi pada 2000 rpm selama 10 menit sebanyak 2 kali pada suhu kamar untuk pencucian terhadap seminal plasma.

Medium *Brackett Olliphant* (2ml) secara hati-hati diletakkan pada pelet, dengan memiringkan dinding tabung sudut 45°C dan diinkubasi selama 20 menit pada 37°C. Supernatan mengandung fraksi spermatozoa motil yang diperkaya diaspirasi dan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3500 rpm pada suhu kamar. Ditambahkan PMSF 0,5 mM, *leupeptin* 4 µg/ml, *aprotinin* 4 µg/ml, *pepstatin* 1 µg/ml divorteks selama 5 menit, tiap 1 menit dimasukkan refrigerator. Kemudian ditambahkan detergen *N-Octyl-Glycopyranoside* 1%, divorteks, kemudian dihomogenizer selama 3 menit pada suhu 4°C setelah itu disonikasi dalam *sonication bath* selama 3 menit.

Suspensi didiamkan dalam refrigerator selama 30 menit dan disentrifuse 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C sebanyak 2x. Supernatan diambil kemudian dilakukan dialisis semalam dalam PBS. Hasilnya dapat langsung digunakan untuk elektroforesis atau ditambahkan etanol (1:1) dan didiamkan semalam dalam refrigerator. Kemudian disentrifuse 6000 rpm selama 10 menit kemudian taruh di freezer selama 5 menit, supernatan dibuang dan pelet diangin-anginkan. Jika sudah tidak berbau ditambahkan tris Cl 20 mM dan disimpan pada suhu -40°C.

Penentuan Berat Molekul

Persiapan gel

Plat gel dibuat dengan merangkai dua plat kaca dengan jarak antar plat ± 1 mm. Gel dibuat dua lapis yaitu gel sebagai tempat sampel (*stacking gel*) dan gel sebagai media untuk pemisahan protein (*separating gel*).

Separating gel dibuat dengan mencampurkan semua bahan kecuali *ammonium persulfat* (APS) dan *N,N,N', N' tetrametiletlen diamina* (TEMED), kemudian didegas selama 10 menit. APS dan TEMED ditambahkan, dikocok sebentar kemudian dimasukkan dalam plate dan dibiarkan 10-30 menit sampai gel mengeras. *Stacking gel* dibuat dengan cara yang sama tanpa didegas dan setelah *separating gel* mengeras, larutan *stacking gel* dituangkan di atasnya dan dipasang sisiran sampai gel mengeras dan terbentuk sumuran. Plate dipasang pada alat elektroforesis set mini protein gel, dan *running buffer* dituangkan pada alat tersebut.

Injeksi Sampel

Sampel yang berisi 12,5 µl isolat protein membran spermatozoa dan 12,5 µl *reducing sample buffer* (RSB) dipanaskan dalam penangas air bersuhu 100°C selama 2 menit, setelah didinginkan sampel siap dimasukkan dalam sumur-sumur gel dengan volume 10 µl untuk tiap sumur. Untuk protein standar diperlakukan sama. Setelah itu anoda dihubungkan dengan reservoir bagian bawah dan katoda dihubungkan dengan reservoir bagian atas. *Power supply* dihubungkan dengan listrik menggunakan arus sebesar 30 mA 600 volt selama 2-3 jam. Proses pemisahan dihentikan setelah warna biru penanda ± 0,5 cm dari batas bawah plate gel.

Perlakuan setelah *running*

Gel hasil *running* direndam dalam larutan staining sambil digoyang selama 30 menit.

Kemudian dicuci dengan 150 mL asam asetat yang direndam dalam larutan destaining selama 30 menit sambil digoyang. Selanjutnya dicuci dengan asam asetat sampai bening.

Penentuan massa molekul relatif (Mr) protein dilakukan dengan bantuan protein standar. Untuk menentukan berat molekul protein, dilakukan dengan menghitung Rf (*Retardation factor*) dari masing-masing pita menggunakan rumus:

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan pita dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

Selanjutnya dibuat kurva standar dari protein standar sehingga dari kurva ini didapatkan persamaan reaksi dan ditentukan massa molekul relatif sampel.

Tabel 1. Nilai Protein Standar Produksi Biorad

Rf (Sb X)	BM (kDa)
0,064	200
0,177	116,25
0,223	97,4
0,371	66,2
0,564	45
0,887	31

Isolasi dan Purifikasi Protein 100 kDa dengan Metode Elektroelusi

Gel hasil SDS-PAGE (gel akrilamid) yang tidak diwarnai dipotong sepanjang pita yang sudah ditentukan berada pada BM 100 kDa. Masing-masing potongan gel dimasukkan ke dalam kantong selofan dan direndam dengan 0,2 mM *phosphat buffer* (PB) sebanyak 1-2 ml. Kemudian dimasukkan dalam chamber elektroelusi yang mengandung *phosphat buffer* 0,1 mM. Langkah berikutnya dilakukan elektroelusi di dalam *cool chamber* 40°C (dalam *refrigerator*), *power supply* dinyalakan dengan kekuatan 220 V, 20 mA selama *overnight*.

Protein yang sudah terelusi dapat ditentukan dengan cara mewarnai potongan gel *acrilamide* dengan *staining commasie blue* selama 20 menit. Kemudian ditambahkan *destaining*, bila tidak terdapat pita berarti protein sudah terelusi. Selanjutnya cairan yang mengandung protein yang terdapat dalam kantong selofan dikeluarkan kemudian dipresipitasi dan dipurifikasi dengan ethanol absolut 1:1 untuk mendapatkan protein yang dimaksud.

Penentuan Titik Isoelektrik

Membuat Akrilamid 31%

Akrilamid sebanyak 3 gr dan bis akrilamid 0,1 gr dilarutkan dalam 5 ml dH₂O setelah larut ditambahkan dH₂O sampai 10 mL.

Membuat Gel

Urea sebanyak 5 gr dan 3,5 dH₂O dilarutkan terlebih dahulu sambil dipanaskan. Setelah larut dipindah ke tabung polipropilen 45 mL. Masing-masing bahan yaitu Akrilamid 31%, Ampholite pH 3-10 sebanyak 40 µL, 200 µL ampholite pH 5-7, 20,7 µL APS 10%, 16,4 µL TEMED ditambahkan satu per satu dan divorteks. Setelah semua bahan larut dan tercampur rata kemudian dimasukkan ke plate sampai penuh dan dipasang sisir, ditunggu sampai ngejel lebih kurang 1,5 jam.

Running

Memasang plate yang berisi gel. *Chatolyte* dituang pada *upper buffer plate* (kutub -), sedang *anolyte* dituang pada *lower buffer plate* (kutub +). Sisiran dilepas dan sumuran dibersihkan dengan syringe. Sampel Protein 100 kDa ditambah loading buffer 1:1 diinjeksikan ke dalam sumuran. Running dilakukan pada 2 tahap *constan voltage* yaitu pertama *constan voltage* 150 V selama 30 menit dan kedua *constan voltage* 200 V selama 1,5 jam.

Fixing

Menuangkan masing-masing *running buffer* (*Chatolyte* dan *anolyt*) pada tempat yang berbeda. Gel diambil dan diletakkan pada wadah yang berisi TCA 10%, rendam selama 10 menit. Setelah 10 menit larutan dibuang dan rendam gel dalam TCA 1% selama 2 jam sampai semalam.

Staining dan Destaining

Gel hasil fixing direndam dalam larutan staining sambil digoyang selama 30 menit. Kemudian dicuci dengan 150 mL asam asetat yang direndam dalam larutan destaining selama 30 menit sambil digoyang. Selanjutnya dicuci dengan asam asetat sampai bening. Perlakuan di atas menggunakan penggoyang otomatis (*shaker*).

Mengukur Kadar Protein dengan Metode Biuret

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum BSA 5000 ppm. Sebanyak 200 µL larutan standar *Bovine Serum Albumin* (BSA) konsentrasi 5000 ppm dimasukkan ke dalam eppendorf, ditambah dengan 800 µL reagen Biuret, kemudian dikocok

dan didiamkan selama 30 menit. Selanjutnya diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada kisaran panjang gelombang 500-600 nm. Sebagai blanko dipipet 200 µL akuades dan 800 µL reagen Biuret.

Pembuatan Kurva Standar BSA

Diiapkan 10 eppendorf, masing-masing ditambah dengan 200 µL larutan standar BSA (*Bovine Serum Albumin*) dengan variasi konsentrasi 100-10.000 ppm. Masing-masing ditambah dengan 800 µL reagen Biuret. Kemudian dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Selanjutnya diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-VIS pada λ maksimum yang diperoleh dari pengukuran larutan standar BSA 5000 ppm. Kemudian dibuat persamaan regresi linier hubungan antara konsentrasi dan absorbansi sehingga diperoleh kurva standar BSA.

Pengukuran Kandungan Protein 100 kDa

Diambil 200 µL sampel Protein 100 kDa, ditambah 800 µL reagen Biuret kemudian dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Selanjutnya diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-VIS pada λ maksimum yang diperoleh dari pengukuran larutan standar BSA 5000 ppm. Sebagai blanko dipipet 200 µL air dan ditambah dengan 800 µL reagen Biuret dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar selanjutnya diukur serapannya dan diulangi 3 kali.

Kandungan protein diperoleh dengan cara mengkonversi data dan absorbansi ke konsentrasi melalui persamaan regresi linier kurva standar BSA, menurut Hamilton [8] menggunakan rumus:

$$Y = a.X$$

$$X = \frac{Y}{A}$$

Dimana X = konsentrasi total protein

Analisis Data

Data yang telah diperoleh dari hasil perlakuan dianalisis secara deskriptif.

**HASIL DAN PEMBAHASAN
Kualitas Semen Segar Kambing**

Pemeriksaan semen segar dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis segera setelah proses penampungan semen dilakukan. Pemeriksaan makroskopis meliputi pemeriksaan warna, volume, konsistensi dan pH, sedangkan pemeriksaan secara mikroskopis meliputi

konsentrasi, persentase hidup, motilitas massa dan motilitas individu. Hasil pemeriksaan semen segar yang digunakan dalam penelitian ini menunjukkan kualitas semen yang normal seperti yang ditunjukkan dalam Tabel 2.

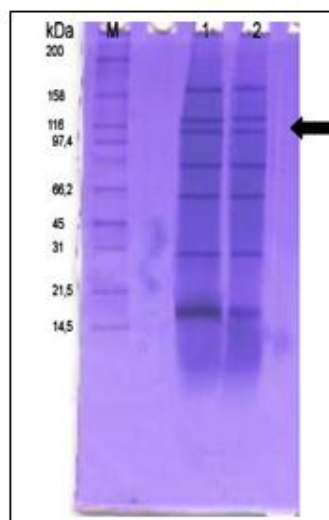
Tabel 2. Hasil Pemeriksaan Semen Segar Kambing Percobaan

Parameter	Standar Semen Normal	Rata-rata ± SD
Volume (ml/ejakulat)	0,5 – 2	0,90 ± 0,25
Warna	Krem-putih kekuningan	Krem
pH	6,9 – 7,5	7
Konsistensi	Kental	Kental
Motilitas Massa	2+ – 3+	2+
Motilitas individu (%)	60 – 90	70 ± 0,25
Persentase hidup (%)	≥ 70	80,44 ± 0,35
Konsentrasi (juta/ml)	1500 – 5000	2560 ± 257,10

Berdasarkan hasil pemeriksaan terhadap beberapa parameter di atas dapat diketahui bahwa kualitas dan kuantitas semen kambing yang digunakan dalam penelitian ini baik.

Berat Molekul Protein 100 kDa

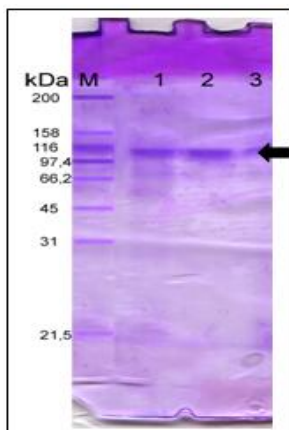
Berat molekul isolat protein membran spermatozoa kambing ditentukan dengan mengplotkan harga Rf yang diperoleh pada persamaan regresi linier $Y = - 2,1378X + 5,5952$ kurva hubungan antara Rf (sumbu X) dengan log BM protein standar (sumbu Y) sehingga diperoleh pita protein yang terdiri atas 7 pita dengan berat molekul 166,7; 122; 100; 82,8; 60,4; 29,9 dan 14,8 kDa (Gambar 1).



Gambar 1. Elektroforegram Protein 100 kDa
Keterangan: M = Marker; 1, 2 = Sampel; → = BM Protein 100 kDa

Untuk memperoleh isolat Protein 100 kDa maka dilakukan purifikasi menggunakan metode elektroelusi dengan cara memotong pita dengan BM 100 kDa dan dilakukan elusi selama semalam.

Hasil elusi Protein 100 kDa terlihat pada Gambar 2.

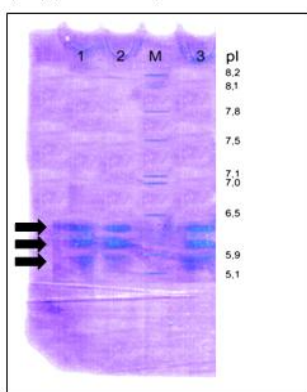


Gambar 2. Hasil elusi Protein 100 kDa
Keterangan: M = Marker; 1, 2 = Sampel; → = BM Protein 100 kDa

Titik Isoelektrik Protein 100 kDa

Isoelectric Focusing (IEF) gel elektroforesis adalah teknik untuk memisahkan protein pada muatan bersihnya (tanpa/titik isoelektrik). Pemisahan protein berdasarkan gradien pH pada muatan listriknya (*electric field*). Pada kondisi ini, protein bermigrasi sampai posisi gradien pHnya tidak bermuatan atau titik isoelektriknya nol (*zero*) [9].

Hasil IEF gel elektroforesis Protein 100 kDa dari membran spermatozoa kambing yang diejakulasikan ini mempunyai tiga titik isoelektrik yaitu 6,37; 6,05 dan 5,64. Hasil tersebut hampir sama dengan hasil *Isoelectric Focusing* dari protein MPS ecto CIK yang berasal dari membran spermatozoa di cauda epididimis kambing yang ditemukan Maiti *et al.* [2] yaitu 6,37; 6,05 dan 5,14. Hasil IEF Protein 100 kDa pada penelitian ini tampak pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil IEF gel elektroforesis Protein 100 kDa
Keterangan: M =Marker Protein; 1, 2, 3 = Sampel; →= tiga titik isoelektrik (pI) protein 100 kDa yaitu: 6,37 ; 6,05 dan 5,64.

Kandungan Protein 100 kDa

Pada penelitian ini dilakukan analisis terhadap kandungan protein isolat Protein 100 kDa dengan metode Biuret. Hasil analisis data dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Karakter Biokimia Protein 100 kDa dari membran Spermatozoa Kambing

Rataan Kandungan dalam Isolat Protein 100 kDa	Isolat Protein 100 kDa
Protein (µg/mL)	2375 ± 5,65

Kandungan protein dalam isolat Protein 100 kDa ditentukan dengan mengkonversikan serapan pada kurva *Bovine Serum Albumin* (BSA) yang sudah diketahui konsentrasinya. Dari hasil penelitian dan analisis pada persamaan $Y = 5.10^{-5} X$, diperoleh kandungan rata-rata protein total isolat Protein 100 kDa sebesar $2375 \pm 5,65$ µg/mL.

Berdasarkan hasil yang telah diperoleh menunjukkan bahwa isolat Protein 100 kDa dapat digunakan sebagai imunogen. Syarat minimal penggunaan protein sebagai antigen adalah sebesar 300 µg/200 ml pelarut [10].

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang diuraikan di atas maka dapat diambil kesimpulan bahwa karakter biokimia Protein 100 kDa dari membran spermatozoa kambing yang sudah diejakulasikan yaitu mempunyai berat molekul 100 kDa dengan tiga titik isoelektrik yaitu 6,37; 6,05 dan 5,64 dan rata-rata kandungan protein total dari isolat sebesar $2375 \pm 5,65$ µg/ mL.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kemampuan Protein 100 kDa membran spermatozoa kambing yang sudah diejakulasikan dalam menginduksi respon imun humoral.

DAFTAR PUSTAKA

[1] Mitra S. and Majumder G.C. 1991. Alteration of the Ecto-protein phosphorylation profile of intact goat Spermatozoa during Epididymal Maturation. *Biochem Int.*, 23 (3): 611-618.
 [2] Maiti A., Mishra K.P. and Majumder G.C. 2004. *J. of Cell. Biochem.*, 92:164-177.
 [3] Subowo. 1993. *Imunobiologi*. Angkasa. Bandung
 [4] Partodihardjo S.W. 1992. *Ilmu Reproduksi Ternak*. Mutiara Sumber Widya. Jakarta.

- [5] Jayendran R.S., H. H. Van der van and Perz-Pelaez M. 1984. Development of an assay to access the functional integrity of the human sperm membrane.
- [6] Hinsch E., Oehringer S., Schill W.B and Hinsch K.D. 1999. Specificity of human and murin anti ZP3 Synthetic Peptide Antisera and use of antibodies for localization and Identification of ZP3 or ZPC Domains of Functional Significance. *Hum. Reprod. Feb.* 14(2): 419-28.
- [7] Gatti J.L., Druat X., Syntin P., Guerin Y., Dacheux J.L. and Dacheux F. 2000. Biochemical characterization of two ram cauda epididymal maturation-dependent sperm glycoprotein. *Biol. of Reprod.*, (62): 950-958.
- [8] Hamilton D.W. and Gould R.P. 1997. Preliminary observations on enzymatic galactosylation of glycoproteins on the surface of rat caput epididymal spermatozoa. *Int. J. Androl. (suppl.)*, 5: 73-80.
- [9] Walker. 1994. Methodes in molecular biology, basic protein and peptide *Protocols*, 32: 59-67
- [10] Robert K. and Peter A. 1993. Harper's biochemistry, 23th edition. Preble hall International Inc., USA.

Diatomae *Chaetoceros ceratosporum* dalam Formula Pakan Meningkatkan Respon Imun Seluler Udang Windu (*Penaeus monodon* Fab.)

Arning Wilujeng Ekawati^{1*}, Happy Nursyam², Edi Widjayanto³, Marsoedi²

¹Program Doktor Ilmu Perikanan dan Kelautan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Brawijaya

²Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Brawijaya

³Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dan dosis yang terbaik pada pemanfaatan diatomae *Chaetoceros ceratosporum* dalam formula pakan terhadap peningkatan respon imun seluler udang windu (*Penaeus monodon* Fab.). Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 3 ulangan. Sebagai perlakuan adalah pemanfaatan *Chaetoceros ceratosporum* dalam formula pakan iso protein 39,02% dan iso energy 3,58 kkal/g pakan dengan dosis yang berbeda yaitu: A (0%), B (3,04%), C (6,08%) dan D (9,12%). Parameter yang diamati adalah total hemosit, total diferensial hemosit (hyaline, semi granular dan granular), dan aktivitas *vibriocidal*. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa pemanfaatan diatomae *Chaetoceros ceratosporum* dalam formula pakan dapat meningkatkan respon imun seluler, dan dosis terbaik berkisar 5,15% - 6,51%.

Kata kunci: *Chaetoceros ceratosporum*, respon imun seluler, udang windu (*Penaeus monodon* Fab.)

Abstract

The aims of the experiment is to assess the effect and the best dose of *Chaetoceros ceratosporum* diatomae utilization in feed formula on cellular immune response of tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fab.). This research applied Completely Randomized Design (CRD) with 4 treatments and 3 replications. The treatment was the use of *Chaetoceros ceratosporum* diatomae in feed formula (iso protein, 39.02% and iso energy 3.58 kcal/g diet) with different numbers, i.e. treatment A=0%; B=3.04%; C=6.08%; D=9.12%. The observed parameters were Total Haemocyte Count (THC), Total Hyaline Cells (H), Total Semi Granular cells (SG), Total Granular Cells (G), Total Plasma Protein (TPP), protease enzymes activity, superoxide anions and vibriocidal activity. The result showed that *Chaetoceros ceratosporum* diatomae utilization in feed formula affect the increase of cellular immune response of tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fab.). The best dose ranged from 5.15 % - 6.51% in feed formula.

Key words: *Chaetoceros ceratosporum*, cellular immune response, *Penaeus monodon* Fab.

PENDAHULUAN

Udang windu (*Penaeus monodon* Fab.) adalah termasuk krustase yang hanya memiliki sistem imun nonspesifik dalam mempertahankan tubuhnya terhadap

serangan patogen. Komponen sistem imun non spesifik pada udang windu meliputi fisik, seluler dan humoral [1]. Selanjutnya dijelaskan bahwa pertahanan fisik yang berperan sebagai pertahanan terluar pada udang adalah kulit, sedangkan sistem imun seluler terdiri dari Hemosit dan *fixed phagocytes* (sel yang tidak bergerak yang tersebar pada insang, jantung, dan jaringan pengikat). Faktor pertahanan humoral seperti protein penggumpalan, aglutinin (seperti

* Alamat korespondensi:

Arning Wilujeng Ekawati

Email: ar_ning2000@yahoo.com

Alamat : Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang

lektin), enzim hidrolitik dan peptide antimikroba yang dihasilkan oleh dan akibat aksi sel imun [2].

Hemosit memegang peranan penting dalam respon seluler pertahanan tubuh udang yang meliputi fagositosis, enkapsulasi, melanisasi, cytotoksitas dan komunikasi antar sel. Berdasarkan ada tidaknya granula sitoplasma, hemosit dibagi menjadi 3 jenis yaitu sel hyalin, sel semi granular dan sel granular [2,3,4].

Peningkatan pertahanan tubuh terhadap serangan penyakit tidak hanya dapat dilakukan dengan pemberian pakan dengan komposisi nutrisi yang seimbang, melainkan dapat juga disertai pemberian imunostimulan dalam pakan. Imunostimulan berhubungan langsung dengan sel sistem imun yang membuat sel tersebut lebih aktif. Pada udang windu (*Penaeus monodon* Fab.) dengan pemberian imunostimulan *bacterin vibrio* dan *glucan* dari *yeast* dapat meningkatkan aktifitas sistem pro-phenoloxidase (pro-PO) pada udang [5]. Pemberian pakan alami diatomae *Chaetoceros ceratosporum* juga dapat meningkatkan daya tahan larva udang windu terhadap paparan bakteri *Vibrio harveyi* [6,7], namun perandiatomae ini sebagai imunostimulan masih perlu diteliti lebih lanjut. Diduga *C. ceratosporum* mengandung β -(1-3)-glucan yang dapat berperan sebagai imunostimulan. Storshet *et al.* [8,9] telah membuktikan adanya struktur β -D-(1-3)-glucan pada *Chaetoceros mulleri*. Selanjutnya Storshet *et al.* [10] juga membuktikan struktur β -D-(1-3,1-6)-glucan pada *Chaetoceros debilis*. Penelitian-penelitian tersebut membuktikan bahwa berbagai jenis diatomae mengandung glucan dengan struktur yang berbeda, dimana glucan ini dapat berperan sebagai imunostimulan. Oleh karena pengukuran respon imun dapat dilakukan dengan mengambil hemolim udang, dimana pada penelitian ini dilakukan pada tingkat pasca larva.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dan dosis yang terbaik pemanfaatan diatomae *Chaetoceros ceratosporum* dalam formula pakan terhadap peningkatan respon

imun seluler pada udang windu (*Penaeus monodon* Fab.).

METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: udang windu (*Penaeus monodon* Fabricus), bahan untuk formula pakan, *Chaetoceros ceratosporum* kering, bakteri *Vibrio harveyi* dan air laut bersalinitas 30 ppt untuk media pembudidayaan. Bahan-bahan kimia untuk kultur pakan alami, kultur bakteri, analisis proksimat bahan pakan dan bahan kimia untuk analisis respon imun.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bak kultur makanan alami, bak pemeliharaan udang beserta perlengkapan pemeliharaan (aerasi), peralatan kultur bakteri, peralatan analisis proksimat bahan pakan, pembuatan pakan, uji kualitas air.

Sesuai dengan tujuan penelitian yang ingin dicapai maka penelitian ini dilaksanakan dalam 2 tahap, yaitu Tahap I: Evaluasi komposisi kimia bahan pakan standar (tepung rebon dan tepung tapioka) dan *Chaetoceros seratosporum* kering. Tahap ini meliputi penentuan Kadar air dengan oven, Protein dengan metode Kjeldhal, lemak dengan metode soxhlet, abu dengan metode pengabuan sampai suhu 600°C.

Formulasi pakan untuk udang windu (*Penaeus monodon* Fab.) memanfaatkan *Chaetoceros seratosporum* yang telah diketahui komposisi kimianya dengan berbagai dosis. Tahap II adalah uji formula pakan skala Laboratorium untuk respon imun (*Penaeus monodon* Fab.) dengan metode eksperimen dengan rancangan acak lengkap.

Tahap I

Membuat formula pakan dengan kadar protein 39.02% dan kadar energi 3.58 kkalg⁻¹ pakan sesuai hasil penelitian terdahulu [11] sebagai formula pakan dasar dan memanfaatkan *Chaetoceros ceratosporum* sebagai salah satu bahan dalam formula pakan dengan jumlah yang berbeda (Tabel 1 dan 2). Analisis proksimat ulang pakan membuat ukuran pakan sesuai ukuran udang (*crumble*).

Tabel 1. Komposisi bahan pakan percobaan

Analisis	Tepung Rebon	Tepung Plankton	Tepung Tapioka
Kadar Kering (%)*	86,34	85,38	89,4
Protein (%)*	62,98	3,99	-
Lemak (%)*	1,59	0,29	-
Kadar Abu (%)*	17,05	66,84	0,59
Serat Kasar (%)*	3,01	2,61	-
BETN **	15,37	26,26	99,41
Energi (kkal/gr) **	327,69	123,65	397,64

Keterangan :

* : Hasil Analisis Laboratorium Pengujian Mutu dan Keamanan Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya

** : BETN = 100 – Protein – Lemak - Kadar Abu - Serat Kasar.

*** : Energi = (4 x Protein) + (9 x Lemak) + (4 x BETN).

Tabel 2. Formula pakan pakan percobaan udang windu (*Penaeus monodon* Fab.)

Bahan	Perlakuan			
	A (0%)	B (3,04%)	C (6,08)	D (9,12%)
Tepung rebon	61,96	61,96	61,96	61,96
Tepung tapioka	15,77	14,38	13,88	12,93
Tepung <i>C. ceratosporum</i>	-	3,04	6,08	9,12
Minyak ikan	3,75	3,75	3,75	3,75
Minyak jagung	6,50	6,50	6,50	6,50
Vitamin miks	2,70	2,70	2,70	2,70
Mineral miks	2,00	2,00	2,00	2,00
CMC	7,32	5,22	3,13	1,02
Total	100	100	100	100

Tahap II

Uji *in vivo* pakan percobaan

Udang windu (rata-rata 21.51 ± 0.95 g/ekor) diperoleh dari petani tambak dusun Kepperan, Desa Pecinan, Kecamatan Mangaran Kabupaten Situbondo dan dipilih udang yang sehat. Udang windu dipelihara pada akuarium berukuran $45 \times 45 \times 45 \text{ cm}^3$ yang diisi air bersalinitas 30 ppt setinggi 30 cm. Masing-masing akuarium diisi 4 ekor udang.

Pada percobaan ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan formula pakan yang memanfaatkan *Chaetoceros seratosporum* dalam formula pakan dengan jumlah yang berbeda (Tabel 2). Perlakuan A = 0%; B = 3.04% C = 6.08%; D = 9.12%. Masing-masing perlakuan diulang 3 kali. Jumlah pemberian pakan 3% berat badan per hari yang diberikan pada pukul 08.00 WIB, 16.00 WIB, dan 21.00 WIB, masing-masing sebanyak 30%, 30% dan 40% dari jumlah pemberian per hari. Lama pemeliharaan 30 hari. Penempatan akuarium percobaan dapat dilihat pada Gambar 1.

D	A	C	B	A	B	C	D	B	C	A	D
2	3	1	3	1	2	3	3	1	2	2	1

Gambar 1. Penempatan akuarium percobaan

Keterangan: A, B, C, D = perlakuan
1,2,3 = ulangan

Setelah *P. monodon* dipelihara selama 30 hari, dilakukan pemaparan *V. harveyi* yaitu dengan cara menginjeksikan 10^6 sel ml^{-1} bakteri sebanyak 50 μl secara intramuscular /IM pada bagian ventral di antara abdomen ke 2 dan 3. Pada akhir percobaan pada masing-masing perlakuan sebelum dan sesudah infeksi *Vibrio harveyi* dilakukan pengambilan hemolim udang menggunakan spet (1ml#26) yang telah berisi antikoagulan 10% sodium citrat, pH 7.2 dengan perbandingan hemolim dan antikoagulan 1:1 di bagian kaki jalan ketiga. Selanjutnya hemolim ini digunakan untuk pengamatan terhadap Total Hemosit (*Total Haemocyte Count/THC*), *Differential Haemocyte Count (DHC)* yang terdiri dari sel hyalin (H), sel semi granular (SG) dan sel granular (G); dan Aktivitas *Vibriocidal*.

Kultur Bakteri *Vibrio harveyi*

Sterilisasi ose lengkung dengan pemanasan di atas bunsen hingga pijar. Setelah ose dipastikan dingin diambil bakteri *Vibrio* dari stock dengan cara menyentuhkan ujung ose pada stock. Goreskan di permukaan media TCBSA, dengan metode *streaking* kuadran untuk mendapatkan koloni terpisah. Inkubasikan media 30°C selama 24 jam. Koloni murni yang tumbuh diidentifikasi ulang untuk memastikan spesies bakteri. Setelah terbukti spesies *Vibrio harveyi*, dilakukan kultur pengkayaan untuk memproduksi dalam jumlah yang besar.

Prosedur Pengkayaan

Dengan ose steril ambil koloni murni, masukkan ke dalam erlemeyer yang berisi media cair TSB+. Tutup erlemeyer kembali dengan kapas steril, masukkan ke dalam *shaker waterbath*. Inkubasikan pada suhu 30°C dengan kecepatan *shaking* 100 rpm selama 2 x 24 jam. Amati hasil kultur pastikan tidak ada kontaminasi dengan pewarnaan gram dan dilihat di bawah mikroskop. Kemudian kepadatan bakteri kultur ditera dengan Mc Farland. Dari hasil pengukuran OD (*Optical Density*) dilakukan pengenceran sesuai dengan kepadatan bakteri yang diinginkan.

Persiapan Plasma Supernatant (PS) dan Haemocyte Lysate Supernatant (HLS)

Untuk mendapatkan HLS dilakukan menggunakan metode Sahoo et al. [12]. Hemolim sebanyak 200 µL diambil menggunakan mikropipet kemudian masukkan ke tabung eppendorf 1,5 ml. Hemolim selanjutnya disentrifuse pada 2.300 rpm suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan diambil sebagai plasma supernatant (PS), kemudian pelet ditambahkan 0,01 M Phosfat Buffer Saline (PBS) pH 7,0 sebanyak 100 µL dan disentrifuse kembali pada 2.300 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, pelet yang didapatkan diresuspensi dengan 0,01 M PBS pH 7,0 sebanyak 1 ml dilanjutkan dengan homogenisasi dan sentrifuse pada 4.000 rpm suhu 4°C selama 30 menit. PS dan HLS yang

didapatkan disimpan pada suhu 4°C sebelum digunakan untuk uji aktivitas vibriocidal.

Hemosit

Total Haemocyte Count (THC) dihitung menggunakan *haemocytometer* dengan bantuan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 x sebagai berikut:

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

Pengamatan jumlah sel differensial hemosit (hyalin, semi granular dan granular) dalam persentase berdasarkan kriteria morfologi dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 1.000 X [2].

Aktivitas Vibriocidal

Aktivitas vibriocidal diukur menurut prosedur modifikasi [13]. *Vibrio harveyi* dikultur pada *Tryptic Soy Broth* (TSB) pada suhu 30°C selama 24 jam. Bakteri disentrifuse kecepatan 4.000 rpm, selama 20 menit pada suhu 4°C dan dicuci dengan PBS dan diresuspensi sampai volume semula. 1 µl suspensi bakteri ditambahkan ke 100 µl PS atau HLS udang kemudian diinkubasi selama 1 jam. Selanjutnya diencerkan sampai 100 kali dengan PBS dan dikultur pada media agar (TSA) setelah 24 jam pada 30°C, koloni yang tumbuh dihitung. Persentase penghambatan dihitung dengan rumus:

$$= 100 - \left[\frac{\text{cfu/ml pada udang yang telah mendapat perlakuan}}{\text{cfu/ml pada udang yang tidak mendapat perlakuan}} \right] 100\%$$

Data total Hemosit, sel hyalin, sel semi granular, sel granular dan aktivitas *vibriocidal*, dianalisis menggunakan sidik ragam. Responnya diuji dengan uji F [14].

HASIL DAN PEMBAHASAN

Total Hemosit (Total Haemocyte Count/THC)

Berdasarkan hasil pengamatan Total Hemosit udang windu (*Penaeus monodon* Fab.) setelah dipelihara selama 30 hari dengan pakan percobaan sebelum dan sesudah diinfeksi *V. harveyi* adalah seperti yang tertera pada Tabel 3.

Tabel 3. Total hemosit udang windu (*Penaeus monodon* Fab.) pasca diberi pakan percobaan sebelum dan sesudah diinfeksi *V. harveyi*

Perlakuan	Total Hemosit (10^6 sel ml^{-1})	
	Sebelum infeksi <i>V. harveyi</i>	Sesudah infeksi <i>V. harveyi</i>
A	35,40 ± 4,15a	20,93 ± 2,03a
B	60,75 ± 3,030c	48,37 ± 2,36c
C	66,85 ± 0,30d	59,03 ± 0,20d
D	50,98 ± 2,30b	39,88 ± 2,39b

Keterangan: Notasi yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan, sedangkan notasi yang berbeda menunjukkan ada perbedaan antar perlakuan pada taraf kepercayaan 95%.

Dari Tabel 3 terlihat bahwa perlakuan jumlah *C. ceratosporum* dalam formula pakan memberikan pengaruh terhadap total hemosit udang windu yang dipelihara selama 30 hari dengan pakan percobaan, sebelum diinfeksi dan sesudah diinfeksi *V. harveyi*. Masing-masing antar perlakuan A, B,C, dan D berbeda .

Hubungan antara jumlah *C. ceratosporum* dalam formula pakan (X) dengan total hemosit udang windu (Y) sebelum diinfeksi berpola kuadratik dengan persamaan:

$$Y = -1,115 X^2 + 11,90 X + 35,26; R^2 = 0,95$$

Dari persamaan tersebut diperoleh bahwa jumlah *C. ceratosporum* yang menghasilkan total hemosit tertinggi sebesar $67,05 \times 10^6$ sel/ml pada udang windu adalah 5,34% dalam formula pakan.

Hubungan antara jumlah *C. ceratosporum* dalam formula pakan (X) dengan total hemosit udang windu (Y) sesudah diinfeksi berpola kuadratik dengan persamaan:

$$Y = -1.260 X^2 + 13.71 X + 20.28; R^2 = 0,90$$

Dari persamaan tersebut diperoleh bahwa jumlah *C. ceratosporum* dalam formula pakan yang menghasilkan total hemosit tertinggi sebesar $57,59 \times 10^6$ sel/ml pada udang windu adalah 5.44%.

Total Hemosit Differensial (Differential Haemocyte Count/DHC)

Berdasarkan hasil pengamatan Total Hemosit Differensial (sel hyalin, semi granular dan granular) pada udang windu (*Penaeus monodon* Fab.) setelah dipelihara selama 30 hari dengan pakan percobaan sebelum dan sesudah diinfeksi *V. harveyi* adalah seperti yang tertera pada Tabel 4.

Dari Tabel 4 terlihat bahwa perlakuan jumlah *C. ceratosporum* dalam formula pakan tidak memberikan pengaruh terhadap total sel hyalin udang windu yang dipelihara selama 30 hari dengan pakan percobaan, sebelum diinfeksi dan sesudah diinfeksi *V. harveyi*.

Tabel 4. Total sel Hyalin (H), Semi Granular(SG) dan Granular (G) udang windu (*Penaeus monodon* Fab.) pasca diberi pakan percobaan sebelum dan sesudah diinfeksi *V. harveyi*

Hemosit Differensial	Perlakuan			
	A	B	C	D
Sebelum diinfeksi				
Total sel H (%)	30 ± 5 a	26,33 ± 3,21a	23±1,73a	26,67±1,15a
Total sel SG (%)	26,33±4,16c	13,33±5,69a	11,00±2,00a	20,00±1,73b
Total sel G (%)	43,67±3,51a	60,33±2,52a	66,00±1,00b	53,33±2,89a
Sesudah diinfeksi				
Total sel H (%)	28,67±5,03a	35,00±3,00a	32,67±2,52a	30,00±2,00a
Total sel SG (%)	35,33±5,13c	10,00±5,00a	3,00±2,65a	19,67±0,58b
Total sel G (%)	36.00±1.73a	55.00±2.00b	64,33±0,58c	50,67±1,15b

Total sel semi granular udang windu sebelum infeksi *V. harveyi* pada perlakuan A berbeda dengan B, C, dan D, namun B dan C tidak berbeda.

Hubungan antara jumlah *C. ceratosporum* dalam formula pakan (X) dengan total sel semi granular udang windu (Y) sebelum diinfeksi berpola kuadrat dengan persamaan:

$$Y = 0,595 X^2 - 6,129 X + 26,36; R^2 = 0,76$$

Dari persamaan tersebut diperoleh bahwa jumlah *C. ceratosporum* dalam formula pakan yang menghasilkan total sel semi granular terendah sebesar 10,58% pada udang windu adalah 5,15%.

Hubungan antara jumlah *C. ceratosporum* dalam formula pakan (X) dengan total sel semi granular udang windu (Y) sesudah diinfeksi berpola kuadrat dengan persamaan:

$$Y = 1,136 X^2 - 12,13 X + 35,60; R^2 = 0,76$$

Dari persamaan tersebut diperoleh bahwa jumlah *C. ceratosporum* dalam formula pakan yang menghasilkan total sel semi granular terendah sebesar 3,18 % pada udang windu adalah 5,34%.

Total sel granular udang windu sebelum infeksi *V. harveyi* pada perlakuan C berbeda dengan B, C, dan D, sedangkan A, B dan D tidak berbeda.

Hubungan antara jumlah *C. ceratosporum* dalam formula pakan (X) dengan total sel granular udang windu (Y) sebelum diinfeksi berpola kuadrat dengan persamaan:

$$Y = -0,793 X^2 + 8,377 X + 43,3; R^2 = 0,99$$

Dari persamaan tersebut diperoleh bahwa jumlah *C. ceratosporum* dalam formula pakan yang menghasilkan total sel granular tertinggi sebesar 65,41% pada udang windu adalah 5,28%.

Total sel granular udang windu sesudah infeksi *V. harveyi* pada perlakuan C berbeda dengan B, C, dan D, namun B dan D tidak berbeda.

Hubungan antara jumlah *C. ceratorporum* dalam formula pakan (X) dengan total sel granular udang windu (Y) sesudah diinfeksi berpola kuadrat dengan persamaan:

$$Y = -0,833 X^2 + 9,813 X + 35,33, R^2 = 0,92$$

Dari persamaan tersebut diperoleh bahwa jumlah *C. ceratosporum* dalam formula pakan yang menghasilkan total sel granular tertinggi sebesar 62,58% pada udang windu adalah 5,55%.

Aktivitas *Vibriocidal*

Berdasarkan hasil uji aktivitas *vibriocidal* pada *Plasma Supernatan* (PS) dan *Haemocyte Lysate Supernatant* (HLS) udang windu (*Penaeus monodon* Fab.) setelah dipelihara selama 30 hari dengan pakan percobaan dapat dilihat pada Tabel 5.

Dari Tabel 5 terlihat bahwa perlakuan jumlah *C. ceratosporum* dalam formula pakan memberikan pengaruh terhadap aktivitas *vibriocidal* pada PS dan HLS udang windu yang dipelihara selama 30 hari dengan pakan percobaan.

Tabel 5. Aktivitas *Vibriocidal* pada PS dan HLS udang windu (*Penaeus monodon* Fab.)

Perlakuan	Aktivitas <i>Vibriocidal</i> (%)	
	PS	HLS
A (0 %)	Oa	Oa
B (3,04 %)	68,12 ± 0,96b	77,71±5,79b
C (6,08 %)	84,85 ± 3,11c	88,35±1,19c
D (9,12 %)	69,39 ± 1,47c	84,14±0,72b

Keterangan: Notasi yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan, sedangkan notasi yang berbeda menunjukkan ada perbedaan antar perlakuan pada taraf kepercayaan 95%.

Aktivitas *vibriocidal* pada PS udang windu menunjukkan bahwa perlakuan C berbeda dengan A dan B tetapi tidak berbeda dengan D, sedangkan pada HLS perlakuan C berbeda dengan A, B dan D, namun B dan D tidak berbeda.

Hubungan antara jumlah *C. ceratorporum* dalam formula pakan (X) dengan aktivitas *vibriocidal* pada PS udang windu (Y) berpola kuadrat dengan persamaan:

$$Y = -2,263 X^2 + 28,04 X + 0,956; R^2 = 0,99$$

Dari persamaan tersebut diperoleh bahwa jumlah *C. ceratosporum* dalam formula pakan yang menghasilkan aktivitas *vibriocidal* tertinggi sebesar 87,85% pada PS udang windu adalah 6,20%.

Hubungan antara jumlah *C. ceratorporum* dalam formula pakan (X) dengan aktivitas *vibriocidal* pada HLS udang windu (Y) berpola kuadrat dengan persamaan:

$$Y = -2,216 X^2 + 28,86 X + 2,610; R^2 = 0,97$$

Dari persamaan tersebut diperoleh bahwa jumlah *C.ceratosporum* dalam formula pakan yang menghasilkan aktivitas *vibriocidal* tertinggi sebesar 96,60% pada HLS udang windu adalah 6,51 %.

Pembahasan

Total hemosit udang windu (Tabel 4) menunjukkan bahwa perlakuan pemanfaatan *C. ceratosporum* dalam formula pakan lebih tinggi daripada tanpa *C. ceratosporum*. Berdasarkan hasil penelitian hemosit udang windu tertinggi sebesar $67,05 \times 10^6$ sel/ml diperoleh pada perlakuan pemanfaatan *C. ceratosporum* dalam formula pakan sebesar 5,34 %. Total hemosit yang diperoleh pada penelitian ini sesuai dengan yang diperoleh van de Braak *et al.* [15] yaitu sebesar $50,9 \times 10^6 \pm 17,7 \times 10^6$ sel/ml. Hasil ini sejalan dengan penelitian Yeh *et al.* [16] yang menunjukkan bahwa terjadi peningkatan jumlah hemosit pada udang putih (*Litopenaeus vannamei*) pasca pemberian ekstrak *Sargassum duplicatum* baik melalui perendaman maupun injeksi.

Hemosit disintesis oleh oleh jaringan *hematopoietic* yang merupakan sepasang *epigastric nodule*. Produksi tersebut dilakukan untuk mencapai keadaan homeostatis pasca introduksi imunostimulan. Jaringan tersebut terletak tepat di bagian dorsal pada lambung bagian depan (*anterior stomach*), merupakan tempat sintesa hemocyanin. Bila imunostimulan dapat meningkatkan hemocyanin, maka secara langsung akan terjadi pula peningkatan hemosit [17].

Setelah uji tantang dengan bakteri *Vibrio harveyi* selama 24 jam, terjadi penurunan jumlah hemosit pada semua perlakuan dengan rerata untuk perlakuan pemanfaatan *C. ceratosporum* dalam formula pakan lebih tinggi daripada tanpa *C. ceratosporum*. Nilai tertinggi diperoleh pada perlakuan 5,44% dengan total hemosit sebesar $57,59 \times 10^6$ sel ml⁻¹. Hal ini sesuai dengan van de Braak [2] bahwa total hemosit menurun setelah diinfeksi bakteri *Vibrio anguillarum*. Selama periode pembersihan bakteri dari sirkulasi, THC lebih rendah, hal ini menandakan adanya aktivitas pertahanan.

Jumlah hemosit udang dapat menurun apabila kondisi lingkungan memburuk, misalnya rendahnya kandungan oksigen terlarut, suhu dan salinitas, atau terdapatnya serangan patogen [1]. Selanjutnya hemosit baru perlu pengganti dan diproduksi secara proporsional dan diyakini bahwa hemosit dikeluarkan secara kontinyu,

walaupun pada laju yang bervariasi, dari jaringan hematopoietik. Jaringan tersebut telah diidentifikasi pada beberapa spesies krustase.

Saat terjadinya serangan patogen, sel hemosit akan melakukan proses degranulasi, *cytotoxicity* dan lisis terhadap material tersebut. Dengan demikian jumlah sel hemosit yang beredar dalam hemolim akan terlihat menurun. Hasil proses degranulasi adalah pelepasan *peroxinectin* yang akan memicu munculnya fagositosis [17].

Lectin atau agglutinin adalah protein pada hemolim yang memiliki peranan penting saat terdapatnya antigen yang masuk ke dalam tubuh. Komponen ini akan berikatan dengan karbohidrat yang terdapat pada dinding sel patogen atau benda asing yang disebut sebagai *agglutinas*. Reaksi akan diikuti dengan eliminasi benda asing tersebut melalui proses fagositosis, melanisasi oleh enzim phenoloksidase dan lonjakan respirasi (*respiratory burst*) [1].

Hemosit memiliki peran yang penting pada sistem pertahanan imunitas. Pertama, hemosit menghancurkan partikel/benda asing dalam *haemacoel* melalui fagositosis, enkapsulasi, agregat nodulasi, melanisasi, cytotoxicitas dan komunikasi antar sel [3, 4,18]. Kedua, hemosit memiliki andil dalam penanganan luka lewat reaksi seluler dan yang mengawali proses koagulasi dengan membawa dan melepaskan sistem *prophenoloksidase* (proPO). Ketiga, hemosit terlibat dalam pembentukan dan perombakan molekul-molekul penting dalam hemolim seperti α_2 -macroglobulin (α_2M), agglutinin dan peptide antimicrobial.

Pada kasus ini, udang yang diberi pakan yang mengandung *C. ceratosporum* terbukti meningkatkan jumlah THC udang windu. Seiring dengan peningkatan total hemosit udang, sistem kekebalan tubuh udang juga akan meningkat sehingga tingkat serangan infeksi bakteri *V. harveyi* dapat tereduksi. Namun demikian, ketika pemberian pakan yang mengandung *C. ceratosporum* melebihi batas kemampuan tubuh untuk meresponnya justru akan menjadi imunostresor yang dapat menurunkan sistem kekebalan tubuh udang.

Berdasarkan pengamatan total differensial hemosit (Tabel 5) terlihat bahwa secara keseluruhan nilai paling tinggi adalah sel granular, diikuti Sel hyalin dan sel semi granular. Total sel Hyalin untuk semua perlakuan tidak berbeda. Total sel semi granular terendah sebesar 10,58% pada perlakuan pemanfaatan *C. ceratosporum* sebesar 5,15%, sedangkan total

sel granular tertinggi sebesar 65,41% diperoleh pada perlakuan pemanfaatan *C. ceratosporum* sebesar 5,34%.

Setelah 24 jam diinfeksi dengan *V. harveyi* sejalan dengan penurunan total hemosit, total differensial hemosit juga mengalami penurunan. Seperti halnya sebelum diinfeksi, total sel Hyalin untuk semua perlakuan tidak berbeda. Total sel semi granular terendah sebesar 3,18 % pada perlakuan pemanfaatan *C. ceratosporum* sebesar 5,34 %, sedangkan total sel granular tertinggi sebesar 62,58 % diperoleh pada perlakuan pemanfaatan *C. ceratosporum* sebesar 5,55%.

Hal tersebut menandakan bahwa yang banyak berperan adalah sel granular dibandingkan sel hyalin dan sel semigranular. Sel semi granular merupakan pematangan dari sel hyalin yang ketika terjadi serangan patogen maka yang berperan pertama adalah sel hyalin, sehingga sel ini tidak berkembang menjadi sel semi granular dan terlihat penurunan jumlah sel semi granular yang terdapat dalam hemosit [2]. Sel semigranular berperan utama dalam proses enkapsulasi dan sedikit dalam proses fagositosis.

Sel semi granular dikarakteristikan dengan terdapatnya granula pada sitoplasma. Sel ini mampu merespon polisakarida dari dinding sel bakteri atau β -glukan yang berasal dari jamur. Sel semi granular ini dapat melakukan proses enkapsulasi dan sedikit berperan dalam proses fagositosis [3]. Enkapsulasi adalah merupakan reaksi pertahanan melawan partikel dalam jumlah yang besar dan tidak mampu difagosit oleh sel hemosit [19].

Fungsi sel granular lebih pada proses menghasilkan enzim phenoloksidase yang memiliki peranan penting dalam sistem pertahanan non spesifik. Supamattaya [1] menjelaskan granula pada sel granular hemosit terdiri dari propenoloksidase. Dalam aktivasi prophenoloksidase (proPO) akan membebaskan suatu enzim dari sel granular. Sistem ini juga dipacu oleh adanya komponen mikrobial seperti β -glukan.

Proses prophenoloksidase bertanggung jawab terhadap produksi dan sekresi metabolit toksik seperti *quinon*. Produk akhir dari sistem ini adalah munculnya *blackish nodules* yang biasanya berada di sekitar insang atau eksoskeleton. Saat terjadinya serangan patogen, sel granular dan semi granular akan melakukan proses degranulasi, *cytotoxicity* dan lisis terhadap material tersebut dengan demikian jumlah sel granular yang beredar dalam hemolim akan mengalami penurunan. Hasil proses degranulasi

adalah pelepasan *peroxinectin* yang akan memicu munculnya fagositosis.

Sejalan dengan tingginya total hemosit pada udang windu diikuti dengan tingginya Aktivitas *vibriocidal* pada PS dan HLS udang windu (Tabel 5). Nilai tertinggi sebesar 87,85 % pada PS udang windu diperoleh pada perlakuan pemanfaatan *C. ceratosporum* sebesar 6,20%, sedangkan Nilai tertinggi sebesar 96,60% pada HLS udang windu diperoleh pada perlakuan pemanfaatan *C. ceratosporum* sebesar 6,51%. Hal ini menunjukkan bahwa dengan semakin meningkatnya total hemosit maka aktivitas *vibriocidal* juga meningkat. Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian Devaraja [5] yang membuktikan bahwa pemanfaatan 0,2% glukan dari yeast + 10% *bacterin* melalui pakan dapat meningkatkan aktivitas *vibriocidal* pada udang windu, namun pada dosis yang melebihi nilai tersebut hasilnya menurun. Pada penelitian lain diperoleh informasi bahwa penggunaan ekstrak β -glukan dari *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 dan ditambahkan ke dalam pakan dapat meningkatkan total hemosit (THC), aktivitas *vibriocidal* dan ketahanan terhadap serangan bakteri [20].

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemanfaatan diatomae *Chaetoceros ceratosporum* dalam formula pakan dapat meningkatkan respon imun seluler, dan dosis terbaik berkisar 5,15%-6,51% dalam formula pakan.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Supamattaya K., Chittivan N. and Boonyaratpalin M. 2000. Immunological factors in black tiger shrimp, *Penaeus monodon Fabricus*. <http://aquafeed.com/docs/ns/Supamattayaetal.pdf>.
- [2] Van de Braak C.B.T. 2002. Haemocytic defence in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. PhD Thesis. Wageningen University. The Netherland. 159pp.
- [3] Johansson M.W., Keyser P., Sritunyalucksana K. and Söderhäll K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 191:45–52.
- [4] Rodriguez J., and Le Moullac G. 2000. State of the art of immunological tools and health control of Penaeid Shrimp. *Aquaculture*, 191: 109–119.
- [5] Devaraja T.N., Otta S.K., Shubha G., Karunasagar I., Tauro P., Karunasagar I.

1998. Immunostimulation of shrimp through oral administration of *Vibrio* bacterin and Yeast Glucan. Flegel T.W. (Ed.). *Advances in Shrimp Biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok. 167-170.
- [6] Kartikaningsih H., Ekawati A.W., Sukoso, Haryanti dan Zafran. 1999. Penggunaan fitoplankton *Chaetoceros ceratosporum* kering untuk menghambat perkembangan bakteri *Vibrio harveyi*. ARMP. 1998/1999.
- [7] Kartikaningsih H., Ekawati A.W., Haryanti dan Rosa. 2000. Penggunaan fitoplankton *Chaetoceros ceratosporum* kering untuk menghambat perkembangan bakteri *Vibrio harveyi*. ARMP. 1999/2000.
- [8] Storseth T.R., Hansen K., Skejermo J. and Krane J. 2004. Characterization of a β -D-(1-3)-glucan from marine diatom *Chaetoceros mulleri* by high-resolution magic-angle spinning NMR spectroscopy on whole algal cells. *Carbohydrate Res.*, 339:421-424
- [9] Storseth T.R., Hansen K., Reitan K.I. and Skejermo J. 2005. Structural characterization of β -D-(1-3)-glucans from different growth phases of the marine diatoms *Chaetoceros mulleri* and *Thalassiosira weissflogii*. *Carbohydrate Res.*, 240: 1159-1164.
- [10] Storseth T.R., Kirkvold S., Skjermo J. and Reitan K.I. 2006. A branched β -D-(1-3,1-6)-glucan from the marine diatom *Chaetoceros debilis* (Bacillariophyceae) characterized by NMR. *Carbohydrate Res.*, 341: 2108-2114.
- [11] Ekawati A.W. 1990. Pengaruh kadar protein pakan terhadap pertumbuhan pascalarva udang windu (*Penaeus monodon* Fab.). Tesis. FPS, Institut Pertanian Bogor, Bogor. 71 hal.
- [12] Sahoo B., Sethi S., Mishra B.K. and Das B.K. 2005. Effects elicitors on prophenoloxidase and superoxide anion activities of freshwater prawn, *Macrobrachium malcolmsonii*. *Asian Fish. Sci.*, 18:345-353.
- [13] Adams A. 1991. Response of penaeid shrimp to exposure to vibrio species. *Fish and Shellfish Immunology*, 1: 59-70.
- [14] Snedecor G.W. and Cochran W.G. 1980. Statistical methods (7th Ed.). The Iowa State Univ. Press. Iowa. 507p.
- [15] Van de Braak K., Faber F. and Boon J.H. 1996. Cellular and humoral characteristics of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) haemolymph. *Comp. Haematol. Internat.*, 6: 194-203.
- [16] Yeh S.T., Chiu S., Lee C. and Jiann C. 2006. Administration of hot-water extract of brown seaweed *Sargassum duplicatum* Via immersion and injection enhances the immune resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 20: 332-345.
- [17] Effendy S., Alexander R. dan Akbar T. 2004. Peningkatan haemosit benur udang windu (*Penaeus monodon* Fabricius) pasca perendaman ekstrak ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) pada konsentrasi yang berbeda. *Jurnal Sains dan Teknologi*, 14(2): 46-53.
- [18] Sordehall K. and Cerenius L. 1998. Role of prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 10: 23-28.
- [19] Danwattananusorn T. 2009. Studies on peptidoglycan induced immune-related genes of Kuruma Shrimp *Marsupenaeus japonicus*. PhD Thesis. Graduate School of Marine Science and Technology Tokyo University of Marine Science and Technology Doctoral Course of Applied Marine Biosciences. 7-18.
- [20] Sittipun M., Hangpongkittikul A. and Supamattaya K. 2000. Immunostimulant and vaccination in Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius: I. Extraction of beta-glucan from yeast and its application in *Penaeus monodon* Fabricius. *Songklanarin J. Sci. Technol.*, 22 (Suppl.): 653-662.

Regenerasi Kalus Berfilamen Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii* Pada berbagai Perbandingan Zat Pengatur Tumbuh Auksin (Indole Acetic Acid) dan Sitokinin (Kinetin, Zeatin)

Sri Redjeki Hesti Mulyaningrum^{1*}, Andi Parenrengi², Yenny Risjani¹, Happy Nursyam¹

¹Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang

²Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau, Maros, Sulawesi Selatan

Abstrak

Interaksi auksin-sitokinin dianggap penting untuk mengatur pertumbuhan dan perkembangan dalam jaringan tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan komposisi auksin dan sitokinin yang tepat untuk regenerasi filamen kalus rumput laut *K. alvarezii*. Kultur filamen kalus dilakukan pada media cair dengan formulasi ZPT indole acetic acid (IAA) : kinetin : zeatin, dengan komposisi konsentrasi sebagai berikut : A (0,4:0:1) ppm; B (0,4:0,25:0,75) ppm; C (0,4:0,5:0,5) ppm; D (0,4:0,75:0,25) ppm; E (0,4:1:0) ppm; kontrol (tanpa ZPT). Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap dengan pengulangan masing-masing perlakuan 3 kali. Parameter yang diamati adalah laju pertumbuhan harian, sintasan, kecepatan regenerasi, panjang tunas dan perkembangan morfologi. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa formula ZPT terbaik adalah formula A dengan laju pertumbuhan harian 1,929%/hari, sintasan 83,33%, kecepatan regenerasi 41,67% dan rata-rata panjang tunas 44,59 μm . Tunas mulai terbentuk pada 15 hari masa kultur.

Kata kunci: formula zat pengatur tumbuh, auksin-sitokinin, *K. alvarezii*, mikropropagasi

Abstract

Interaction of auxin-cytokinin was important for regulation of growth and development in tissue culture. This research aimed to determine the suitable formula of plant growth regulators on callus filament regeneration of seaweed *K. alvarezii*. The callus filament was cultured on liquid media with PGR formulation of indole acetic acid (IAA): kinetin: zeatin, with formulation: A (0,4:0:1) ppm; B (0,4:0,25:0,75) ppm; C (0,4:0,5:0,5) ppm; D (0,4:0,75:0,25) ppm; E (0,4:1:0) ppm; control (without PGR). Research was designed with completely randomized design with 3 replications of each treatment. Observed parameters were daily growth rate, survival rate, regeneration rate, length of shoots regenerated and morphology. The results showed that the best PGR formula was formula A with daily growth rate of 1.929%/day, survival rate of 83.33%, 41.67% of regeneration rate and average length of shoots of 44.59 μm . The shoots began to regenerate in 15 days culture.

Key words: auxin, cytokines, plant growth regulators, *K. alvarezii*, micropropagation

PENDAHULUAN

Rumput laut *K. alvarezii* merupakan salah satu komoditas prioritas karena memiliki beberapa keunggulan. Keunggulannya yaitu teknologi budidayanya mudah dilakukan, modal yang diperlukan dalam budidaya rumput laut relatif kecil, usia panen singkat sehingga merupakan komoditas yang cepat untuk mengatasi kemiskinan

serta kegiatan budidaya rumput laut hingga proses pengolahan pasca panen merupakan kegiatan yang padat karya. Sehingga rumput laut sering disebut komoditas yang memenuhi kriteria *triple track* : *pro job*, *pro poor* dan *pro growth*. Pada aspek budidaya mampu menjadi kunci pemberdayaan masyarakat pesisir, selain itu permintaan pasar dunia masih sangat tinggi [1].

Salah satu kendala dalam pengembangan budidaya rumput laut adalah keterbatasan benih yang kontinyu dan berkualitas. Apalagi untuk mendukung program strategi minapolitan dimana produksi perikanan sebesar 8 juta ton pada 2009 akan dipacu hingga 353% pada 2014 sehingga

* Alamat korespondensi:

Sri Redjeki Hesti Mulyaningrum

Email: titut_suryanto@yahoo.com

Alamat : Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang

ketersediaan benih rumput laut secara kontinyu dan berkualitas mutlak diperlukan.

Perkembangan mikropropagasi tanaman melalui teknik kultur organ, kultur jaringan dan kultur sel memberikan prospek yang menjanjikan bagi pengembangan bioteknologi tanaman, dan peluang yang besar pada manipulasi genetik, propagasi tanaman dan produksi tanaman komersil. Kesuksesan teknik-teknik mikropropagasi pada tumbuhan tingkat tinggi mendorong pengembangannya pada rumput laut yang secara umum bertujuan untuk meningkatkan ekonomi dengan peningkatan produksi rumput laut. Kultur jaringan rumput laut dengan menggunakan teknik induksi kalus banyak digunakan untuk propagasi klon dan perbaikan mutu genetik untuk mendukung ketersediaan benih yang kontinyu dan berkualitas [2].

Pembelahan sel diatur oleh aksi bersama auksin dan sitokinin, masing-masing mempengaruhi fase berbeda dari siklus sel. Auksin mempengaruhi replikasi DNA, sedangkan sitokinin tampaknya mengerahkan beberapa kendali atas kejadian yang menyebabkan mitosis dan sitokinesis. Dengan demikian, tingkat auksin dan sitokinin dalam kultur perlu seimbang dan secara hati-hati dikendalikan [3].

METODE PENELITIAN

Inisiasi dan proliferasi

Tujuan inisiasi dan proliferasi adalah untuk menyiapkan filamen kalus yang digunakan dalam penelitian. Induksi kalus dilakukan dengan metode Reddy *et al.* [4]. Sampel rumput laut dipotong dengan ukuran 2 cm. Kemudian mencuci eksplan dengan air laut steril. Selanjutnya melakukan sterilisasi eksplan dengan mencuci eksplan dengan 0,1% larutan detergen cair dalam air laut steril selama 10 menit. Eksplan kemudian diperlakukan dalam larutan iodine (bethadine 0,1%) dalam air laut steril selama 3 menit untuk menghilangkan mikroba. Sterilisasi eksplan dilanjutkan dengan 0,1% antibiotik mix spektrum luas kemudian dicuci air laut steril sampai 3 kali. Selanjutnya eksplan direndam pada larutan 0,1% antibiotik mix spektrum luas dalam media Conwy selama 2 hari.

Eksplan steril dikeringkan dengan tissue steril untuk mengurangi kelembaban, kemudian dipotong-potong sepanjang 4 – 5 mm. Eksplan kemudian diinokulasi dalam cawan petri pada

media agar 0,8% dalam media Conwy dengan kepadatan 20 eksplan/cawan petri. Pemeliharaan dilakukan di lemari kultur dengan suhu 20°C dengan penerangan lampu neon 1500 lux dengan fotoperiod L : D = 12 : 12 selama 60 hari atau hingga filamen kalus terbentuk. Inokulum disubkultur setiap 7 hari dengan media baru yang sama.

Perkembangan filamen kalus diamati dengan mikroskop (Bausch & Lomb). Gambaran kalus yang terbentuk dipotret dengan kamera digital (Optika Microscopes CCD Sensor).

Formulasi auksin dan sitokinin

Filamen kalus yang dihasilkan dikultur pada media cair Conwy yang diperkaya dengan ZPT auksin (IAA) dan sitokinin (kinetin dan zeatin) dengan formulasi sebagai berikut : A (0,4 : 0 : 1) ppm; B (0,4 : 0,25 : 0,75) ppm; C (0,4 : 0,5 : 0,5) ppm; D (0,4 : 0,75 : 0,25) ppm; E (0,4 : 1 : 0) ppm; kontrol (tanpa ZPT).

Kultur dilakukan selama 30 hari pada shaker dengan penerangan lampu neon berkekuatan 1500 lux, L : D 12 : 12 pada suhu 20°C. Setiap 15 hari dilakukan penggantian media dan pengamatan perkembangan morfologi. Pada akhir kultur dilakukan pengukuran laju pertumbuhan harian, sintasan, kecepatan regenerasi dan panjang tunas. Laju pertumbuhan harian dihitung dengan menimbang filamen kalus dan dihitung menggunakan rumus berikut :

$$\text{Growth Rate } (\% \cdot \text{hari}^{-1}) = 100 \frac{\ln W_t / W_0}{t}$$

dimana :

GR = Laju pertumbuhan harian
W_t = berat akhir filamen kalus
W₀ = berat awal filamen kalus
t = lama kultur

Sintasan diperoleh dengan menghitung filamen yang hidup. Adapun rumus sintasan adalah sebagai berikut :

$$\text{Survival Rate } (\%) = \left[\frac{N_t}{N_0} \right] 100\%$$

dimana :

SR = Survival rate (sintasan)
N_t = Jumlah filamen kalus yang hidup
N₀ = Jumlah filamen kalus awal

Sedangkan laju regenerasi diukur dengan metode Yokoya *et al.* [5] dengan menghitung

jumlah filamen kalus yang beregenerasi. Rumus laju regenerasi adalah sebagai berikut:

$$R (\%) = \left[\frac{F_r}{F_0} \right] 100\%$$

dimana :

R = Laju regenerasi (%)

Fr = Jumlah filamen kalus yang beregenerasi

F₀ = Jumlah filamen kalus awal

Panjang tunas diukur secara mikroskopis dengan mikroskop Olympus 1X71. Semua data yang diperoleh dianalisis dengan analisis ragam ANOVA, sedangkan data perkembangan morfologi disajikan secara deskriptif dari hasil pengamatan secara mikroskopis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

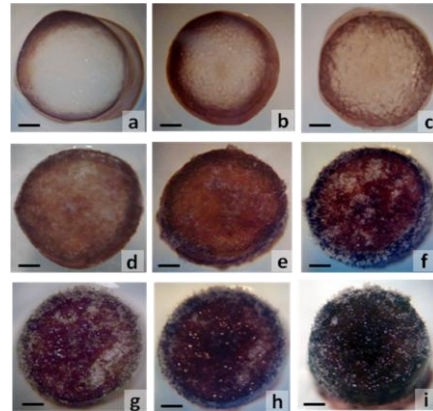
Inisiasi dan proliferasi

Hasil inisiasi dan proliferasi memperlihatkan bahwa induksi kalus dimulai dengan pigmentasi pada permukaan eksplan (kortikal) kemudian terbentuk kalus pada bagian tengah (medular) dan lapisan kortikal. Kalus berwarna coklat tua, dan terdiri dari filamen yang berasal dari pembelahan sel yang dihasilkan sebagai respon dari luka di permukaan irisan.

Filamen kalus mulai terbentuk pada umur pemeliharaan 21 hari. Hasil ini sama dengan penelitian Munöz *et al.* [6] dan Hayashi *et al.* [7] yang mendapati terbentuknya kalus *K. alvarezii* masing-masing setelah 16 hari dan 15 hari masa pemeliharaan. Waktu induksi ini lebih singkat dari waktu induksi rumput laut jenis *Halymenia sinensis* yang memerlukan waktu 50 hari untuk membentuk kalus [8]. Filamen berkembang pada sel medular rumput laut, pada bagian tengah sel medular terjadi pigmentasi yang merupakan bagian dari filamen kalus (Gambar 1).

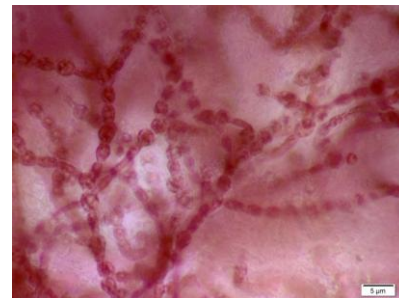
Filamen kalus yang terbentuk berupa filamen berbentuk kristal dan filamen kalus berpigmen. Menurut Munöz *et al.* [6], eksplan *K. alvarezii* memproduksi filamen kalus berbentuk kristal dan filamen kalus berpigmen. Sedangkan menurut Kumar *et al.* [9] pada *Turbinaria conoides* didapati filamen kalus dalam dua bentuk: (a) filamen kalus berserabut yang terbentuk pada pusat potongan eksplan, (b) filamen kalus yang berbentuk gelembung-gelembung. Sel filamen kalus yang dihasilkan dalam penelitian ini berbentuk bulat (Gambar 2). Pada dasarnya bentuk sel filamen kalus rumput laut ada dua macam, yaitu filamen

kalus *filiform* dengan bentuk memanjang dan filamen kalus *moniliform* yang berbentuk bulat [9].



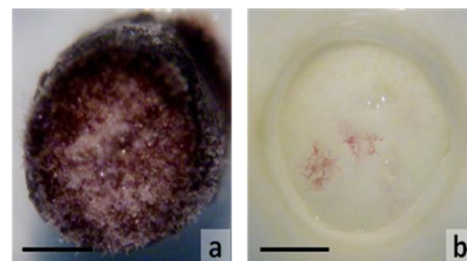
Gambar 1. Perkembangan kalus selama 60 hari pemeliharaan

skala bar = 10 µm; (a) awal inokulasi; (b) minggu ke-1; (c) minggu ke-2; (d) minggu ke-3; (e) minggu ke-4; (f) minggu ke-5; (g) minggu ke-6; (h) minggu ke-7; (i) minggu ke-8.



Gambar 2. Sel filamen kalus *moniliform* *K. alvarezii*
(skala bar = 5µm)

Filamen kalus yang embriogenik berwarna coklat tua karena mengalami pigmentasi, sedangkan filamen kalus yang tidak embriogenik berwarna pucat dan berakhir dengan kematian (Gambar 3).



Gambar 3. Filamen kalus rumput laut *K. alvarezii* : embriogenik (a) dan yang tidak embriogenik (b)
(skala bar = 20µm)

Menurut Rorrer dan Cheney [10] pembentukan kalus dimulai dengan pigmentasi pada daerah permukaan eksplan (kortikal) kemudian terbentuk filamen yang tidak terdiferensiasi pada eksplan dan berkembang menjadi tunas. Penambahan zat pengatur tumbuh IAA dapat menstimulasi pembentukan kalus yang akan membentuk filamen. Hal ini dapat dijelaskan karena zat pengatur tumbuh golongan auksin berperan dalam inisiasi pembelahan sel, dan organisasi dari meristem menjadi suatu jaringan tidak terorganisir – kalus [5,11].

Formulasi auksin dan sitokinin

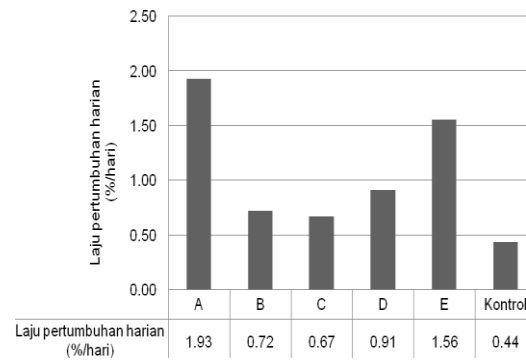
Laju pertumbuhan harian

Hasil pengamatan pertambahan bobot kalus rumput laut selama 30 hari pemeliharaan bervariasi dan semakin meningkat seiring dengan meningkatnya waktu pemeliharaan untuk semua perlakuan. Tampak bahwa pertambahan bobot tertinggi diperoleh pada perlakuan formula A sebesar 0,0347 g, kemudian disusul perlakuan E sebesar 0,0254 g, selanjutnya formula D, C, dan B masing-masing sebesar 0,0151 g, 0,0117, 0,0096 g, dan terendah dalam penelitian ini pada kontrol tanpa pemberian zat pengatur tumbuh yakni 0,0064 g (Tabel 1).

Kisaran laju pertumbuhan harian adalah 0,440 - 1,929%/hari (Gambar 4). Nilai ini lebih rendah dari hasil penelitian Huang *et al.* [12] yang memperoleh laju pertumbuhan harian mikroplantlet *Agardhiella subulata* pada kisaran 2 – 3%/hari.

Tabel 1. Rerata pertambahan bobot filamen kalus selama 30 hari pada setiap formulasi ZPT pemeliharaan

Formula ZPT	Berat awal	Berat akhir	Berat mutlak
A	0,0466 ± 0,0127	0,0813 ± 0,0074	0,0347 ± 0,0087
B	0,0408 ± 0,0068	0,0504 ± 0,0061	0,0096 ± 0,0018
C	0,0545 ± 0,0087	0,0662 ± 0,0042	0,0117 ± 0,0088
D	0,0488 ± 0,0142	0,0639 ± 0,00164	0,0151 ± 0,0044
E	0,0432 ± 0,0055	0,0686 ± 0,0043	0,0254 ± 0,0030
Kontrol	0,0442 ± 0,0097	0,0506 ± 0,0117	0,0064 ± 0,0020

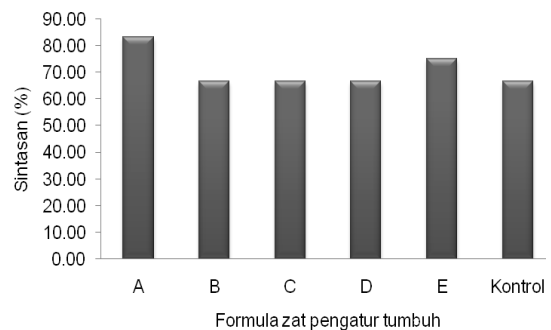


Gambar 4. Laju pertumbuhan harian filamen kalus pada berbagai formula ZPT

Sintasan

Uji keragaman (ANOVA) memperlihatkan bahwa penambahan zat pengatur tumbuh tidak memiliki efek yang signifikan terhadap sintasan ($P>0,05$) filamen kalus. Sintasan tertinggi pada formula A (83,33%) kemudian disusul formula E dengan sintasan sebesar (75%) sedangkan formula B, C dan D memiliki sintasan yang sama dengan kontrol (66,67%) (Gambar 5).

Kematian mulai terjadi pada minggu pertama kultur. Menurut Huang *et al.* [12], kematian dapat diakibatkan oleh kondisi filamen yang stres akibat pemindahan dari media padat ke media cair. Selain itu kematian juga bisa diakibatkan karena adanya guncangan *shaker* yang terus menerus selama kultur.



Gambar 5. Sintasan filamen kalus selama 30 hari pemeliharaan

Laju regenerasi

Laju regenerasi tertinggi dihasilkan pada formula A. Besarnya laju regenerasi untuk masing-masing formula adalah sebagai berikut : A

(41,67%); C (33,33%); E (33,33%); B(25%); D(25%) sedangkan kontrol tidak mengalami regenerasi (0%). Antara perlakuan A, B, C, D dan E tidak berbeda nyata namun semua perlakuan berbeda nyata dengan kontrol (Tabel 2).

Kisaran persentasi regenerasi filamen yang dihasilkan pada penelitian ini hampir sama dengan penelitian Mussio and Russig [13] yang memperoleh persentasi regenerasi filamen *Laminaria digitata* pada kisaran 2,5-50% dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D).

Hal ini memperlihatkan bahwa kombinasi zat pengatur tumbuh golongan auksin dan sitokinin dapat menstimulasi proses regenerasi filamen kalus rumput laut *K.alvarezii*. Terlihat bahwa golongan sitokinin jenis zeatin memiliki efek stimulasi lebih baik dibandingkan kinetin. Bradley and Cheney [14] berpendapat bahwa kombinasi auksin dengan zeatin memiliki efek regenerasi yang lebih tinggi dibandingkan kombinasi auksin dan kinetin. Perbedaan ini sangat dipengaruhi karakter dari zat pengatur tumbuh.

Tabel 2. Laju regenerasi filamen kalus rumput laut *K. alvarezii* pada berbagai formula ZPT

Formula ZPT	Laju regenerasi (%)
A	41,67a
B	25,00a
C	33,33a
D	25,00a
E	33,33a
Kontrol	0b

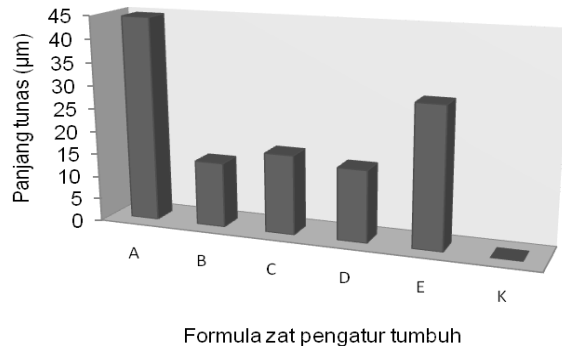
Keterangan: Nilai dalam baris yang sama diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata ($P > 0,05$).

Panjang tunas

Semua perlakuan formula zat pengatur tumbuh memiliki panjang tunas yang berbeda nyata dengan kontrol. Panjang tunas tertinggi diperoleh pada formula A ($44,59 \pm 4,68 \mu\text{m}$) yang berbeda nyata dengan formula E ($30,50 \pm 4,44 \mu\text{m}$); C ($17,33 \pm 5,01 \mu\text{m}$); D ($15,67 \pm 6,03 \mu\text{m}$); B ($14,33 \pm 6,66 \mu\text{m}$), dan kontrol (0). Formula E berbeda nyata dengan formula B, C, D dan kontrol. Sedangkan formula B, C dan D masing-masing tidak berbeda nyata (Gambar 6).

Dari hasil analisis keragaman (ANOVA) menunjukkan bahwa penggunaan formulasi zat pengatur tumbuh yang berbeda berpengaruh nyata antar perlakuan ($P < 0,05$). Hasil penelitian ini sesuai

dengan pendapat Yokoya dan Handro [15] yang menyatakan bahwa zat pengatur tumbuh dapat mengontrol pertumbuhan, proses morfogenesis dan mikropropagasi alga merah.



Gambar 6. Panjang rata-rata tunas rumput laut *K. alvarezii* pada berbagai formula ZPT

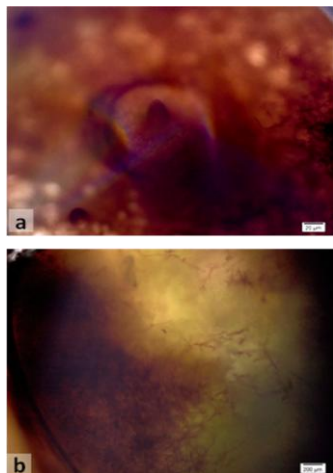
Perkembangan morfologi

Semua formula zat pengatur tumbuh kombinasi auksin dan sitokinin dalam penelitian ini memberikan efek regenerasi dan berpengaruh terhadap pertumbuhan rumput laut. Hal ini berbeda dengan kontrol yang tidak mengalami regenerasi. Konsentrasi sitokinin yang lebih tinggi daripada auksin dapat menstimulasi pembelahan sel dengan meningkatkan sintesis protein dan aktivitas metabolisme yang meningkatkan proses diferensiasi sel. Kombinasi auksin dan sitokinin mampu menstimulasi regenerasi filamen rumput laut menjadi tunas pada media cair serta memiliki peran regulasi dalam pertumbuhan dan morfogenesis [4,5,15].

Berdasarkan suatu hipotesis yang disebut hipotesis pertumbuhan asam (*acid growth hypothesis*), golongan auksin berperan dalam pembesaran sel. Zat pengatur tumbuh golongan auksin dapat memicu pompa proton untuk meningkatkan jumlah H^+ ke dalam sel sehingga sitoplasma sel menjadi lebih asam kemudian menyebabkan melonggarnya ikatan polisakarida pada dinding sel. Dengan demikian air dengan mudah berosmosis ke dalam sel dan menyebabkan sel mengalami pembesaran. Pembentukan tunas ditandai dengan memadatnya filamen dan kemudian beregenerasi membentuk tunas. Hal ini bisa teramati secara mikroskopis, filamen kalus yang memadat akan membentuk tunas. Sedangkan

pada kontrol tidak terjadi pepadatan filamen kalus sehingga tidak terbentuk tunas (Gambar 7) [3,12].

Tunas mulai terbentuk pada umur pemeliharaan 15 hari. Menurut Gaspar *et al.* [11] interaksi auksin-sitokinin dianggap penting untuk mengatur pertumbuhan dan perkembangan dalam jaringan tanaman dan kultur organ, karena kedua kelas hormon tersebut umumnya diperlukan oleh tumbuhan. Auksin dan sitokinin eksogen yang ditambahkan akan berinteraksi dengan hormon endogen tanaman. Selain itu, jaringan yang tidak responsif akan menanggapi aplikasi hormon eksogen tersebut. Auksin memiliki pengaruh yang kuat pada proses-proses seperti ekspansi pertumbuhan sel, pengasaman dinding sel, dan mempercepat diferensiasi vaskular. Banyak aspek pertumbuhan sel, diferensiasi sel, dan organogenesis dalam kultur jaringan dan organ tubuh ditemukan dikontrol oleh interaksi antara sitokinin dan auksin. Konsentrasi setiap zat pengatur tumbuh sangat bervariasi sesuai dengan jenis tanaman yang dikultur, kondisi kultur, dan bentuk zat pengatur tumbuh yang digunakan. Kombinasi auksin dan sitokinin memiliki efek stimulasi pada pembentukan kalus, pertumbuhan dan regenerasi [2].



Gambar 7. Morfologi tunas rumput laut *K. alvarezii* :
(a) Filamen kalus yang membentuk tunas (tanda panah); (b) filamen kalus yang tidak membentuk tunas.

KESIMPULAN DAN SARAN

Perbandingan zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin yang tepat dapat meningkatkan morfogenesis filamen kalus rumput laut *K. alvarezii*. Komposisi auksin dan sitokinin yang optimum bagi regenerasi filamen kalus rumput laut

K. alvarezii adalah IAA: zeatin dengan perbandingan 0,4 : 1. Perlu dilakukan kombinasi formula ZPT optimum dengan beberapa media kultur untuk meningkatkan laju regenerasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih yang sebesar-besarnya disampaikan kepada Ibu Dra. Emma Suryati, MSi dan saudari Siti Fadilla, S.Si. atas bantuannya selama pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Anggadiredja. 2007. Rumput Laut. Penebar Swadaya. Jakarta. 50-53.
- [2] Reddy C.R.K., Jha B. and Fujita Y. 2008. Seaweed micropropagation techniques and their potentials : an overview. *J. Appl. Phycol.*, 20: 609-617.
- [3] Dewi I.R. 2008. Peranan dan fungsi fitohormon bagi pertumbuhan tanaman. Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran Bandung. 36 hal.
- [4] Reddy C.R.K., R.K. Kumar, Siddhanta A.K. and Tewari A. 2003. In vitro somatic embryogenesis and regeneration of somatic embryos from pigmented callus of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty (Rhodophyta, Gigarti-nales). *J. Phycol.*, 39: 610-616.
- [5] Yokoya N.S., West J.A. and Luchi A.E. 2004. Effects of plant growth regulators on callus formation, growth and regeneration in axenic tissue cultures of *Gracilaria tenuistipitata* and *Gracilaria perplexa* (Gracilariales, Rhodophyta). *Phycol. Res.*, 52: 244-254.
- [6] Munõz J., López A.C.C., Patiño R. and Robledo D. 2006. Use of plant plant growth regulators in micropropagation of *kappaphycus alvarezii* (Doty) in airlift bioreactors. *J. Appl. Phycol.*, 18: 209-218.
- [7] Hayashi L., Yokoya N.S., Kikuchi D.M. and Oliveira E.C. 2008. Callus Induction and Micropropagation Improved By Colchicine and Phyto regulators in *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae). *J. Appl. Phycol.*, 20: 653 - 659.
- [8] Wang A., Li S. and Duan D. 2006. Filament induction in *Halymenia sinensis* (Halymeniaceae, Rhodophyta). *Bot. Marina*, 49: 352 - 354.

- [9] Kumar G.R., Reddy C.R.K. and Jha B. 2007. Callus induction and thallus regeneration from callus of phycocolloid yielding seaweeds from the Indian coast. *J. Appl. Phycol.*, 19: 15 – 25.
- [10] Rorrer G.L. and Cheney D.P. 2004. Bioprocess engineering of cell and tissue cultures for marine seaweeds. *Aquacultural Engineering*, 32: 11–41
- [11] Gaspar T., Kevers C., Penel C., Greppin H., Reid D.M. and Thorpe T.A. 1996. Plant Hormones and Plant Growth Regulators In Plant Tissue Culture. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 32: 272 – 289.
- [12] Huang Y., Maliakal S., Cheney D.P. and Rorrer G.L. 1998. Comparison of development and photosynthetic growth for filament clump and regenerated microplantlet culture of *Agardhiella subulata* (Rhodophyta, Gigartinales). *J. Phycol.*, 34: 893 – 901.
- [13] Mussio I. and Rusig A.M. 2009. Morphogenetic responses from protoplasts and tissue culture of *Laminaria digitata* (Linnaeus) J. V. Lamouroux (Laminariales, Phaeophyta): callus and thalloid-like structures regeneration. *J. Appl. Phycol.*, 21: 255–264.
- [14] Bradley P.M. and Cheney D.P. 1990. Some effects of plant growth regulators on tissue cultures of the marine red alga *Agardhiella subulata* (Gigartinales, Rhodophyta). *Hydrobiologia*, 204/205: 353-360.
- [15] Yokoya N.S and Handro W. 1996. Effect of auxins and cytokinins on tissue culture of *Grateloupia dichotoma* (Gigartinales, Rhodophyta). *Hydrobiologia*, 326/327: 393 – 400.

Histologi Organ Hepatopankreas Kepiting Bakau (*Scylla serata*) pada Konsentrasi Sublethal Fenol sebagai Peringatan Dini (*Early warning*) Toksisitas Fenol di Estuaria

Alfi Hermawati Waskita Sari^{1*}, Yenny Risjani¹, Agung Pramana Warih Mahendra²

¹Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya

²Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya

Abstrak

Fenol dan senyawa fenolik merupakan salah satu xenobiotik yang menjadi salah satu faktor stres lingkungan pada biota yang terpapar dan telah menjadi masalah lingkungan akibat dampak antropogenik lingkungan. Konsentrasi fenol yang melebihi batas ambang ke dalam ekosistem perairan dapat menjadi *stresor* kimia bagi organisme akuatik, termasuk kepiting bakau (*Scylla serata*). Teknik histologi juga merupakan salah satu metode umum yang dapat digunakan untuk mengetahui efek sublethal polutan. Sebelum menetapkan konsentrasi sublethal, terlebih dahulu dilakukan penentuan konsentrasi LC₅₀ (96 jam). Berdasarkan data mortalitas dari hasil uji toksisitas akut LC₅₀ (96 jam) fenol terhadap kepiting bakau (*Scylla serata*) yang dianalisis dengan analisis probit, diperoleh konsentrasi LC₅₀ (96 jam) sebesar 26 mg.L⁻¹. Dari hasil tersebut kemudian ditentukan perlakuan konsentrasi sublethal fenol (96 jam) yang dilakukan, yakni perlakuan A (1,62 mg.L⁻¹), B (6,5 mg.L⁻¹), C (13 mg.L⁻¹) serta kontrol. Hasil pengamatan pada akhir perlakuan diketahui terdapat perbedaan yang signifikan terhadap histologi organ insang dan hepatopankreas pada tiap perlakuan dimana pada konsentrasi yang semakin tinggi menunjukkan kerusakan jaringan yang semakin terlihat jelas pada hepatopankreas juga terlihat perubahan yang signifikan yang terlihat pada tubulus hepatopankreatik kepiting bakau (*S. serata*) yaitu vakuola lebih terbentuk, epitel tampak tidak teratur, hilangnya bentuk bintang pada lumen.

Kata Kunci : fenol, hepatopankreas, kepiting bakau.

Abstract

Phenols and phenolic compounds is one of xenobiotics which became one of the environmental stress factors on biota exposed and have become environmental problems due to anthropogenic environmental impacts. Phenol concentrations that exceed the threshold into the aquatic ecosystem can be a chemical stressors to aquatic organisms, including also for the mud crab (*Scylla serata*). Histological technique is also one of the common methods used to determine the sublethal effects of pollutants. Before setting sublethal concentrations, first performed the determination of the concentration LC₅₀ (96 hours). Based on mortality data from the test results of acute toxicity LC₅₀ (96 hours) phenol of mangrove crab (*S. serata*) are processed using probit analysis, obtained by concentration LC₅₀ (96 hours) at 26 mg.L⁻¹. From the results of treatment are then determined sublethal concentrations of phenol (96 hours) is performed, ie, treatment A (1.62 mg.L⁻¹), B (6.5 mg.L⁻¹), C (13 mg.L⁻¹) and control. Observations in the end of treatment showed a significant difference to hepatopankreas organ histology in each treatment which at the higher concentrations indicates that the more tissue damage visible on hepatopankreas also seen significant changes seen in the tubules hepatopankreatik mangrove crab (*S. serata*) the vacuole is more established, the epithelium appears irregular, loss of star shape in the lumen.

Keywords: Phenol, hepatopancreas, mangrove crab

PENDAHULUAN

Fenol dan senyawa fenol dapat menjadi salah satu bahan pencemar air yang masuk ke alam dan masuk ke dalam perairan melalui limbah cair dari berbagai industri antara lain industri batubara, manufaktur fenol, farmasi, resin, cat, tekstil, kulit, petrokimia, *pulpmill* [1], limbah

fenol juga dapat berasal dari pestisida non spesifik, herbisida, bakterisida dan fungisida [2] maupun berasal dari berbagai proses industri yang digunakan pada gasifikasi batubara dan kilang minyak [1]. Baku mutu yang sesuai dengan ketentuan PP 82/2001, Sungai Kelas III, besarnya konsentrasi fenol maksimum yang diperbolehkan adalah 0,001 mg.L⁻¹ [3]. Hadirnya fenol yang melebihi batas ambang dalam ekosistem perairan dapat menjadi *stresor* kimia bagi organisme akuatik, termasuk juga bagi kepiting bakau yang hidup di ekosistem muara [4], oleh

* Alamat korespondensi:

Agung Pramana Warih Mahendra

email : agung_pramana@ub.ac.id

Alamat : Fakultas MIPA Universitas Brawijaya, Jl. Veteran,
Malang, 65145

karena muara (estuaria) merupakan daerah pertemuan antara air tawar dari perairan sungai dan air laut sehingga berpotensi mengandung bahan kimia antropogenik. Hal tersebut dapat terjadi dikarenakan fenol yang terdapat pada limbah sungai pada akhirnya akan mengalir menuju muara sebagai akhir pembuangan [5].

Kepiting bakau (*Scylla* spp.) merupakan invertebrata yang umum digunakan dalam studi ekotoksitas polutan dengan berbagai alasan berikut: (1) memiliki distribusi luas di lingkungan muara yang dimanfaatkan sebagai daerah pembibitan untuk pakan, pertumbuhan dan perkembangan (2) bersifat semi pelagik di alam, (3) sensitif terhadap polutan, (4) tersedia sepanjang tahun sehingga meminimalkan kesulitan yang terlibat dalam lokasi dan pengambilan sampel di lapangan, (5) dapat diaklimatisasikan pada kondisi laboratorium dengan mudah [4]. Berdasarkan respon organisme, terbagi dalam efek lethal dan sublethal. Efek letal akan secara langsung berdampak pada kematian individu dalam waktu singkat pada satu kali kesempatan. Sedangkan efek sublethal merupakan pengaruh bahan toksik akibat perlakuan yang belum mematikan dalam selang waktu yang cukup lama [6]. Konsentrasi sublethal telah banyak digunakan untuk mengevaluasi toksitas polutan dalam air berbagai organisme. Untuk mengetahui efek sublethal dari paparan bahan toksik, perubahan histologi pada organisme akuatik tersebut juga merupakan biomarker yang sangat baik terhadap *toxican* karena merupakan gambaran hasil biokimia dan perubahan fisiologis. Tanggapan histositologi relatif mudah untuk menentukan dan bisa berkaitan dengan kesehatan individu yang memungkinkan pengembangan monitoring lebih lanjut [7].

Hepatopankreas yang merupakan organ pencernaan pada kepiting yang juga memiliki fungsi penting, termasuk fungsi absorpsi yang ditandai oleh sel mikrovili menunjukkan sebuah penyerapan [8], sekresi enzim [9,10], penyimpanan nutrisi, metabolisme, tempat sintesis vitellogenin selain ovarium, serta detoksifikasi [8, 10]. Sebagai organ utama detoksifikasi xenobiotik pada kelas krustasea, hepatopankreas sangat sensitif terhadap perubahan fisiologis dan lingkungan [8]. Perubahan histologi pada organisme akuatik tersebut merupakan biomarker yang sangat baik terhadap *toxican* karena merupakan gambaran hasil biokimia dan perubahan fisiologis. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menilai

sejauh mana konsentrasi sublethal fenol terhadap perubahan histologi insang dan hepatopankreas kepiting bakau (*Scylla serata*), sehingga diharapkan informasi ini dapat diintegrasikan sebagai salah satu sistem peringatan dini (*early warning*) untuk memantau sejauh mana pencemaran fenol dalam perairan dalam upaya untuk menghindari dampak yang lebih jauh pada ekosistem perairan terutama estuaria dan terlebih lagi terhadap populasi manusia.

METODE PENELITIAN

Aklimasi

Aklimasi Sebelum uji toksitas, kepiting bakau (*S. serata*) terlebih dahulu diaklimatisasikan dalam kondisi laboratorium selama 6-8 hari. Kepiting uji yang berukuran panjang $9\pm 0,5$ cm dan lebar $6\pm 0,5$ cm dengan berat rata-rata 65-75 gram dipelihara dalam aquarium kaca $40\times 25\times 20$ cm dengan volume 10 liter air laut salinitas 25‰, kepadatan 10 ekor kepiting per aquarium [4]. Aklimatisasi tersebut di kondisi laboratorium yang terkendali dengan aerasi konstan [12]. Kepiting bakau diberi pakan dengan moluska dan udang sekali sehari. Pengisian air dilakukan secara rutin setiap 24 jam untuk menghindari residu toksitas. Suhu, salinitas dan derajat keasaman (pH) dimonitor secara rutin demikian juga dengan oksigen terlarut (DO). Fotoperiodik 12 jam gelap dan 12 jam terang juga diberikan. Kondisi pasang surut disimulasikan di laboratorium dengan meningkatkan dan menurunkan tingkatan air di dalam setiap durasi 12 jam [11].

Uji Toksisitas Fenol di Laboratorium

Setelah aklimasi dengan kondisi laboratorium, uji toksitas dilakukan untuk menentukan konsentrasi median (LC_{50}) fenol pada kepiting bakau (*S. serrata*). Penentuan LC_{50} dilakukan untuk mendapatkan nilai ambang batas konsentrasi median toksitas fenol pada kepiting bakau. Masing-masing kepiting bakau dibagi menjadi beberapa kelompok dan setiap kelompok berisi 10 kepiting dalam kaca aquarium berisi air laut salinitas 22‰, dalam tiga kali replikasi. Larutan stok, dibuat konsentrasi fenol yang diinginkan untuk menentukan toksitas kepiting bakau. Selama uji toksitas berlangsung, tidak dilakukan pemberian pakan [4]. Kepiting secara rutin diperiksa mortalitasnya. Kepiting yang mengalami kematian langsung dibuang untuk menghindari toksitas tambahan dan kualitas air yang jelek [12]. Data mortalitas diolah

dengan regresi linier ($Y=a+bx$) untuk mendapatkan nilai LC_{50} (96 jam). Selama perlakuan percobaan, wadah uji ditutupi oleh tutup untuk mencegah pengeringan lewat atmosfer [12].

Histologi Organ Hepatopankreas

Adapun pembuatan preparat histologi dan histopatologi meliputi tahap parafinasi atau *embedding* dengan langkah pertama adalah pengirisan jaringan dengan ukuran $0,5 \times 0,5 \text{ cm}^2$, perendaman dalam larutan fiksatif, yaitu formalin 10% selama 24 jam sampai tak terbatas, diikuti dengan perendaman dalam alkohol 70%, 80%, 90%, 95%, alkohol absolut I, II, *xylo* I, *xylo* II, masing-masing 2 jam. Kemudian perendaman dengan menggunakan parafin I, parafin II selama 1 jam. Lalu proses *embedding* atau pemblokkan dilakukan dengan cara memasukkan jaringan dalam cetakan berisi parafin cair menggunakan *embedding machine* "LEICA EG 1120". Pendinginan hingga mengeras dengan menggunakan *embedding machine* LEICA 1150C selanjutnya disimpan dalam suhu kamar selama 24 jam.

Tahap kedua adalah tahap deparafinasi yakni pemotongan blok parafin yang berisi jaringan dipotong dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 5 mikron. Lalu jaringan yang terpotong diletakkan pada air hangat dalam *Tissue Float Bath* untuk mencegah hasil pemotongan melengkung. Selanjutnya diletakkan diatas gelas obyek lalu dikeringkan hingga jaringan menempel sempurna pada permukaan gelas obyek. Kemudian dilakukan pencelupan secara berturut-turut pada larutan *xylo* I dan II; alkohol absolut I dan II; alkohol 99%, 90%, 80%, 70% masing-masing selama 3 menit. Lalu dilakukan pencelupan dalam aquadest selama 5 menit. Sedangkan tahapan ketiga adalah tahap pewarnaan, tahapan ini dimulai dengan pencelupan dalam larutan pewarna *haematoxilin* sampai hasil terbaik, apabila warna terlalu pekat, rendam beberapa detik dengan 1% HCL dalam alkohol 70%, kemudian bilas dengan air mengalir selama 5-30 menit dilanjutkan dengan proses pewarnaan II dengan eosin selama 5-30 menit lalu bilas dengan akuades kemudian untuk pengecatan menggunakan *wright* dengan metode yang sama dengan *haematoxilin*. Tahapan selanjutnya adalah dehidrasi yakni pencelupan kembali secara berturut-turut pada larutan alkohol 70%, 80% selama 30 menit; alkohol 90%, 95% selama 1 menit dilanjutkan alkohol absolut I, II selama 1 menit, kemudian diikuti tahapan

clearing dengan proses pencelupan dalam *xylo* I dan *xylo* II selama 2 menit. Tahapan akhir dari teknik histologi adalah *mounting* dimana preparat di lem dengan menggunakan *albumin meyer*, kemudian ditutup dengan *cover glass*. Hindari terjadinya gelembung. Lalu dibiarkan dalam suhu ruangan sampai lem mengering, kemudian diamati di bawah mikroskop.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Toksisitas Akut LC_{50} (96 Jam) Bahan Toksik Fenol Terhadap Kepiting Bakau (*S. serata*)

Uji toksisitas akut LC_{50} (96 jam) fenol terhadap kepiting bakau (*S. serata*) dilakukan untuk menentukan *lethal concentration* 50 % digunakan lima perlakuan konsentrasi yang berbeda yakni perlakuan A (16 mg.L^{-1}), B (32 mg.L^{-1}), C (64 mg.L^{-1}), D (128 mg.L^{-1}) dan kontrol (tanpa perlakuan). Pada uji toksisitas akut tersebut, persentase mortalitas kepiting bakau (*S. serata*) tertinggi adalah pada perlakuan D (100%) kemudian diikuti perlakuan C (70%), B (50%), A(40%), dan K (0%). Berdasarkan perhitungan dengan analisis probit maka dapat diketahui nilai LC_{50} (96 jam) fenol terhadap kepiting bakau (*S. serata*) adalah 26 mg.L^{-1} . Data perhitungan penentuan konsentrasi LC_{50} (96 jam) fenol terhadap kepiting bakau (*S. serata*) berdasarkan analisis probit ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Perhitungan penentuan konsentrasi LC_{50} (96 jam) fenol terhadap kepiting bakau (*S. Serata*) berdasarkan analisis probit

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi	Persen Kematian (%)	Nilai probit
16	1,2041	40	4,75
32	1,5051	50	5,00
64	1,8062	70	5,52
128	2,1072	100	8,09

Persamaan regresi yang diperoleh dari data diatas adalah $Y= 3,5012X+0,0433$ ($r=0,8871$). Nilai LC_{50} (96 jam) diperoleh dengan cara memasukan nilai probit 5,00 (% kematian 50%) sebagai variabel Y kedalam persamaan regresi tersebut, sehingga didapatkan median konsentrasi letal 50% (LC_{50}) selama 96 jam fenol terhadap kepiting bakau (*S. serata*) sebesar 26 mg.L^{-1} .

Uji Toksisitas Sublethal Fenol terhadap Kepiting Bakau (*S. serata*)

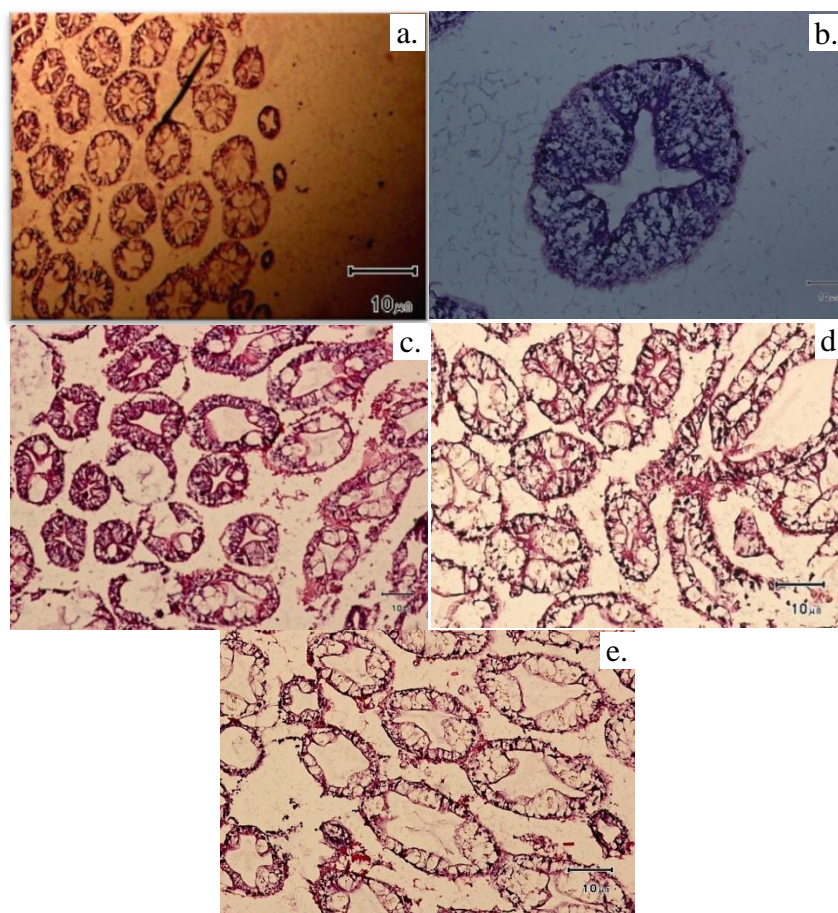
Konsentrasi perlakuan yang digunakan untuk uji toksisitas sublethal tersebut mengacu pada nilai LC_{50} -96 jam yang telah didapatkan dari uji toksisitas akut. Selama penelitian berlangsung

pergantian media uji sehari sekali. Pemberian pakan kepiting bakau (*S. serata*) dilakukan 2 kali sehari, yaitu pagi dan sore. Kepadatan kepiting uji adalah lima ekor kepiting bakau (*S. serata*) per unit percobaan, yang diisi 5 liter air payau dengan salinitas sebesar 22 ppt. Parameter kualitas air yang diamati adalah, oksigen terlarut (DO), suhu dan derajat keasaman (pH) yang diamati setiap hari. Perlakuan pada uji toksisitas sublethal adalah berdasarkan nilai sublethal atau setengah nilai LC_{50} –96 jam ke seri tingkatan konsentrasi yang lebih rendah. Konsentrasi fenol yang digunakan untuk uji toksisitas sublethal selama 7 hari adalah 1/16, 1/4 dan 1/2 dari LC_{50} –96 jam. Jadi konsentrasi perlakuan pada uji

toksisitas sublethal adalah sebagai berikut: kontrol (tanpa perlakuan), perlakuan A ($1,62 \text{ mg.L}^{-1}$), perlakuan B ($6,5 \text{ mg.L}^{-1}$), perlakuan C (13 mg.L^{-1}). Pengamatan yang dilakukan pada uji toksisitas sublethal adalah histologi organ hepatopankreas kepiting bakau (*S. serata*).

Histologi Organ Hepatopankreas setelah Pemaparan Konsentrasi Sublethal Fenol

Berdasarkan pengamatan di bawah mikroskop cahaya tampak struktur umum dari tubulus hepatopankreatik kepiting bakau (*S. serata*) pada tiap perlakuan ditunjukkan oleh Gambar 1.



Gambar 1. Gambaran histologi hepatopankreas kepiting bakau (*S. serata*) setelah akhir perlakuan pemaparan konsentrasi sublethal fenol. Keterangan: a,b. Kontrol; c. Perlakuan dengan fenol konsentrasi konsentrasi $1,62 \text{ mg.L}^{-1}$; d. Perlakuan dengan fenol konsentrasi konsentrasi $6,5 \text{ mg.L}^{-1}$; e. Perlakuan dengan fenol konsentrasi konsentrasi 13 mg.L^{-1} ; Skala bar: 10μ .

Berdasarkan hasil pengamatan, terdapat perubahan yang signifikan yang terlihat pada tubulus hepatopankreatik kepiting bakau (*S. serata*) yang terpapar konsentrasi sublethal fenol yang berbeda selama tujuh hari bila dibandingkan dengan kontrol (tanpa perlakuan). Disamping itu juga, terlihat perbedaan pada

masing-masing perlakuan. Perubahan histologi yang terlihat pada organ hepatopankreas kepiting bakau (*S. serata*) adalah membran hepatopankreas tampak kusut dan vakuola lebih terbentuk. Selain itu, epitel tampak bergelombang, bahkan seperti tidak beraturan dan pada konsentrasi sublethal fenol yang

semakin tinggi, yakni perlakuan C (13 mg.L^{-1}) dan bentuk bintang pada lumen sudah tidak terlihat jelas dan vakuola semakin terlihat jelas.

Pembahasan

Hepatopankreas merupakan organ yang sangat sensitif terhadap pengaruh pencemaran, sehingga organ ini sering digunakan untuk memonitor efek dari berbagai toksikan. Efek dari paparan beberapa perlakuan konsentrasi sublethal fenol melalui teknik histologis untuk mengetahui perubahan jaringan hepatopankreas dari kepiting bakau (*S. serata*) di amati pada penelitian ini. Teknik histopatologi merupakan teknik yang cepat, sensitif, handal dan relatif murah sebagai alat penilaian terhadap respon stres dari bahan toksik xenobiotik. Perubahan dan evaluasi manifestasi histopatologis memberikan wawasan informasi terhadap tingkat stres, kerentanan dan adaptif kemampuan organisme menghadapi stres. Perubahan histopatologis memberikan evaluasi tingkat stres, kerentanan dan kemampuan adaptif organisme terhadap stres, seperti halnya pada organ hepatopankreas kepiting bakau (*S. serata*). Hal tersebut menunjukkan bahwa organ tersebut sangat bereaksi terhadap perubahan lingkungan [13].

Sebagian besar toksikan masuk melalui darah ke dalam tubuh organisme melalui alat pencernaan yang kemudian diabsorpsi dan dibawa ke hepar. Organ tersebut berfungsi sebagai organ utama yang penting dalam regulasi, metabolisme dan detoksifikasi racun oleh xenobiotik yang bersifat toksik. Xenobiotik atau senyawa asing didalam hepar dapat mengalami detoksifikasi tetapi juga dapat dibioaktifkan menjadi lebih toksik. Fungsi hepar tersebut dapat terganggu apabila ada gangguan proses metabolisme karena adanya senyawa bersifat racun, termasuk fenol yang secara kuantitatif mempengaruhi aktivitas enzim metabolisme di zona hepar. Untuk itu hepar memiliki peranan penting sebagai penjelasan profil metabolik fenol [14]. Pada organisme kepiting, xenobiotik masuk melalui air, sedimen ataupun makanan melalui insang kemudian menumpuk pada organ kaya lemak yakni hepatopankreas. Hepatopankreas *crustacea* memiliki banyak fungsi yang terkait seperti halnya organ hati maupun pankreas pada vertebrata yang meliputi sintesis dan sekresi enzim pencernaan, penyerapan nutrisi, dan akumulasi gizi cadangan [15]. Hepatopankreas tidak hanya merupakan organ pencernaan yang

memiliki kemampuan penyerapan, pencernaan, penyimpanan, dan sekresi, tetapi juga besar situs di mana biotransformasi dan detoksifikasi alami pada kelas krustasea. Rute toksik selama metabolisme merupakan hal penting yang harus diperhatikan menentukan pilihan organ untuk mengamati efek dari pengaruh xenobiotik serta menunjukkan umum dan tanggapan khusus untuk tertentu stres. Hepatopankreas pada dasarnya terdiri tubulus bercabang dan berbagai jenis lapisan sel epitel tubulus. Oleh karena itu, kemungkinan bahwa paparan bahan kimia berbahaya (xenobiotik) akan tercermin dalam perubahan struktur tubulus sel epitel [16]. Sehingga diharapkan informasi gambaran lesi akibat efek toksik tersebut dapat menjadi biomarker histopatologis (*histological biomarker*) sebagai upaya peringatan dini (*early warning*) pencemaran fenol yang mengancam estuaria.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Saha N.C., Bhunia F., dan Kaviraj A. 1999. Toxicity of Phenol to Fish and Aquatic Ecosystems. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 63: 195-202.
- [2] Gupta S., Dalela R.C., dan Saxena P.K. 1983. Effect of phenolic compounds on in vivo activity of transaminases in certain tissues of the fish of the fish *Notopterus notopterus*. *Environ. Res.* 32: 8-13.
- [3] Herawati N., Purwanto, and Hadiyanto A. 2007. Analisis risiko lingkungan aliran Lumpur Lapindo ke badan air (studi kasus Sungai Porong dan Sungai Aloo Kabupaten Sidoarjo). Program Studi Magister Ilmu Lingkungan Pasca Sarjana. Universitas Diponegoro. Semarang.
- [4] Vijayavel K., Gopalakrishnan S., Thiagarajan R., dan Thilagam H. 2008. Immuno-toxic Effects of Nickel in the Mud Crab *Scylla serrata*. *Fish & Shellfish Immunology*. 26 (1): 133-139.
- [5] Abdel-Hameid N.H. 2007. Physiological and Histopathological Alterations Induced by Phenol Exposure in *Oreochromis aureus* Juveniles. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 7: 131-138.
- [6] Connell D.W. and Milller G.J. 1995. Kimia dan Ekotoksikologi Pencemaran. Terjemahan: Yanti Koestoer. Penerbit Universitas Indonesia Press. Jakarta. 52-337.
- [7] Larsson U., Elmgren R., and Wulff F. 1985. Eutrophication and the Baltic Sea: Causes and consequences. *Ambio*. 14: 10-14.

- [8] Sousa L.G., and Petriella A.M. 2007. Functional morphology of the Hepatopancreas of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea: Decapoda): Influence of environmental pollution. *Revista de Biología Tropical*. 55(1):78-86.
- [9] Ceccaldi H.J. 1989. Anatomy and physiology of digestive tract of Crustaceans Decapods reared in aquaculture. *Advances in Tropical Aquaculture, Workshop at Tahiti, French Polynesia*. Chapter 26: 243-259.
- [10] Zeng H., Ye H., Li S., Wang G., and Huang J. 2010. Hepatopancreas cell cultures from Mud Crab *Scylla paramamosain*. *In Vitro Cellular & Development Biology-Animal*. 46: 431-437.
- [11] Saha S., Ray M., and Ray S. 2010. Screening of phagocytosis and intrahemocytotoxicity in arsenic exposed crab as Innate immune response. *Asian Journal Experimental Biological Sciences*. 1: 47-54.
- [12] Saha P., Selvan V.T., Mondal S.K., Mazumder U.K., Gupta M. 2008. Antidiabetic and antioxidant activity of Methanol extract of *Ipomoea reptans* poir aerial parts in Streptozotocin induced diabetic rats. *Pharmacologyonline*. 1: 409-421.
- [13] Sousa L.G. and Petriella A.M. 2007. Functional morphology of the hepatopancreas of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea: Decapoda): influence of environmental pollution. *Revista de Biología Tropical*. 55: 79-86.
- [14] Medinsky M.A., Kenyon E.M., and Schlosser P.M. 1995. Benzene: a case study in parent chemical and metabolite interactions. *Toxicology*. 105 (2-3): 225-233.
- [15] Gibson O. and Barker P.L. 1979. The decapod hepatopancreas. *Oceanography and Marine Biology Annual Review*. 17: 285-346.
- [16] Bhavan P.S. and Geraldine P. 2000. Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposure to endosulfan. *Aquatic Toxicology*. 50(4): 331-339.

Penampilan Kandungan Protein Dan Kadar Lemak Susu Pada Sapi Perah Mastitis Friesian Holstein

Puguh Suryowardojo

Jurusan Teknologi Hasil Peternakan, Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya

Abstrak

Penelitian ini dilaksanakan di peternakan wilayah kerja Proyek Peternakan Sapi Perah GKSJ Jawa Timur di Desa Sawiran, Kecamatan Purwodadi, Kabupaten Pasuruan dan di Laboratorium Ternak Perah Fakultas Perternakan Universitas Brawijaya. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui penampilan kadar protein dan kadar lemak susu pada tingkat mastitis yang berbeda pada sapi perah. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai informasi tentang pentingnya melakukan pencegahan penyakit mastitis sebagai salah satu faktor penyebab perubahan kadar protein dan kadar lemak susu yang dihasilkan. Materi penelitian adalah sampel susu dari kuartir ambung 30 ekor sapi perah (120 puting) laktasi, dengan bulan laktasi 2 sampai 3 dan tingkat laktasi 2 sampai 3. Metode penelitian yang digunakan adalah study kasus. Observasi langsung dilapang yang dilakukan untuk mengetahui tingkat mastitis pada sapi perah berdasarkan *California Mastitis Test* (CMT). Dan untuk menguji kadar protein dan kadar lemak dilakukan di Laboratorium Ternak Perah. Hasil penelitian menunjukkan bahwa puting sapi perah sampel berada pada tingkat nol sebanyak 5 ekor (16,67 %) dan yang terkena mastitis sebanyak 25 ekor (83,33 %). Tingkat mastitis dan protein serta lemak susu mempunyai hubungan yang linier negatif yang sangat nyata ($p \leq 0,01$). Berdasarkan persamaan regresi semakin tinggi tingkat mastitis maka kadar protein dan lemak susu semakin menurun. Kesimpulan dari penelitian ini adalah semakin tinggi nilai mastitis maka kadar protein dan kadar lemak susu semakin menurun sebesar 53 % dan 33 %. Dari penelitian ini dapat disarankan agar peternak lebih menjaga kesehatan lingkungan untuk mencegah berjangkitnya penyakit mastitis pada peternakan tersebut.

Kata Kunci: Friesian Holstein, mastitis, lemak susu, protein

Abstract

The study was carried out in the GKSJ livestock of dairy cows East Java in Sawiran village, Pasuruan Regency and also at the Laboratory of Dairy Animal, Faculty of Animal Husbandry Brawijaya University. The objective of the study was to find out the performance of mastitis level in protein and fat content of milk dairy cows in GKSJ farm East Java. It was expected the results of this study could be used as an information on the importance role of preventing mastitis disease as one of the factor cause of change of protein and fat content of milk production. The materials observed were milk samples from 30 milking cows, with two to third month of lactation and two to third stage of lactation. The method of research is case study. Field observation have been done to determind mastitis in cadence based on *California Mastitis Test* (CMT). The protein content of milk was determined using formol titration method and fat content of milk was determited by gerber method at the Laboratory of dairy animal.. The data were analysed using simple Corelation and Regression. It was found that 5 cows (16.67%) were in mastitis level zero and 25 cows (83.33 %) infected of mastitis. Mastitis level was linerly correlated highly significantly ($p \leq 0.01$). According to regression expressed if mastitis be higher the protein procentages and milk fat can be lower. It was conclude that mastitis level significantly decreased protein and fat content of milk by 53 % and 33 % respectively. The dairy cows were mastitis infected are 83.33 %. From this research can be suggested that farmers should be able to keep healthy environment in order to protect mastitis diseases in their farm.

Keywords: Fat Milk, Frisian Holstein, Mastitis, Protein

PENDAHULUAN

Peternakan sapi perah merupakan salah satu penggerak ekonomi dikawasan pedesaan, karena peternakan ini dapat menyediakan lapangan

pekerjaan kepada petani ternak. Dewasa ini di negara-negara yang sudah maju maupun di negara-negara yang sedang berkembang (termasuk di Indonesia), sapi perah merupakan sumber utama penghasil susu yang mempunyai nilai gizi tinggi. Walaupun ada pula susu yang dihasilkan oleh ternak lain misalnya kerbau, kambing, kuda dan domba, akan tetapi penggunaannya dimasyarakat tidaklah sepopuler susu sapi perah. Sapi perah mempunyai karakteristik yang lebih baik dari ternak lain

* Alamat korespondensi:

Puguh Suryowardojo

Email : suryowardojo_puguh@yahoo.com

Alamat : Jurusan Teknologi Hasil Peternakan, Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya, Jl. Veteran, Malang, 65145

dalam hal efisiensi mengubah pakan menjadi protein hewani dan kalori. Efisiensi sapi perah dalam mengubah pakan menjadi protein hewani dan kalori, hingga saat ini belum tertandingi oleh hewan jenis lainnya. Dengan produksi susu 4.500 liter pertahun, sapi perah mampu menyediakan zat – zat makanan bagi manusia sama dengan dua ekor sapi jantan kebiri yang beratnya masing – masing 500 kg. Dengan pertimbangan tersebut maka dapat dikatakan bahwa sapi perah merupakan ternak unggul dan efektif mempunyai peran dalam mencukupi kebutuhan protein hewani bagi masyarakat [1].

Faktor penghambat produksi susu pada usaha peternakan sapi perah adalah timbulnya kasus penyakit pada ternak. Penyakit yang paling sering muncul dalam usaha ternak perah adalah Mastitis. Mastitis atau radang kelenjar susu merupakan kasus yang sering terjadi pada peternakan sapi perah. Mastitis sangat merugikan peternak, karena sapi perah yang terkena mastitis akan mengalami penurunan produksi susu, dan kualitas susu yang dihasilkan juga rendah. Selain itu adanya penyakit mastitis akan menambah biaya perawatan dan biaya pengobatan untuk kelangsungan produksinya. Tingginya kasus mastitis sering terjadi akibat manajemen pemeliharaan yang kurang baik.

Mastitis adalah suatu peradangan pada tenunan ambing yang dapat disebabkan oleh mikroorganisme, zat kimia, luka termis ataupun luka karena mekanis. Peradangan ini dapat mempengaruhi komposisi susu antara lain dapat menyebabkan bertambahnya protein dalam darah dan sel darah putih di dalam tenunan ambing, serta menyebabkan penurunan produksi susu [2]. Umumnya radang ambing disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus agalactiae*, dan bakteri tersebut dapat berpindah dari kuarter yang terinfeksi ke kuarter yang sehat dengan melalui tangan pemerah atau kain pembersih ambing serta alat-alat lainnya [3].

Mastitis pada sapi perah ada dua macam, yakni mastitis subklinis dan klinis [1]. Selama ini pengetahuan peternak hanya terbatas pada mastitis klinis, karena perubahan susu yang dihasilkan dapat diamati secara langsung, yaitu susu terlihat menggumpal atau cair, dan terdapat darah atau nanah. Sedangkan mastitis subklinis tidak dapat dilihat perubahannya secara langsung, sehingga perlu pengujian khusus, salah satunya dengan metode *California Mastitis Test* (CMT).

Mastitis pada sapi perah telah mengakibatkan kerugian yang sangat besar bagi peternak, karena disamping jaringan ambing ternak yang bersangkutan rusak juga susu yang diproduksi tidak dapat dijual, karena telah rusak dan tercemar oleh mikroorganisme. Keadaan resistensi sapi perah terhadap mastitis ini sangat bervariasi, sehingga masih dimungkinkan dilakukan seleksi terhadap induk-induk yang resisten [4].

Penelitian ini dilakukan di Proyek Sapi Perah FH GKS Jawa Timur berada di Desa Sawiran Kecamatan Purwodadi Kabupaten Pasuruan merupakan proyek pengembangan sapi perah sebagai percontohan Koperasi Persusuan di Jawa Timur yang berdiri sejak tahun 2000. Lokasi tersebut terletak kira-kira 12 km sebelah Timur dari jalan raya.

Rata-rata suhu kandang di peternakan ini adalah sekitar 19,3°C pada pagi hari, 25,9°C pada siang hari, dan 22,9°C pada sore hari. Umumnya sapi perah yang dipelihara di Indonesia adalah bangsa sapi FH. Sapi tersebut berasal dari Belanda yang memiliki lingkungan hidup dengan temperatur antara 13° C sampai 23° C [5].

Rata-rata kelembaban relatif kandang adalah sekitar 61,37% pada pagi hari, 76,17% pada siang hari, dan 58,30% pada sore hari. Kelembaban udara tersebut termasuk cukup ideal bagi pemeliharaan sapi perah laktasi adalah 60 – 80%. Kelembaban yang tinggi dapat merangsang tumbuhnya mikroorganisme penyebab penyakit ternak. Ternak yang terserang penyakit akan mengalami penurunan nafsu makan dan berakibat pada menurunnya kecepatan pertumbuhan [6].

Luas areal peternakan secara keseluruhan adalah 1,5 Ha. Jarak kandang dengan rumah penduduk terdekat sekitar 50 meter. Jarak ini cukup ideal untuk sebuah peternakan karena tidak begitu mengganggu lingkungan sekitar.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perormen kandungan protein dan kadar lemak susu pada sapi perah yang terinfeksi mastitis. Hasil penelitian diharapkan dapat dimanfaatkan khususnya sebagai bahan informasi kepada petani peternak sapi perah tentang performen kandungan protein dan kadar lemak susu pada sapi perah yang terinfeksi mastitis.

METODE PENELITIAN

Lokasi Penelitian

Penelitian lapang dilakukan di Proyek Sapi Perah FH GKS Jawa Timur Desa Sawiran Kecamatan Purwodadi Kabupaten Pasuruan.

Pengukuran kandungan protein dan kadar lemak susu dilaksanakan di Laboratorium Ternak Perah, Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya.

Metode dan Materi Penelitian

Metode penelitian menggunakan metode studi kasus dan penentuan sampel sapi perah secara *purposive sample*. *Purposive sample* adalah semua sapi perah yang termasuk dalam kriteria yang telah ditentukan, yaitu sapi perah dengan tingkat laktasi 2 – 3, dan bulan laktasi 2 – 3 yang dapat dipakai sebagai anggota sampel sebanyak 30 ekor.

Pengambilan sampel susu diambil pada waktu pemerahan pagi dan sore hari. Pengujian CMT dilaksanakan secara langsung di lapangan, sehingga apabila dilakukan pada sore hari dengan cahaya yang cukup terang akan didapat hasil yang akurat. Untuk uji mastitis, sebanyak dua pancaran pertama dibuang, pancaran kedua dan pancaran ketiga dari masing-masing puting ditampung pada paddle kemudian ditambahkan reagen yang kira-kira sama jumlahnya. Reagen tersebut terdiri dari alkyl aryl sulfonate 3 %, NaOH 1,5 % dan indicator Broom Kresol Purple. Setelah ditambahkan reagen, paddle dan isinya diputar perlahan-lahan secara horizontal selama 10 detik.

Pengambilan sampel susu dari masing-masing sapi perah dimasukkan ke dalam botol sampel, selanjutnya di bawa ke laboratorium untuk uji kualitas susu, salah satunya uji kandungan protein dan kadar lemak susu.

Penentuan Kandungan Protein dan lemak Susu

Penentuan kandungan protein dilakukan dengan cara *formol titration*, menurut Anonymous [7] dan Prawesthirini dkk. [8]. Penentuan kadar lemak susu dengan metode gerber menurut SNI [9].

Penentuan Tingkat Mastitis

Penentuan tingkat mastitis menurut pendapat Subronto [10] seperti pada Tabel 1.

Analisis Data

Metode yang digunakan untuk mengetahui keeratan hubungan antara nilai mastitis berdasarkan CMT dengan kadar protein dan lemak susu adalah dengan menggunakan analisis korelasi dan regresi sederhana dan untuk mengetahui besar pengaruhnya dengan koefisien determinasi (R^2) [11] dan analisis ragam [12].

Tabel 1. Interpretasi berdasarkan CMT

Simbol	Arti	Reaksi	Estimasi jumlah sel per ml susu
-	Negatif	Tidak ada tanda-tanda presipitasi Sedikit terjadi	<10.000- 200.000
T	Trace	presipitasi	150.000- 500.000
1	Positif lemah	Presipitasi tampak nyata, tetapi belum terbentuk gel	400.000- 1.500.000
2	Positif nyata	Campuran mengental, terbentuk gel Gel yang menyebabkan	800.000- 5.000.000
3	Positif Kuat	permukaan menjadi cembung	lebih 5.000.000

HASIL DAN PEMBAHASAN

Mastitis pada Sapi Perah

Sapi perah yang mempunyai kemampuan mempertahankan produksi susu setelah mencapai puncak laktasi lebih baik dari pada sapi yang cepat turun produksi susunya, karena produksi susu sapi perah setiap harinya berangsur-angsur meningkat sampai puncak dalam waktu kurang lebih dua bulan setelah beranak, kemudian konstan sampai bulan laktasi ketiga, setelah itu produksi susu akan berangsur-angsur turun sampai akhir laktasi [13].

Hasil pengujian mastitis dengan metode CMT pada susu sapi perah diperoleh bahwa sapi perah yang terkena mastitis sebanyak 25 ekor, lihat Tabel 2.

Tabel 2. Rata-rata nilai mastitis berdasarkan uji CMT pada susu sapi perah

Rata-rata nilai Mastitis	Jumlah Sapi	(%)
0	5	16.67
0,25	1	3.33
0,5	1	3.33
0,75	2	6.66
1	4	13.33
1,25	2	6.66
1,5	4	13.33
1,75	1	3.33
2	4	13.33
2,25	3	10.00
2,5	2	6.66
3,75	1	3.33

Terjangkitnya mastitis pada sapi perah dapat disebabkan oleh beberapa hal, antara lain:

1. Kebersihan tempat, peralatan dan kebersihan sapi yang biasanya kurang mendapat perhatian, hal ini terlihat dari sisa pakan yang masih tercecer dan kotoran sapi

- yang masih menempel pada dinding kandang.
2. Kebersihan sapi sebelum diperah yang belum dibersihkan atau dimandikan. Hal ini tidak sesuai dengan pendapat Anonimus [7] yang menyatakan bahwa sapi perah yang akan diperah harus dalam keadaan bersih, semua sapi yang akan diperah harus dimandikan terlebih dahulu seperti bagian-bagian lipatan paha, ambing dan puting.
 3. Setelah pemerahan selesai, ambing dan puting tidak dibersihkan. Menurut Siregar [5] sebelum dan sesudah pemerahan ambing dan puting harus dicuci dengan air hangat-hangat kuku, khusus puting setelah dibersihkan harus sebaiknya dicelupkan ke dalam air yang telah dicampur dengan biocid.
 4. Pemerahan puting yang tidak terinfeksi dan yang terinfeksi tidak dibedakan, puting yang terinfeksi terkadang dilakukan pemerahan terlebih dahulu, sehingga dapat menjadi penyebab tertularnya mastitis ke ternak yang sehat melalui tangan pemerah.

Mastitis dikenal sebagai infeksi atau peradangan pada ambing. Mastitis adalah suatu peradangan pada tenunan ambing yang dapat disebabkan oleh mikroorganisme, zat kimia, luka termis ataupun luka karena mekanis [2].

Mastitis pada sapi perah telah mengakibatkan kerugian yang sangat besar bagi peternak, karena disamping jaringan ambing ternak yang bersangkutan rusak juga susu yang diproduksi tidak dapat dijual karena telah rusak dan tercemar oleh mikroorganisme. Keadaan resistensi sapi perah terhadap mastitis ini sangat bervariasi, sehingga masih dimungkinkan dilakukan seleksi terhadap induk-induk yang resisten [4]. Sesuai dengan pendapat diatas, Dinas Peternakan Jakarta Barat [14] berpendapat bahwa pencegahan mastitis dapat dilakukan melalui penerapan kebersihan kandang, badan sapi, peralatan, tukang perah dan penggunaan bahan-bahan antiseptik sebagai pencuci ambing pada saat sebelum maupun setelah pemerahan, pemerahan dilakukan secara tuntas, mengisolasi sapi yang terjangkit mastitis untuk segera dilakukan pengobatan. Selain itu perlu dilakukan pencelupan puting susu setelah pemerahan kedalam antiseptik selama kurang lebih 1 menit.

Hasil penelitian diperoleh bahwa adanya tingkat nol hasil pemeriksaan mastitis pada sapi perah menunjukkan adanya upaya pencegahan penyakit mastitis oleh pihak GKSI Jawa Timur.

Salah satu pencegahan penyakit ini adalah dengan melaksanakan tatalaksana yang baik pada kandang dan pemerahan serta sanitasi alat-alat perah dan sekitar kandang, hal ini sesuai dengan pendapat Dinas Peternakan Jakarta Barat [14].

Terjadinya mastitis sapi perah sebanyak 25 ekor merupakan salah satu indikator manajemen pemerahan yang kurang baik. Menurut Sarwiyono dkk. [15], di Indonesia ada tiga cara pemerahan yang dapat dilakukan secara manual, yaitu : *Whole hand*, *Knevelen* dan *Stripping* atau *Strippen*. Proses pemerahan dapat diakhiri apabila susu sudah tidak dapat keluar lagi dari ambing atau jika kecepatan susu sudah sangat lambat, yaitu : 0,5 liter per menit.

Di karenakan mastitis pada tingkat *Sub-Clinical*, tanda-tanda keabnormalan susu tidak dapat dilihat secara kasat mata, maka pada setiap ternak sapi perah perlu dilakukan uji secara rutin untuk mendeteksi kemungkinan terjangkitnya mastitis.

Menurut Hidayat dkk. [16] bahwa berdasarkan gejalanya dapat dibedakan antara mastitis klinis dan subklinis. Mastitis klinis meliputi :

- **Akut**, ditandai dengan ambing membengkak, panas, kemerahan, nyeri bila diraba dan perubahan fungsi. Dengan kondisi umum ternak tidak mau makan. Perubahan pada susunya yaitu susu memancar tidak normal, bening atau encer; kental, menggumpal atau berbentuk seperti mie; warna berubah menjadi semu kuning, kecoklatan, kehijauan, kemerahan atau ada bercak-bercak merah.
- **Kronis**, ditandai dengan ternak terlihat seperti sehat, ambing teraba keras, peot dan mengeriput serta puting peot.

Sedangkan mastitis sub klinis merupakan peradangan pada ambing tanpa ditemukan gejala klinis pada ambing dan air susu :

- Ternak terlihat seperti sehat : nafsu makan biasa dan suhu tubuh normal
- Ambing normal
- Susu tidak menggumpal dan warna tidak berubah

Nilai Mastitis Berdasarkan Metode CMT dengan Kandungan Protein Susu

Hasil perhitungan yang menunjukkan kandungan protein susu sapi perah susu

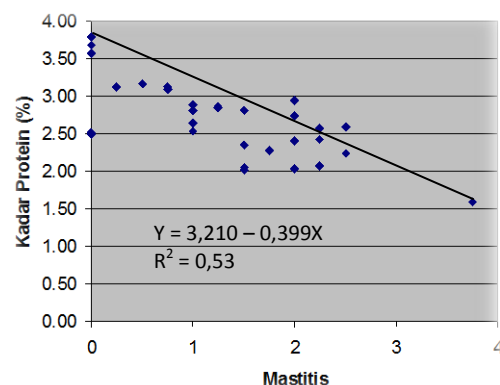
menurun dengan meningkatnya tingkat mastitis seperti pada Tabel 3.

Tabel 3. Rata-rata kandungan protein susu sapi perah sampel pada berbagai rata-rata nilai mastitis berdasarkan nilai CMT

No	Rata-rata nilai mastitis	Banyak sampel	Rata2 kdr protein susu (%)
1	0	5	3,80 ± 2,50
2	0,25	1	3,13
3	0,5	1	3,16
4	0,75	2	3,13 ± 3,10
5	1	4	2,89 ± 2,54
6	1,25	2	2,87 ± 2,86
7	1,5	4	2,81 ± 2,02
8	1,75	1	2,27
9	2	4	2,94 ± 2,03
10	2,25	3	2,57 ± 2,08
11	2,5	2	2,59 ± 2,25
12	3,75	1	1,59

Berdasarkan Tabel 3. diatas rata-rata kadar protein yang terendah terdapat pada sampel susu dengan rata-rata nilai mastitis 3,75. Susu yang diperoleh dari sapi perah yang terkena mastitis akan mengalami penurunan kadar protein susu. Hal ini dapat disebabkan oleh adanya peradangan pada kelenjar susu akibat adanya pertumbuhan bakteri. Komponen susu termasuk didalamnya protein susu di bentuk di kelenjar susu yang terdiri dari alveolus. Setiap alveolus terdiri dari sel epitel yang merupakan sel-sel sekresi susu. Setelah mikroorganisme berhasil masuk ke dalam kelenjar, dalam waktu singkat akan membentuk koloni dan menyebar ke lobuli dan alveoli. Oleh karena adanya kerja mikroorganisme akan menyebabkan perubahan komposisi susu yang ada di dalam kelenjar susu hingga susu menjadi rusak [10]. Sesuai juga dengan pendapat Taylor [17] bahwa infeksi mastitis dapat menyebabkan kerusakan pada luar jaringan kelenjar susu, yang dikenal sebagai sel epitel. Di mana sintesis protein terjadi dalam sel epitel, dikontrol oleh gen yang mengandung bahan genetik yaitu DNA. Kerusakan ini meningkatkan ion sodium dan klorid yang dapat lepas ke dalam kelenjar susu. Peningkatan total protein dapat menyebabkan meningkatnya serum protein yang masuk ke dalam susu melalui darah, seperti halnya produksi susu menurun lebih cepat dibandingkan sintesis protein. Sintesis protein terjadi di ribosoma dimana terdapat mRNA yang dalam beberapa hal terikat dengan rRNA. Asam amino dibawa ketempat ikatan ini oleh tRNA aminoacyl-tRNA makin bertambah molekulnya. Antikodon dari tRNA mengenal kodon dan menempatkan asam amino pada

posisi permulaan. Pada sat ribosom bergerak melalui kodon, suatu amino acyl tRNA yang baru bergerak menempati posisinya. Pada saat yang bersamaan ikatan peptide antara grup karboksil dari satu asam amino dan grup amino dari asam amino kedua terbentuk. Sesudah ikatan peptide terbentuk maka tRNA dibebaskan kedalam cytoplasma sehingga dapat mengikat asam amino lainnya. Pada sisi yang lain, kasein yang merupakan jenis protein yang lain akan menurun bila produksi susu menurun. Peningkatan serum protein diharapkan menutupi kekurangan akibat menurunnya kadar kasein.



Gambar 1. Pengaruh antara rata-rata nilai mastitis terhadap kadar protein susu

Gambar 1 menunjukkan adanya pengaruh yang linier negatif antara tingkat mastitis dengan kadar protein susu yaitu $r = -0,726$ yang berarti bahwa semakin tinggi nilai mastitis maka kadar protein susu semakin rendah. Sedangkan koefisien determinasi menunjukkan ada tidaknya pengaruh mastitis terhadap kadar protein susu. Nilai $R^2 = 53\%$ berarti menurunnya kadar protein susu sapi perah di peternakan dipengaruhi oleh terjadinya mastitis sebesar 53%.

Berdasarkan hasil analisis statistik dengan menggunakan metode korelasi dan regresi serta hasil analisis sidik ragam F hitung > F tabel menunjukkan bahwa adanya pengaruh yang sangat nyata antara mastitis dengan kadar protein susu. Adapun persamaan tersebut $\hat{Y} = 3,210 - 0,399X$ dapat dijadikan sebagai alat penduga nilai Y (kadar protein susu), bila X (nilai mastitis) sudah diketahui.

Nilai Mastitis Berdasarkan Metode CMT dengan Kadar Lemak Susu

Hasil perhitungan menunjukkan bahwa kadar lemak susu sapi perah menurun dengan meningkatnya tingkat mastitis. Berdasarkan

Tabel 4, rata-rata kadar lemak yang terendah terdapat pada sampel susu dengan rata-rata nilai mastitis 1,75. Subronto [10], menyatakan bahwa setelah mikroorganisme berhasil masuk ke dalam kelenjar, mikroorganisme akan membentuk koloni yang dalam waktu singkat akan menyebar ke lobuli dan alveoli.

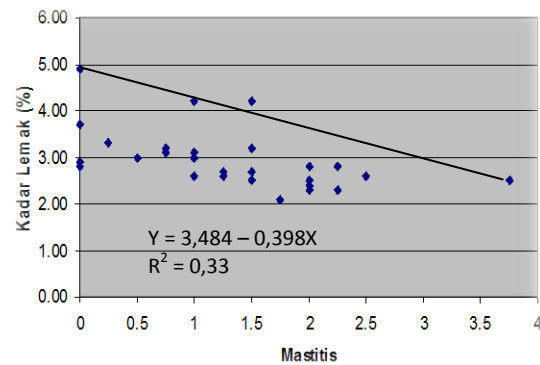
Tabel 4. Rata-rata kadar lemak susu sapi perah pada berbagai jumlah tingkat mastitis

No	Rata-rata nilai mastitis	Banyaknya sampel	Rata2 kdr lemak susu (%)
1	0	5	4,9 ± 2,8
2	0,25	1	3,3
3	0,5	1	3
4	0,75	2	3,2 ± 3,1
5	1	4	4,3 ± 2,6
6	1,25	2	2,7 ± 2,6
7	1,5	4	4,2 ± 2,5
8	1,75	1	2,1
9	2	4	2,8 ± 2,3
10	2,25	3	2,8 ± 2,3
11	2,5	2	2,6
12	3,75	1	2,5

Pada saat mikroorganisme sampai ke mukosa kelenjar, tubuh bereaksi dengan memobilisasikan leukosit. Karena adanya kerja mikroorganisme akan menyebabkan perubahan susu yang ada di dalam kelenjar mammae hingga susu menjadi rusak. Selanjutnya rusaknya kelenjar mammae akan merangsang timbulnya reaksi jaringan dalam bentuk peningkatan sel di dalam kelenjar susu. Oleh karena adanya radang maka produksi susu akan berkurang dan menyebabkan susunan susu mengalami penurunan, termasuk adanya penurunan kadar lemak susu. Sesuai juga dengan pendapat Shiddieqy [18] bahwa lemak susu dikeluarkan dari sel *epitel* ambing dalam bentuk globula lemak (*fat globule*) yang diameternya bervariasi antara 0,1 - 15 mikron. Globula lemak tersusun atas globula trigliserida yang dikelilingi membran tipis yang dikenal dengan *Fat Globule Membran* (FGM) atau membran globula lemak susu. Komponen utama dalam FGM adalah protein dan fosfolipid (*phospholipid*). FGM salah satunya berfungsi sebagai stabilisator globula lemak susu dalam emulsi dengan kondisi encer (*aqueous*) dari susu, karena susu sapi mengandung air sekira 87%. Peradangan menyebabkan lambatnya sintesis lemak sehingga konsentrasi lemak turun dan juga berkurangnya produksi susu.

Gambar 2 menunjukkan adanya pengaruh yang linier negatif antara tingkat mastitis dengan kadar lemak susu yaitu $r = -0,576$ yang berarti bahwa semakin tinggi nilai mastitis maka kadar

lemak susu semakin rendah. Sedangkan koefisien determinasi menunjukkan ada tidaknya pengaruh mastitis terhadap kadar protein susu. Nilai $R^2 = 33\%$ berarti menurunnya kadar lemak susu sapi perah di peternakan wilayah kerja Proyek Sapi Perah GKS Jawa Timur dipengaruhi oleh terjadinya mastitis sebesar 33%.



Gambar 2. Pengaruh antara rata-rata nilai mastitis terhadap kadar lemak susu

Berdasarkan hasil analisis statistik dengan menggunakan metode korelasi dan regresi serta hasil analisis sidik ragam F hitung > F tabel menunjukkan bahwa adanya pengaruh yang sangat nyata antara mastitis dengan kadar protein susu. Adapun persamaan tersebut $\hat{Y} = 3,484 - 0,398X$ dapat dijadikan sebagai alat penduga nilai Y (kadar lemak susu), bila X (nilai mastitis) sudah diketahui.

KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil persentase sapi perah sample yang sehat dan terkena mastitis di peternakan sebesar 16,67 % (5 ekor) dan 83,33 % (25 ekor). Mastitis mempengaruhi penurunan kadar protein susu sebesar 53% serta kadar lemak susu sebesar 33 %. Nilai mastitis mempunyai pengaruh yang linier negatif dengan kadar protein dan lemak susu, yaitu semakin tinggi nilai mastitis maka kadar protein dan lemak susu semakin menurun.

Dari hasil penelitian ini diketahui bahwa mastitis dapat menurunkan kadar protein dan lemak susu, sehingga disarankan kepada petani ternak sapi perah untuk menjaga kondisi lingkungan ternak perah, agar tidak mudah terinfeksi penyakit mastitis.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Sudono A., Rosdiana F.R. dan Setiawan B.S., 2003. Beternak sapi perah secara intensif. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- [2] Saleh E. 2004. Dasar pengolahan susu dan hasil ikutan ternak. Program Studi Produksi Ternak Fakultas Pertanian. Universitas Sumatera Utara.

- [3] Sudono A. 1999. Ilmu produksi ternak perah. Fakultas Peternakan. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- [4] Youngerman S.M., Oliver S.P., Saxton A.M., Edwards J.L., Schrick F.N., Davies C.J., dan Pighetti G.M. 2004. A novel candidate genetic marker for mastitis resistance in Jersey cattle. The University of Tennessee, Knoxville, TN.
- [5] Siregar S. 1996. Sapi Perah: jenis, teknik pemeliharaan dan analisa usaha. Penebar Swadaya. Jakarta
- [6] Santoso U. 1999. Prospek agribisnis penggemukan pedet. Penebar Swadaya. Jakarta.
- [7] Anonimus. 1995. Petunjuk praktis beternak sapi perah. Cooperative Centre Denmark. GKSJ Jawa Timur.
- [8] Prawesthirini S., Lusiastuti A.M., Harijani M., Estoepangestie A.T.S., Effendi M.H. dan Siswanto H.P. 2001. Analisis kualitas susu dan daging. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya
- [9] SNI. 1992. Metode pengujian susu segar. SNI 01-2782-1998/Rev.1992. Badan Standarisasi Nasional. Jakarta.
- [10] Subronto. 1995. Ilmu penyakit ternak. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta
- [11] Sudjana. 1992. Metode statistika, Edisi Lima. Tarsito. Bandung
- [12] Steel R.G.D. dan Torrie J.H. 1991. Prinsip Dan prosedur statistika. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- [13] Surjowardojo, Sarwiyono, Soejoseputro dan Setyowati. 1985. Manajemen sapi perah. Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya. Malang
- [14] Dinas Peternakan Jakarta Barat. 2006. Rakitan teknologi budidaya sapi perah. www.disnak.jabarprov.go.id.
- [15] Sarwiyono, Surjowardojo P. dan Susilorini T.E. 1990. Manajemen produksi ternak perah. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya. Malang.
- [16] Hidayat, Efendi, Fuat dan Patyadi. 2006. Manajemen kesehatan perah. www.disnak.jabarprov.go.id.
- [17] Taylor V. 2006. The warning signs of Mastitis: analyzing a combination of factors to decide when to treat. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. Ontario.
- [18] Shiddieqy M. 2002. Memetik manfaat susu sapi. Departemen Produksi Ternak Fakultas Peternakan Unpad.

Analisis Titer Antibodi Bovine Zona Pellusida 3 (Anti-bZP3) Hasil Induksi Bovine Zona Pellusida 3 (bZP3) pada Kera (*Macaca fascicularis*)

Maris Kurniawati¹, Sutiman B. Sumitro², Aulanni'am^{2*}

¹Program Pasca Sarjana Universitas Brawijaya Malang

²Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang

Abstrak

Zona pellusida 3 merupakan molekul glikoprotein yang berfungsi sebagai reseptor primer spermatozoa dalam proses fertilisasi. Bovine zona pellusida 3 (bZP3) dapat dikembangkan sebagai target antigen untuk vaksin imunokontrasepsi. Efektivitas kerja antibodi sangat dipengaruhi oleh titer antibodi. Tujuan dilakukan penelitian ini adalah mengetahui profil titer antibodi bovine zona pellusida 3 (anti-bZP3) hasil induksi bovine zona pellusida 3 (bZP3) pada kera (*Macaca fascicularis*). Imunisasi bZP3 pada kera (*Macaca fascicularis*) dilakukan secara sub kutan (SC) menggunakan CFA (*Complete Freund's Adjuvant*) untuk imunisasi pertama dan IFA (*Incomplete Freund's Adjuvant*) untuk imunisasi booster 1 dan booster 2. Serum dipanen sebanyak 4 kali setelah booster 1 dan 2. Hasil analisa menunjukkan berat molekul anti-bZP3 dari kera adalah 160 kDa. Titer naik mulai minggu ketiga hingga kelima dan turun lagi setelah minggu keenam setelah imunisasi pertama (minggu pertama hingga keempat pasca booster pertama) dan titer naik kembali pada minggu ke tujuh hingga kesembilan serta turun pada minggu ke sepuluh setelah imunisasi pertama (minggu pertama hingga ke empat pasca booster kedua). Titer antibodi tertinggi dicapai pada minggu kesembilan pasca imunisasi pertama atau minggu ketiga pasca booster kedua.

Kata kunci: bZP3, imunokontrasepsi, *Macaca fascicularis*, zona pellusida

Abstract

Pellusida Zone 3 is a glycoprotein molecule that functioned as the primary receptor of spermatozoa in the fertilization process. Bovine zona pellusida 3 (bZP3) can be developed as an antigen target for vaccine immunocontraception. Effectiveness of the antibody strongly influenced by the antibody titer. The purpose of this study was to determine the profile of bovine anti-bZP3 titers from the induction of bZP3 in monkeys (*Macaca fascicularis*). Immunization of bZP3 in monkeys conducted via sub-cutaneous (SC) using CFA (*Complete Freund's Adjuvant*) for the first immunization and IFA (*Incomplete Freund's Adjuvant*) for immunization booster 1 and booster 2. Serum harvested 4 times after the booster 1 and 2. The analysis shows the molecular weight of monkey's anti-bZP3 is 160 kDa. Titer rise began at the third until the fifth week and decrease again after the sixth week after the first immunization (first to fourth week after the first booster) and titers rose back in seventh to ninth week and decrease in tenth weeks after the first immunization (first to four week after the second booster). The highest antibody titers achieved in the ninth week after the first immunization or three weeks after the second booster.

Keywords: bZP3, immunocontraception, *Macaca fascicularis*, zona pellusida

PENDAHULUAN

Fertilisasi merupakan proses biologi dasar yang melibatkan interaksi sel-sel sperma dan sel-sel telur. Metode kontrasepsi dapat dilakukan dengan cara mencegah fertilisasi. Fertilisasi pada mamalia melibatkan bagian oosit yang disebut zona pellusida (ZP) yaitu suatu matrik ekstrasvaskuler yang menyelubungi oosit dan mempunyai fungsi penting dalam proses fertilisasi dan tahap awal perkembangan embrionik [1].

Rekayasa penghambatan fertilisasi dapat dilakukan dengan cara mengganggu fungsi reseptor sperma yang ada pada permukaan zona pellusida. ZP dari spesies yang heterolog menimbulkan reaksi imun yang kuat dan antibodi zona pellusida (anti-ZP) dapat menghambat fertilisasi [2]. Hal ini merupakan dasar pendekatan imunologi untuk menghasilkan vaksin kontrasepsi yang aman, ekonomis dan reversibel [3]. Hanya ada dua jenis glikoprotein yang berperan dalam proses fertilisasi yaitu ZP2 dan ZP3. ZP3 selain berperan serta sebagai reseptor primer spermatozoa juga dapat menginduksi reaksi akrosom, sedangkan ZP2 berperan sebagai reseptor sekunder untuk menjaga terikatnya sperma [4].

* Alamat korespondensi:

Aulanni'am

Email : aulanibiochem@yahoo.com

Alamat : Program Pasca Sarjana Universitas Brawijaya
Malang

Menurut Bagavant *et al.* [5] hasil studi menggunakan ZP sebagai imunogen ternyata menimbulkan antibodi dan dapat mencegah fertilisasi secara *in vivo*, tetapi diikuti oleh kerusakan ovarium mulai dari primordial folikel sampai folikel yang telah berkembang. Namun hal ini dapat diminimalisasi dengan pemberian imunisasi ZP3 murni. Penelitian yang dilakukan Sumitro dan Aulanni'am [6] telah menetapkan bahwa *bovine* ZP3 (bZP3) sebagai antigen spesifik yang diisolasi dari oosit sapi dapat menghambat fertilisasi yang bersifat reversibel dan efektif dalam merangsang terbentuknya antibodi bZP3 (anti-bZP3). Titer antibodi sangat dipengaruhi oleh konsentrasi antigen serta spesies hewan.

Bagavant *et al.* [5] melaporkan bahwa antigen zona pellusida efektif digunakan untuk imunokontrasepsi dalam berbagai jenis hewan. *Bovine* zona pellusida digunakan sebagai antigen karena antibodi yang dihasilkan mempunyai kemampuan yang cukup besar bereaksi silang dengan zona pellusida spesies mamalia seperti tikus dan kelinci. Efek anti fertilitas dari imunisasi aktif dengan antigen bZP3 telah ditunjukkan pada beberapa model hewan. Dalam penelitian ini akan dilakukan induksi bZP3 berbasis vaksin imunokontrasepsi pada hewan coba dari spesies anggota ordo primata yaitu kelompok kera (*Macaca fascicularis*) yang diperkirakan lebih mendekati manusia. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil titer antibodi *bovine* zona pellusida 3 (anti-bZP3) hasil induksi *bovine* zona pellusida 3 (bZP3) pada kera (*Macaca fascicularis*).

METODOLOGI

Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Biologi Molekuler dan Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, serta Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.

Bahan dan Alat Penelitian

Bahan-bahan yang dipakai dalam penelitian ini meliputi NaCl fisiologis 0,9%, *streptomycin*, *pinicilin*, *phosphate buffer saline* (PBS), *phenil metil sulfonil fluoride* (PMSF), *buffer tris-Cl*, SAS 50%, *buffer fosfat*, PBS-*tween* 20, *blocking buffer*, *buffer karbonat-bikarbonat*, *tris buffer saline* (TBS) dan NaOH 3 M.

Alat-alat penelitian yang digunakan dalam penelitian adalah *disposable syringe*, tabung reaksi, pipet pasteur, cawang petri, mikroskop

stereo, *ependorf*, sentrifus, *freezer*, elektroforesis, bunsen, gelas beker, *water bath*, *vortex*, pH meter, selofan, stirer, mikropipet, seker.

Koleksi Ovarium

Ovarium dicuci dengan NaCl fisiologis (0,9%), kemudian dimasukkan botol yang telah berisi NaCl fisiologis yang sudah ditambah pinisilin 0,006 gram/100 mL dan *streptomycin* 0,001 gram/100 mL dan sudah dihangatkan dengan suhu $\pm 38^{\circ}\text{C}$. Botol berisi ovarium dimasukkan kedalam termos pendingin kemudian dibawa ke laboratorium paling lambat 5 jam setelah pemotongan. Ovarium dibersihkan dari jaringan lemak dan jaringan ikat kemudian disimpan dalam freezer (-10°) maksimum 3 hari.

Isolasi Oosit

Oosit didapatkan dengan metode aspirasi. Oosit sapi direndam dalam NaCl fisiologis (0,9%), ovarium diambil dengan pinset. Ovarium diaspirasi dengan menggunakan *disposibel syringe* 5 mL dengan ukuran jarum 226x1/2" yang telah diisi dengan PBS dingin 2-4°C steril kurang lebih 1 mL. Hasil aspirasi berupa cairan folikel yang sudah dicampur dengan PBS dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril, kemudian didiamkan selama kurang lebih 20 menit untuk diendapkan. Dua pertiga larutan folikel bagian atas dibuang dengan menggunakan pipet pasteur. Sisanya dicuci dengan PBS dingin steril, caranya dengan menyemprotkan PBS dengan kuat ke dasar tabung selanjutnya diendapkan ± 20 menit, perlakuan ini dilakukan sebanyak tiga kali.

Cairan folikel yang sudah dicuci tersebut dimasukkan ke dalam cawan petri steril berdiameter 10 cm. Cairan folikel diamati dibawah mikroskop stereo, oosit dipilih yang gundul (kualitas KO) dan dipindahkan dalam cawan petri steril berisi PBS. Oosit dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali dengan cara memindahkan oosit dengan pipet pasteur ke dalam cawang petri steril yang telah berisi PBS.

Isolasi Bovine Zona Pellusida

Oosit yang sudah dikumpulkan dipecah dengan cara disedot dan ditiup menggunakan pipet pasteur yang berdiameter 8 μm di dalam larutan PBS yang telah ditambah 0,05 mM PMSF. Setelah itu bZP dicuci dengan PBS dingin (2-4°C) steril, dengan cara memindahkan bZP ke dalam cawan petri steril yang sudah berisi PBS. Selanjutnya bZP dipindah ke dalam larutan PBS. bZP dimasukkan kedalam *ependorf* yang berisi

PBS dengan pipet pasteur sambil dihitung jumlahnya, kemudian disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm 4°C selama 30 menit. Supernatan dibuang, dikeringkan kemudian ditambah 20 mM Tris-Cl 20 µl. bZP disimpan dalam freezer suhu -10°C dan siap digunakan sebagai bahan isolat bZP3.

Isolasi Zona Pellusida 3

Bahan isolat bZP ditambah RSB (1:1) kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 3 menit. Sampel selanjutnya dimasukkan sumuran gel yang sebelumnya telah disiapkan. Running dilakukan pada tegangan 200 V dan arus 40 mA dengan konstan arus. Gel hasil elektroforesis kemudian dipotong pada daerah 77 kDa dan dilanjutkan dengan elektroelusi.

Gel yang telah dipotong dimasukkan dalam selofan yang telah berisi *buffer fosfat* 0,05 M sebanyak 1 mL. Elektroelusi dilakukan pada suhu 4°C semalam dengan tegangan 250 V dan arus 20 mA konstan arus. Setelah dielektroelusi semalam *buffer fosfat* diambil dan dimasukkan ependorf. Etanol dingin dimasukkan dengan perbandingan 1:1 dan dihomogenkan. Selanjutnya, homogenat disentrifuge dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit. Etanol dibuang dan didapatkan presipitat bZP3. Presipitat dilarutkan pada *buffer tris-Cl* 20mM sebanyak 600 mikroliter. Sampel bZP3 disimpan pada freezer suhu -10°C dan siap digunakan untuk imunisasi.

Imunisasi dengan bZP3

Imunisasi pertama dilakukan pada kelompok hewan coba dengan menambah 300 µl bZP3 ke dalam *Complete Freund's Adjuvant*. Injeksi dilakukan dibagian subkutan pada beberapa sisi. Imunisasi kedua dilakukan dengan menambah 300 µL bZP3 ke dalam *Incomplete Freund's Adjuvant* yang disebut *booster* I. Kemudian dilakukan pengambilan darah dan *booster* II. Kemudian dilakukan pengambilan darah lagi.

Isolasi Serum dari Hewan Coba

Darah yang telah didapat sesuai masa inkubasinya didiamkan selama 10 menit pada suhu ruang darah disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm pada suhu ruang selama 20 menit. Supernatan sebagai serum dipindahkan ke dalam *ependorf* dan disimpan pada suhu -2°C untuk selanjutnya dilakukan purifikasi.

Purifikasi Anti bZP3 dari Serum

Serum ditambah dengan SAS 50% dengan pertandingan 1:1 kemudian dihomogenkan

dengan *vortex*. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 4°C selama beberapa menit. Supernatan dibuang, presipitat ditambah dengan SAS 50% (10 kali volume pelet), kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex*. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit. Presipitat ditambah dengan 0,05 M *buffer fosfat* pH 7 dan didialisis semalam pada suhu 4°C.

Pengukuran Titer Anti-bZP3

Anti-bZP3 yang dihasilkan dikarakterisasi berdasarkan nilai titer antibodi dengan teknik ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay*) dengan metode indirect ELISA.

Antigen ZP3 dengan kadar 1 µg/ml dilarutkan dalam *carbonat bicarbonate (coating buffer)* dimasukkan dalam mikroplate sebanyak 50 µl tiap *well*. Selanjutnya diinkubasi pada 4°C selama semalam kemudian mikroplate dicuci dengan PBS/*tween* 20 empat kali. Anti-bZP3 (antibodi primer) dilarutkan dalam *blocking buffer* BSA 1% dengan seri pengeceran 1/50, 1/100, 1/200, 1/400 kemudian dimasukkan mikroplate masing-masing 50 µl tiap *well*. Kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 2 jam. Mikroplate dicuci lagi dengan PBS/*tween* 20 empat kali. Selanjutnya anti-human IgG berlabel alkaline fosfatase dilarutkan dalam PBS/*tween* 20 dengan pengeceran 1/1000 dimasukkan mikroplate sebanyak 50 µl tiap *well*, kemudian diinkubasi pada suhu ruang 1 jam. Mikroplate dicuci dengan PBS/*tween* 20 sebanyak empat kali kemudian substrat pNPP dalam etanolamin 10% dimasukkan dalam mikroplate masing-masing sebanyak 50 µl tiap *well*. Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang 30 menit dalam ruang gelap, ditambah dengan NaOH 3M sebanyak 50 µl/*well*. Titer diukur dengan ELISA reader dengan panjang gelombang 405 nm.

Analisa Antibodi Zona Pellusida

Elektroforesis SDS-PAGE

Antibodi zona pellusida ditambah dengan RSB (1:1) kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 3 menit. Sampel selanjutnya dimasukkan sumuran gel yang sebelumnya telah disiapkan. Running dilakukan pada tegangan 150 V dan arus 30 mA dengan konstan arus. Selajutnya gel dikeluarkan dan dilakukan pewarnaan hingga terlihat band-band yang berwarna ungu.

Dot Blotting

Antigen diencerkan dalam PBS natrium azida 1% (1:4). Antigen yang telah diencerkan,

diteteskan pada membran nitroselulose yang telah dibasahi dengan PBS (terangkai pada alat dot blotter) dan di degas selama 30 menit.

Membran yang telah mengikat antigen diblok dengan PBS skim milk 5% selama 1 jam sambil digoyang. PBS skim milk dibuang kemudian dicuci dengan PBS/tween 20 sebanyak 3 kali. Kemudian diinkubasi dalam serum (antibodi primer) yang telah diencerkan dengan PBS skim milk 1% selama 2 jam sambil digoyang.

Membran + antigen + antibodi primer dicuci dengan PBS/tween 20 sebanyak 3 kali. Kemudian di inkubasi dalam anti-human IgG *Alkaline Phosphatase (AP) Conjugated* yang telah diencerkan dalam PBS selama 1 jam sambil digoyang. Kemudian membran dicuci dengan PBS/tween 20 sebanyak 3 kali, dan di inkubasi dalam *Subtract Western Blue* selama 3 menit dalam ruang gelap. Reaksi dihentikan dengan menambah akuades dan membran dikeringkan. Pada membran akan tampak noda berwarna ungu.

Western Blotting

Western blotting merupakan kelanjutan dari elektroforesis. Gel hasil elektroforesis dicuci dengan akuades kemudian direndam pada *blotting buffer*. Kertas saring juga direndam dalam *blotting buffer*. Selanjutnya disusun *sandwich* dengan urutan: kertas saring–membran PVDF, gel hasil elektroforesis–kertas saring dan dilakukan transfer dengan tegangan konstan 15 V dan arus kurang dari 0,35 A semalam. Membran diblok dengan 5% nonfat *milk* pada PBST selama 1 jam dan diseker. Kemudian dicuci dengan PBST 3x5 menit. Inkubasi antibodi primer semalam. Selanjutnya dicuci dengan TBS 3x5 menit. Inkubasi antibodi sekunder selama 1 jam pada temperatur ruang. Setelah itu dicuci dengan PBST 3x5 menit. Ditambahkan substrat untuk *blotting* pada ruang gelap dengan temperatur ruang dan dibiarkan semalam hingga terlihat warna band.

Spektrofotometri UV-Vis

Masing-masing serum antibodi yang telah dipurifikasi dilarutkan dalam *buffer phosphat* 0,05 M kemudian dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 260 nm dan 270 nm. Selanjutnya profil spektra dari setiap serum dianalisis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

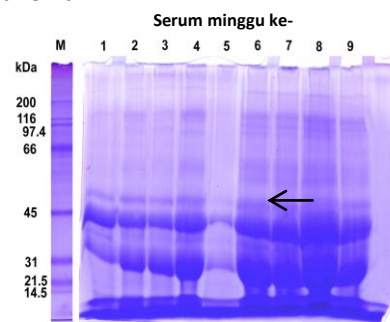
Imunisasi *Bovine Zona Pellusida 3* Pada Kera

Anti-bZP3 diperoleh dengan cara imunisasi bZP3 pada kelompok kera. Imunisasi dilakukan dengan penambahan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) pada 300 µl ZP3 dengan perbandingan 1:1 dilanjutkan dengan *booster 1* dan *booster 2* menggunakan 300 µl ZP3 dan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) dengan perbandingan 1:1. Kadar protein yang digunakan imunisasi sebesar 728 µg/ 200 µl pelarutnya. Persyaratan yang harus dimiliki oleh antigen adalah melebihi kadar protein 300 µg/ 200 µl pelarutnya. bZP3 yang telah diinduksikan dalam kera telah memenuhi syarat sebagai antigen. Bagavant *et al.* [5] telah melakukan imunisasi pada kera dari spesies *Macaca radiata* dengan menggunakan *porcine zona pellusida 3* sebanyak 100 µg pZP3 dan mampu menginduksi sintesis anti-pZP3.

Penentuan Berat Molekul Antibodi bZP3

Penentuan berat molekul dilakukan dengan menggunakan metode *Sodium Dodesil Sulfat-Poliakrilamid Gel Elektroforesis (SDS-PAGE)*.

Hasil elektroforesis serum kera menunjukkan bahwa ada pola pita yang berbeda antara serum kontrol dan serum kera perlakuan. Perbedaan tersebut dapat dilihat dari pita pada 158,6-162,4 kDa yang tidak terdapat pada kontrol. Rata-rata berat molekul dari anti-bZP3 dari serum kera adalah 160 kDa. Pita dengan berat molekul tersebut diduga sebagai IgG karena IgG merupakan imunoglobulin yang dominan pada serum darah. Pengambilan darah hingga dalam kurun waktu yang lama (3-10 minggu) hanya mungkin dari Ig G. Ig A berumur 6 hari, Ig D berumur 3 hari, Ig E berumur 2 hari dan Ig M berumur 5 hari.



Gambar 1. Elektroforegram dari serum kera pasca imunisasi 1. Keterangan: ← : anti-bZP3.

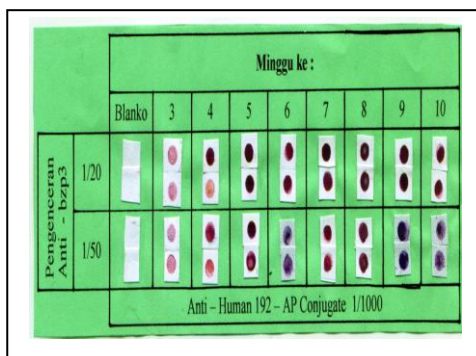
Pita hasil elektroforesis mempunyai ketebalan yang berbeda. Hal itu menunjukkan adanya

perbedaan konsentrasi anti-*bZP3*. Pita paling tebal terdapat pada minggu ke lima (minggu ke 3 setelah *booster* 1) dan minggu ke 9 (minggu ke 3 setelah *booster* 2) setelah imunisasi pertama. Pita yang ditunjukkan setelah *booster* kedua relatif lebih tebal dibanding setelah *booster* pertama. Hal ini disebabkan respon imun setelah *booster* kedua lebih tinggi dari pada setelah *booster* pertama.

Uji Spesifisitas Antibodi *bZP3* dengan *bZP3*

Untuk mengetahui spesifisitas antibodi (imunoglobulin) sebagai respon dari imunisasi *bZP3* dilakukan dengan menggunakan metode *dot blotting* dan *western blotting* yang bersifat semi kuantitatif. Hasil *dot blotting* memperlihatkan adanya reaksi antigen *bZP3* dengan antibodi terhadap *bZP3*.

Pada kontrol tidak menunjukkan adanya reaksi antigen dengan antibodi. Hal ini berarti kera yang telah diimunisasi dengan *bZP3* memberikan respon dengan menghasilkan antibodi terhadap *bZP3* dan sifat spesifitas anti-*bZP3* terhadap *bZP3*.



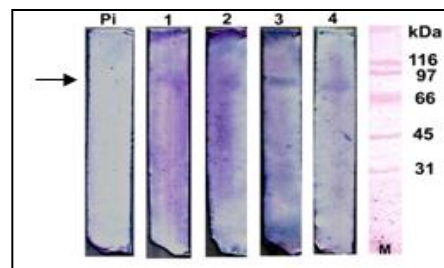
Gambar 2. Uji keberadaan dan spesifisitas *bZP3* terhadap anti-*bZP3* menggunakan metode *dot blotting*.

Warna ungu dari hasil pengujian menunjukkan bahwa antigen *bZP3* dapat dikenali oleh anti-*bZP3*. Warna itu menunjukkan telah terjadi reaksi spesifik antara *bZP3* dengan anti-*bZP3* yang difasilitasi dengan penambahan antibodi sekunder yang terlabel oleh *alkaline phosphatase* (AP) dengan substrat *western blue*. Pada kontrol tidak menimbulkan warna ungu karena dalam serum hewan kontrol tidak terdapat anti-*bZP3*.

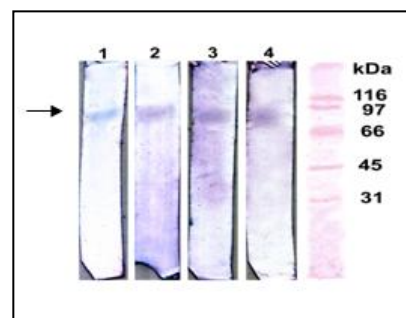
Pengenceran anti-*bZP3* sampai 1/50 masih menunjukkan intensitas yang berbeda pada pemanenan serum yang berbeda. Intensitas warna ungu tertinggi terdapat pada minggu ke lima setelah imunisasi pertama dan minggu ke sembilan setelah imunisasi pertama. Minggu ke lima berarti minggu ke tiga setelah *booster* pertama dan minggu kesembilan berarti minggu

ketiga setelah *booster* kedua. Selanjutnya pada minggu ketiga setelah imunisasi pertama atau minggu pertama setelah *booster* pertama warna ungu yang dihasilkan lebih tipis dibandingkan pada minggu keempat dan kelima.

Uji *western blotting* dipakai untuk melakukan konfirmasi terhadap data *dot blotting* seperti Gambar 3 dan 4. Intensitas warna ungu hasil *western blotting* pada Gambar 3 hasil pewarnaan anti-*bZP3* minggu ketiga hingga kelima pasca imunisasi pertama terjadi peningkatan intensitas warna ungu tetapi melemah pada minggu ke enam pasca imunisasi pertama. Hal ini juga terjadi pada pewarnaan anti-*bZP3* pada minggu 7, 8, 9 pasca imunisasi pertama. Intensitas warna ungu bertambah dari minggu ke 7 hingga ke 9 dan mulai melemah pada minggu 10, sehingga data profil titer antibodi secara kualitatif dapat diketahui. Hasil *western blotting* menunjukkan perbedaan intensitas warna sebanding dengan konsentrasi anti-*bZP3* dimana peningkatan konsentrasi titer terjadi ketika intensitas warna bertambah karena peningkatan intensitas warna menunjukkan kompleks antigen-antibodi yang terbentuk semakin banyak.



Gambar 3. Uji keberadaan dan Spesifitas *bZP3* dari serum kera (*Western Blotting*) setelah imunisasi pertama.



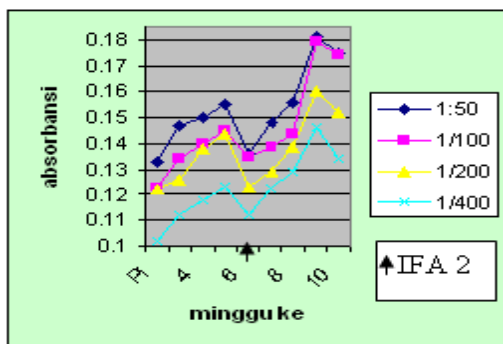
Gambar 4. Uji Keberadaan dan Spesifitas *bZP3* terhadap anti -*bZP3* dari serum kera menggunakan metode *western blotting* setelah imunisasi pertama.

Keterangan: (M) marker; (1) minggu 7; (2) minggu 8; (3) minggu 9; (4) minggu 10; → : Posisi *bZP3* yang dikenali anti-*bZP3* dari kera.

Kemampuan bZP3 dalam menginduksi anti-bZP3 pada *Macaca fascicularis* dapat diartikan bahwa apabila dibentuk pada *macaca* betina dapat menghambat proses fertilisasi.

Analisa Kuantitatif Anti-bZP3 dari Serum Kera dengan Metode ELISA

Titer anti-bZP3 pada langkah kerja ini diukur berdasarkan nilai absorbansi pada panjang gelombang 405 nm pada ELISA reader dengan metode *Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay* (ELISA).



Gambar 5. Analisa Profil Titer anti-bZP3 dari Serum kera hasil Induksi bZP3 menggunakan Metode ELISA. Keterangan: Pi: preimun; IFA2: booster kedua bZP3.

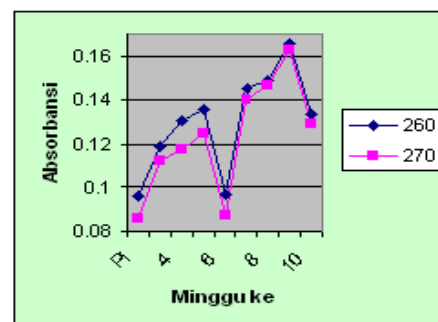
Gambar 5 menunjukkan bahwa profil titer anti-bZP3 yang diperoleh dari serum kera yang diinduksi oleh bZP3 meningkat dari minggu ketiga hingga minggu kelima dan menurun pada minggu keenam pasca imunisasi pertama. Titer tertinggi terjadi pada minggu kelima. Hasil pengukuran titer anti-bZP3 yang dipanen pada minggu-minggu pasca booster kedua menunjukkan titer yang lebih tinggi.

Induksi bZP3 akan memberikan respon dengan dihasilkannya anti-bZP3. Tiga ratus mikroliter bZP3 yang diinduksikan ternyata mampu menginduksi anti-bZP3 yang terus meningkat dari minggu ke 3 hingga ke 5 pasca imunisasi pertama, artinya selama tiga minggu bZP3 mampu menginduksi terbentuknya anti-bZP3. Setelah minggu ke 6 titer mengalami penurunan. Booster imunisasi antigen perlu diberikan pada saat titer antibodi yang ditimbulkan sudah rendah. Apabila booster diberikan pada saat titer tinggi maka pemberian booster tidak dapat menginduksi terbentuknya antibodi karena antigen yang masuk akan ditangkap oleh antibodi yang ada. Booster diberikan pada saat titer rendah untuk menginduksi terbentuknya antibodi kembali dan tidak ditangkap oleh antibodi yang diinduksi pada imunisasi sebelumnya. Minggu ke 3 merupakan

perhitungan dari pemberian imunisasi pertama. Sedangkan dari pemberian booster berselang seminggu. Hal ini dapat diartikan bahwa pemberian booster kembali diperlukan setelah 4 minggu dari booster sebelumnya. Minggu ke 7 hingga minggu 9 titer mengalami peningkatan dan menurun setelah minggu ke 10. Profil ini sama dengan profil minggu-minggu sebelumnya, dimana puncak tertinggi pada minggu 9 atau minggu ke 3 setelah booster ke 2.

Hasil pengukuran absorbansi ELISA dengan pengenceran anti-bZP3 1/50, 1/100, 1/200 dan 1/400 menunjukkan pola profil titer dari anti-bZP3 dari serum kera sebanding dengan besarnya pengenceran. Pengukuran titer dengan pengenceran sampai dengan 1/400 masih dapat dibaca profil titernya. Berbagai pengenceran yang telah dilakukan dimaksudkan untuk mengetahui tingkat sensitifitas dari pengukuran titer anti-bZP3 dengan menggunakan metode ELISA. Sensitifitas tertinggi adalah pengukuran antibodi dengan pengenceran tertinggi.

Hasil ELISA didukung dengan data hasil pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 260 nm dan 270 nm. IgG dapat diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 260-270 nm sehingga pada penelitian ini pengukuran dengan metode spektrofotometri merupakan data pendukung dari data yang diperoleh dari metode ELISA. Profil titer hasil pengukuran dengan metode spektrofotometri dapat dilihat pada gambar 6. Hal ini sesuai dengan pendapat [7] yang menyatakan bahwa protein yang mempunyai gugus karboksilat dan gugus amina mempunyai serapan maksimum pada panjang gelombang 260 nm.



Gambar 6. Penentuan absorbansi anti-bZP3 dari serum kera dengan spektrofotometer UV-Vis dengan λ 260 nm dan 270 nm. Keterangan: Pi: preimun.

Hasil pengukuran anti-bZP3 dengan metode ELISA mempunyai kesamaan dengan hasil pembacaan dengan spektrofotometri. Titer

tertinggi terdapat pada minggu kelima setelah imunisasi pertama dan minggu ke sembilan setelah imunisasi kedua. Namun puncak tertinggi titer anti-bZP3 terjadi pada minggu kesembilan pasca imunisasi pertama.

Adapun induksi anti-bZP3 diduga melalui jalur yaitu antigen ditangkap oleh APC (sel dendrit), dan dipresentasikan bersama MHC kelas II yang mengadakan kompleks dengan dendrite sel. Sinyal dibawa oleh T helper menyebabkan aktivasi T helper untuk membentuk reseptor T, selanjutnya disekresikan soluble molekul sitokin (IL – 2) yang mengaktifasi sel-sel yang lain seperti aktivasi pada sel B. Dalam plasma limfosit B mensekresikan Ig G sebagai anti-bZP3 dan pada mamalia betina anti-bZP3 akan menuju pada target sel yaitu sel ovarium [6].

Molekul ZP3 dari satu spesies dengan spesies yang lain terdapat bagian yang bersifat homolog. Menurut Carino *et al.* [8] ZP3 babi mempunyai homologi dengan manusia sebesar 74 %. Homologi ini juga terjadi pada mamalia yang lain. Antara sapi dengan kera juga ada sifat homologi tersebut maka pada saat dilakukan imunisasi pada kera maka antibodi yang dihasilkan akan mengenali bZP3 pada kera. Selanjutnya akan terjadi interaksi dari ZP3 hewan yang diinduksi dengan anti-bZP3 hasil induksi bZP3.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa induksi *bovine* zona pellusida 3 (bZP3) pada kera (*Macaca fascicularis*) mampu mensintesis anti *bovine* zona pellusida 3 (anti-bZP3). Karakteristik anti-bZP3 hasil induksi bZP3 pada kera mempunyai berat molekul sebesar 160 kDa. Data *imunoblotting* menunjukkan bahwa profil titer antibodi bZP3 menunjukkan peningkatan dari minggu 3 hingga minggu ke 5 setelah imunisasi pertama dan menurun setelah minggu ke 6 (minggu pertama hingga ke 4 setelah *booster* 1). Titer kembali meningkat setelah *booster* 2 dan mencapai puncak pada minggu ke 9 dan turun kembali pada minggu ke 10 setelah imunisasi pertama (minggu pertama hingga ke 4 setelah *booster* 2). Titer pada minggu ke 5 rata-rata sebesar 0,15 dan pada minggu ke 9 rata-rata sebesar 0,17 dengan metode ELISA pada pengeceran anti-bZP3 1/100.

Saran

Masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang peranan bZP3 sebagai calon imuno-

kontrasepsi pada kelompok kera (*Macaca fascicularis*).

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Sinowatz F. 2002. Kumpulan Abstrak PIN 2002 PAAI: New Concepts in Sperm-Oocyte, Interaction and Immunocontraception. University of Munich. Germany.
- [2] Hasegawa A., Yamakasi N., Inove M., Koyama K., dan Isojika S. 1995. Analysis of an epitope sequence recognized by monoclonal antibody Mab-5H4 against a Porcine Zona Pellucida Glycoprotein (p-ZP4) that block fertilization. *Journal of Reproduction and Fertility*. 105 (2): 295-302.
- [3] Gwatkin R.B.L. 1982. Receptor for sperm on the mammalian ovum. In Hafez E.S.E. and Semm K. (Eds). In Vitro fertilization and embryo transfer. A.R. Liss. New York.
- [4] Bauksin A.R., Franken D.R., Eberspacher U., dan Domes P. 1999. Characterization of Human Zona Pellucida Glycoprotein. *Molecular Human Reproduction*. 5 (6): 534-540.
- [5] Bagavant H., Thillai-Koothan P., Sharma M.G., Talwar G.P., dan Gupta S.K. 1994. Antifertility effect of Porcine Zona Pellucida-3 immunization using permissible adjuvant in female Bonnet Monkey (*Macaca radiata*): Reversible, effect on follicular development and hormonal profiles. *Journal of Reproduction and Fertility*. 102: 17-25.
- [6] Sumitro S.B. dan Aulanni'am. 2002. Zona Pellucida 3 (ZP3) has proper biochemical properties to be considered as candidate antigen for immunocontraceptive vaccine. *Reprotech*. 1 (1). 51-53.
- [7] Hendayana S.A., Kadarohmah, Sumarna A.A., dan Supriatna A. 1994. Kimia Analitik Instrumen. IKIP Semarang Press. Semarang.
- [8] Carino C.L.D. and Mendez I. 2001. Zona pellucida antigens in the human ovum: its importance in contraceptive strategies. *Revista de Investigacion Clinica*. 53 (2): 174-180.

MANUSCRIPT SUBMISSION

FOCUS AND SCOPE

Journal of Experimental Life Science (JELS) is scientific journal published by Graduate Program of Brawijaya University as distribution media of Indonesian researcher's results in life science to wider community. JELS is published in every four months. JELS published scientific papers in review, short report, and life sciences especially nanobiology, molecular biology and cellular biology. JELS is scientific journal that published compatible qualified articles to academic standard, scientific and all articles reviewed by expert in their field.

Journal of Experimental Life Science (JELS) have vision to become qualified reference media to publish the best and original research results, and become the foundation of science development through invention and innovation on cellular, molecular, and nanobiology rapidly to community.

Journal of Experimental Life Science (JELS) have objectives to published qualified articles on research's results of Indonesian researchers in life science scope. JELS encompasses articles which discuss basic principles on nature phenomenon with cellular, molecular, and nanobiology approach.

PEER REVIEW PROCESS

Publication of articles by JITODE is dependent primarily on their validity and coherence, as judged by peer reviewers, who are also asked whether the writing is comprehensible and how interesting they consider the article to be. All submitted manuscripts are read by the editorial staff and only those articles that seem most likely to meet our editorial criteria are sent for formal review. All forms of published correction may also be peer-reviewed at the discretion of the editors. Reviewer selection is critical to the publication process, and we base our choice on many factors, including expertise, reputation, and specific recommendations. The editors then make a decision based on the reviewers' advice, from among several possibilities:

Accepted, with or without editorial revisions
Invite the authors to revise their manuscript to address specific concerns before a final decision

Rejected, but indicate to the authors that further work might justify a resubmission

Rejected outright, typically on grounds of specialist interest, lack of novelty, insufficient conceptual advance or major technical and/or interpretational problems

PUBLICATION FREQUENCY

JELS publish 2 Issues per year.

OPEN ACCESS POLICY

This journal provides immediate open access to its content on the principle that making research freely available to the public supports a greater global exchange of knowledge.

COPYRIGHT NOTICE

Authors who publish with this journal agree to the following terms:

Authors retain copyright and grant the journal right of first publication with the work simultaneously licensed under a Creative Commons Attribution License that allows others to share the work with an acknowledgement of the work's authorship and initial publication in this journal.

Authors are able to enter into separate, additional contractual arrangements for the non-exclusive distribution of the journal's published version of the work (e.g., post it to an institutional repository or publish it in a book), with an acknowledgement of its initial publication in this journal.

Authors are permitted and encouraged to post their work online (e.g., in institutional repositories or on their website) prior to and during the submission process, as it can lead to productive exchanges, as well as earlier and greater citation of published work (The Effect of Open Access).

PRIVACY STATEMENT

The names and email addresses entered in this journal site will be used exclusively for the stated purposes of this journal and will not be made available for any other purpose or to any other party.

ETHICS PUBLICATION

Research that using animal, human, and clinical testing is should already have ethical clearance certificate from authorized institution.

**Title Typed in Bold, Capitalize each First Letter of Each Word, Except
Conjunctive, *Scientific name* should not be Abbreviated
(Calibri 14 Bold Center, should not exceed 12 words, except conjunctive)**

First Author^{1*}, Second Author², Third Author³ (Calibri 12 Center, without title)

¹First Author Affiliation, Correspondence author should be indicated by * symbol (Calibri 9 Center)

²Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Brawijaya, Malang, Indonesia

³Laboratorium of Physiology, Faculty of Medicine, University of Brawijaya, Malang, Indonesia

Abstract (Calibri 9 Bold Center)

This article illustrates preparation of your paper using MS-WORD (.doc or .rtf). Manuscript was numbered consecutively. Main text typed in two columns (67 characters), except title and abstract in one column. The manuscript should be written in English. The length of manuscript should not exceed 10 pages including table and figure in this format using A4 paper single space. The text should be in the margin of 3 cm up, down and left side, 2.5 cm on right side. Abstract includes the research purposes, research method and research results in one paragraph of *essay*, not *enumerative*. No citation in abstract. Abstract should not exceed 200 words. Keywords typed after abstract. (Calibri 9 Justify).

Keywords: manuscript, English, format, 5 words maximum (Calibri 9 Left)

INTRODUCTION* (Calibri 10 Bold, Left, Capslock)

All submitted manuscripts should contain original research which not previously published and not under consideration for publication elsewhere. Articles must be written in ENGLISH and manuscripts may be submitted for consideration as research report articles, short reports or reviews.

The introduction explains the background of the problem, the study of literature and research purposes. Some initial introduction paragraphs explain the problem and background to these problems [1]. The next few paragraphs explain the study of literature that contains recent knowledge development which is directly related to the issues. The last paragraph of the introductory section contains a description of the purposes of the study. (Calibri 10 Justify)

MATERIAL AND METHOD (Calibri 10 Bold, Left, Capslock)

This section describes the types of methods (qualitative, quantitative or mixed-method) with details of methods of data collection and data analysis [2]. This section also describes the perspective that underlying the selection of a particular method. (Calibri 10 Justify)

Data Collection (Calibri 10 Bold, Left)

Explain the data collection methods, i.e. surveys, observations or archive, accompanied by details of the use of such methods. This section also describes the population, sampling and sample selection methods. (Calibri 10 Justify)

The use of English language should followed proper grammar and terms. Name of organism should be followed by its full scientific name in the first mention, in *italic* [3]. Author of the scientific name and the word of “var.” typed regular. Example: *Stellaria saxatillis* Buch. Ham. First abbreviation typed in colon after the abbreviated phrase.

Author must use International Standard Unit (SI). Negative exponent used to show the denominator unit. Example: $g\ l^{-1}$, instead of g/l . The unit spaced after the numbers, except percentage [4]. Example: $25\ g\ l^{-1}$, instead of $25g\ l^{-1}$; 35% instead of 35 %. Decimal typed in dot (not coma). All tables and figures should be mentioned in the text.

RESULT AND DISCUSSION (Calibri 10 Bold, Left, Capslock)

This section contains the results of the analysis and interpretation or discussion of the results of the analysis. Describe a structured, detailed, complete and concise explanation, so that the reader can follow the flow of analysis and thinking of researchers [5]. Part of the results study should be integrated with the results of the

Correspondence address: (Calibri 8 Bold, Left)

Full name of correspondence author

Email : sapto@jurnal.ub.ac.id

Address : affiliation address include post code

analysis and the results and discussion are not separated.

Table

Table should be submitted within the manuscript and in separated file of *Microsoft Excel* (xls.). Table would not exceed 8 cm (one column) and 17 cm (two columns). Table should be embedded in different page after references.

Table should be numbered in sequence. Table title should be brief and clear above the table, with uppercase in initial sentence. Vertical line should not be used. Footnote use number with colon and superscripted. Symbol of (*) or (**) was used to show difference in confidence interval of 95 and 99%.

Table 1. Example of the Table (Calibri 8.5 Left)

No	Point (Calibri 8.5 Justify)	Description
1		
2		
3		
4		
5		

Sources: Journal of PPSUB (Calibri 8.5 Left)

Figures

Figures should be in high resolution and well contrast in JPEG or PDF with the following conditions:

- Monochrome image (line art), figures of black and white diagram (solid/no shades of gray), resolution 1000-1200 dpi (dot per inch).
- Combination Halftone, combine figure and text (image containing text) and coloured graphic or in grayscale format. Resolution 600-900 dpi.
- Halftone, coloured figure or grayscale format without text. Resolution 300 dpi.

- Black and white figure should be in the grayscale mode, while coloured figures should be in RGB mode.
- Figure should not exceed the width of 8 cm (one column), 12.5 cm (1.5 columns) or 17 cm (two columns).
- Figures title typed clearly below the figure.
- Figure with pointing arrow should be grouped (grouping).
- Figures were recommended in black and white.
- Legend or figure description should be clear and complete. If compressed, the figure should be readable.
- Statistic graphic should be supplemented with data sources.
- If the figures come from the third party, it should have the copyright transfer from the sources.

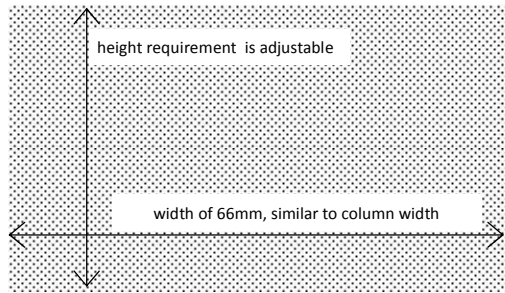


Figure 1. Illustration of Dimensional Figure of one column width. Figure dimension adjusted to the width of one column. Name the figure (diagram) written below the image. (Calibri 8.5 Justify)

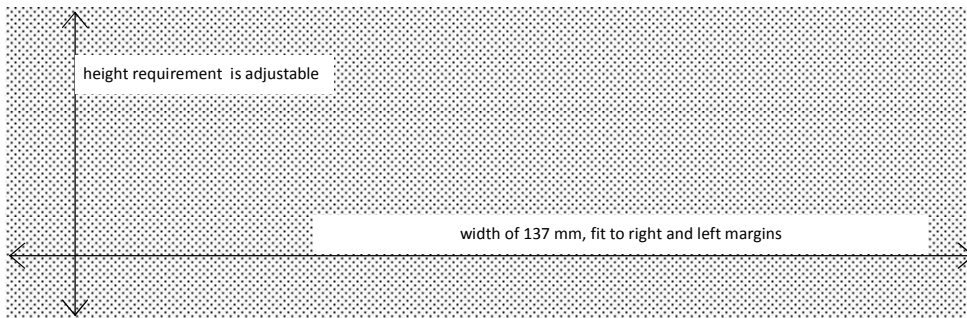


Figure 2. . Illustration of Dimensional Figure of two column width. Figure dimension adjusted to the width of two columns (137 mm). Figure were align top or bottom of the page. (Calibri 8.5 Justify)

References

1. Primary references include journal, patent, dissertation, thesis, paper in proceeding and text book.
 2. Avoid self citation.
 3. Author should avoid reference in reference, popular book, and internet reference except journal and private ana state institution.
 4. Author was not allowed to use abstract as references.
 5. References should been published (book, research journal or proceeding). Unpublished references or not displayed data can not be used as references.
 6. References typed in numbering list (format number 1,2,3,...), ordered sequentially as they appear in the text (system of Vancouver or author-number style).
 7. Citation in the manuscript typed only the references number (not the author and year), example: Obesity is an accumulation of fat in large quantities which would cause excessive body weight (overweight) [1]. Obesity is a risk factor of diabetic, hypertension dan atherosclerosis [2].
- [4].Syafi'i, M., Hakim, L., dan Yanuwiyadi, B. 2010. Potential Analysis of Indigenous Knowledge (IK) in Ngadas Village as Tourism Attraction. pp. 217-234. In: Widodo, Y. Noviantari (eds.) *Proceed-ing Basic Science National Seminar 7* Vol.4. Universitas Brawijaya, Malang. (Article within conference proceeding)
- [5].Dean, R.G. 1990. Freak waves: A possible explanation. p. 1-65. *In* Torum, A., O.T. Gudmestad (eds). *Water wave kinetics*. CRC Press. New York. (Chapter in a Book)
- [6].Astuti, A.M. 2008. The Effect of Water Fraction of *Stellaria* sp. on the Content of TNF- α in Mice (*Mus musculus* BALB-C). Thesis. Department of Biology. University of Brawijaya. Malang. (Thesis)

CONCLUSION (Calibri 10 Bold, Left, Capslock)

Conclusion of the study's findings are written in brief, concise and solid, without more additional new interpretation. This section can also be written on research novelty, advantages and disadvantages of the research, as well as recommendations for future research. (Calibri 10 Justify)

ACKNOWLEDGEMENT (Calibri 10 Bold, Left, Capslock)

This section describes gratitude to those who have helped in substance as well as financially. (Calibri 10 Justify)

REFERENCES (Calibri 10 Bold, Left, Capslock)

- [1].(Calibri 10 Justify, citation labelling by references numbering)
- [2].Vander, A., J. Sherman., D. Luciano. 2001. *Human Physiology: The Mecanisms of Body Function*. McGraw-Hill Higher Education. New York. (Book)
- [3].Shi, Z., M. Rifa'i, Y. Lee, K. Isobe, H. Suzuki. 2007. Importance of CD80/CD86-CD28 interaction in the recognition of target cells by CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells. *Journal Immunology*. 124. 1:121-128. (Article in Journal)

Cover Images:

3D Structure of EGCG (*Epigallocatechin-3-Gallate*)
Green Tea Component

Created by:

Widodo, S.Si.,M.Si.,Ph.D MED Sc.

Address:

Building E, 2nd Floor, Graduate Program, University of Brawijaya

Jl. Mayor Jenderal Haryono 169, Malang, 65145

Telp: (0341) 571260 ; Fax: (0341) 580801

Email: jels@ub.ac.id

Web: jels.ub.ac.id

