

**UJI *in vivo* TREATMENT CRUDE PERIDININ MIKROALGA LAUT
Nanochloropsis oculata TERHADAP EKSPRESI TNF- α (Tumor
Necrosis Factor Alpha) PADA IKAN KERAPU TIKUS (*Cromileptes
altivelis*) YANG TERINFEKSI VNN (Viral Nervous Necrosis)**

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

Oleh:
AFIK SUDARSONO
NIM. 0810810031



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG
2013**

SKRIPSI

**UJI *in vivo* TREATMENT CRUDE PERIDININ MIKROALGA LAUT
Nanochloropsis oculata TERHADAP EKSPRESI TNF- α (Tumor
Necrosis Factor Alpha) PADA IKAN KERAPU TIKUS (*Cromileptes
altivelis*) YANG TERINFEKSI VNN (Viral Nervous Necrosis)**

Oleh :
AFIK SUDARSONO
NIM. 0810810031

Telah Dipertahankan di depan Penguji
Pada Tanggal 31 Juli 2013
Dan Dinyatakan telah Memenuhi Syarat

Menyetujui

Dosen Penguji I

Ir. Putut Widjanarko, MP
NIP. 19540101 198303 1 006
Tanggal : _____

Dosen Pembimbing I

Dr. Uun Yanuhar S.Pi, M.Si
NIP. 19730404 200213 2 001
Tanggal : _____

Dosen Penguji II

Dr. Ir. Mohammad Mahmudi, MS
NIP. 19600505 198601 1 004
Tanggal : _____

Dosen Pembimbing II

Ir. Kusriani, MP
NIP. 19560417 198403 2 001
Tanggal : _____

**Mengetahui,
Ketua Jurusan MSP**

Dr. Ir. Happy Nursyam, MS
NIP. 19600322 198601 1 001
Tanggal : _____

PERNYATAAN ORISINALITAS

Mengetahui,
Ketua Peneliti

Malang, Agustus 2013
Mahasiswa,

Materai
Rp 6.000,-

Dr. UUN YANUHAR, S.Pi, M.Si
NIP. 19730404 200212 2 001

AFIK SUDARSONO
NIM. 0810810031

LEMBAR KHUSUS

UCAPAN TERIMAKASIH

PENELITIAN INI ADALAH SEBAGIAN DARI PENELITIAN MELALUI PROGRAM PENELITIAN UNGGULAN PAYUNG DIKTI DENGAN PROGRAM UNGGULAN HIBAH PASCA SARJANA TAHUN 2012 DAN PROGRAM PENELITIAN UNGGULAN BOPTN TAHUN 2013 YANG DIKETUAI OLEH Dr. UUN YANUHAR, S.Pi, M.Si DENGAN KONTRAK PENELITIAN DIKTI NO: 0636/023-04.2.16/15/2012 DAN NO. KONTRAK 528/UN 10.21/KU/2013 TANGGAL 16 Mei 2013 DENGAN JUDUL :

UJI *in vivo* TREATMENT CRUDE PERIDININ MIKROALGA LAUT *Nannochloropsis oculata* TERHADAP EKSPRESI TNF- α PADA IKAN KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*) YANG TERINFEKSI VNN (*Viral Nervous Necrosis*)

YANG DIBIYAI OLEH :

PROGRAM PENELITIAN UNGGULAN PAYUNG DIKTI DENGAN PROGRAM UNGGULAN HIBAH PASCA SARJANA TAHUN 2012 DAN PROGRAM PENELITIAN UNGGULAN BOPTN TAHUN 2013

YANG MELIBATKAN MAHASISWA S1, S2 DAN S3:

1. Ir. NICODEMUS DAHOKLORY, M.Si
2. ARIF HABIB FASYA, S.Pi
3. RIMA OKTAVIA KUSUMA, S.Pi
4. ARAFIK LAMADI, SST
5. RYAN CHRISTIAWAN
6. AFIK SUDARSONO
7. PARAMITA PUTRI LARASATI
8. ZULFIKRI
9. RAHMAT SANDI RAHARJA
10. CAHYO DWI NUGROHO
11. DWI LISTYORINI
12. CATUR WAHYUDI
13. ALFIA GITA KUNTARI
14. LENI SRI WAHYUNI
15. LUQMAN HARIONO

Mengetahui,
Ketua Peneliti

Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si
NIP. 19730404 200212 2 001

RINGKASAN

AFIK SUDARSONO. Program Studi Manajemen Sumberdaya Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. **Uji *in vivo* Treatment Crude Peridinin** Mikroalga Laut *Nanochloropsis oculata* terhadap Ekspresi **TNF- α (Tumor Necrosis Factor Alpha)** pada Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) yang Terinfeksi VNN (*Viral Nervous Necrosis*). Pembimbing : 1. Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si dan 2. Ir. Kusriani, MP.

Sebagai komoditas ekspor unggulan, Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) diminati karena bernilai ekonomis tinggi. Namun dalam pengembangannya masih dihadapkan pada penyakit yakni *Viral Nervous Necrotic* (VNN) yang merupakan virus *Encephalopathy* dan *Retinopathy* yang menyebabkan kematian ikan hingga 100%. Pengetahuan mengenai molekul sistem imun diperlukan sebagai aplikasi selanjutnya. TNF- α merupakan sitokin pleiotropik yang dapat menghambat proliferasi virus. Penanggulangan VNN masih terbatas pada pemakaian bahan kimia yang tidak selektif dan bersifat resisten. Untuk itu dilakukan pengembangan protein rekombinan berbahan hayati. *Nanochloropsis oculata* adalah mikroalga laut yang mengandung senyawa esensial sebagai antimikroba. *Peridinin* merupakan protein larut oleh air, berada di dalam kloroplast alga yang berpotensi sebagai bahan antiviral.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui mekanisme antiviral dari *Crude Peridinin N. oculata* terhadap penyakit VNN pada ikan Kerapu Tikus melalui ekspresi molekul TNF- α pada organ target.

Metode Penelitian ini adalah Eksperimen. Kegiatan penelitian meliputi Uji klinis *Crude Peridinin* dan VNN pada ikan Kerapu Tikus, Isolasi organ, Deteksi kualitatif molekul TNF- α dengan metode SDS PAGE pada organ target (mata dan otak) dan Uji Hemaglutinasi (HA),

Berdasarkan hasil penelitian, molekul *Peridinin N. oculata* terekspresi dalam 2 bentuk yakni 16 kDa (*homodimer*) dan 37 kDa (*monomer*). Hasil analisa SDS PAGE pada organ target ikan Kerapu Tikus, molekul TNF- α terekspresi pada semua perlakuan dengan BM 17 kDa (matang) dan 26 kDa (transmembran). Analisa HA, reaksi positif lemah terjadi pada ikan kontrol yakni hanya sampai pengenceran 1/2 (sensitivitas 0,5) dan reaksi positif kuat terjadi pada perlakuan induksi *Crude Peridinin* dan paparan VNN yakni mencapai pengenceran 1/64 (2^6) dengan nilai sensitivitas 0,015625.

Berdasarkan data hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa adanya pengaruh *treatment Crude Peridinin* dari mikroalga *N. oculata* dapat digunakan sebagai bahan induser yang berperan penting dalam ekspresi molekul sel imun proinflamasi TNF- α terkait upaya pencegahan terhadap infeksi VNN pada ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*)



KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, Ya Allah, semoga penulis selalu bisa mensyukuri dan menjadi Tawadhu' dengan selesainya penyusunan Skripsi ini dengan judul "Uji *in vivo* Treatment Crude *Peridinin* Mikroalga Laut *Nanochloropsis oculata* terhadap Ekspresi TNF- α (*Tumor Necrosis Factor Alpha*) pada Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) yang Terinfeksi VNN (*Viral Nervous Necrosis*)".

Penelitian ini berusaha mengungkap kebesaran Allah melalui ciptaan-Nya yakni makhluk mikroskopis yang membawa manfaat yang luas bagi manusia. Subhanallah, *N. oculata* yang sebelumnya terbatas eksplorasinya, ternyata mempunyai peranan yang luar biasa penting bagi ekosistem, kegiatan budidaya dan akhirnya dapat memenuhi kebutuhan manusia. Kandungan *Peridinin* dan protein esensial yang lengkap dari *N. oculata* mampu mendukung kondisi kesehatan ikan sehingga dapat terhindar dari serangan penyakit infeksius dari organisme patogen.

Dengan segala kelamahan, penulis menyadari hasil penelitian Skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh karenanya kritik dan saran konstruktif sangat diharapkan demi kesempurnaan dari Skripsi ini dan semoga bermanfaat baik dalam pengembangan ilmu pengetahuan yang mampu mendekatkan diri kita kepada-Nya.

Malang, Agustus 2013

Penulis

DAFTAR ISI

RINGKASAN	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GRAFIK	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
 BAB I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.4.1 Manfaat Praktis	5
1.4.2 Manfaat Teoritis	5
1.5 Tempat dan Waktu	5
 BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Ikan Kerapu Tikus (<i>C. altivelis</i>)	6
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi	6
2.1.2 Habitat dan Penyebaran	7
2.1.3 Reproduksi	8
2.1.4 Kualitas Air Ikan Kerapu Tikus (<i>C. altivelis</i>)	8
2.2 <i>Viral Nervous Necrosis (VNN)</i>	10
2.2.1 Morfologi dan Karakter VNN	11
2.2.1 Infeksi VNN pada Ikan Kerapu Tikus	12
2.3 Sistem Pertahanan Tubuh Ikan	14
2.3.1 Komponen dalam Sistem Pertahanan <i>Innate</i> (Non-spesifik)	16
2.3.2 Sitokin (<i>Cytokine</i>)	17
2.3.2.1 <i>Tumor Necrosis Factor (TNF)</i>	19
2.4 Mikroalga Laut <i>Nanochloropsis oculata</i>	22
2.4.1 Klasifikasi dan Morfologi <i>N. oculata</i>	22
2.4.2 Sifat dan Ekologi	23

2.5 Peridinin (Peridinin Chlorophyl Protein/PCP)	24
--	----

BAB III. MATERI DAN METODE

3.1 Materi Penelitian	27
3.2 Alat dan Bahan	27
3.2.1 Alat	27
3.2.2 Bahan	28
3.3 Metode Penelitian	28
3.4 Prosedur Penelitian	29
3.4.1 Aklimatisasi Ikan Kerapu Tikus (<i>C. altivelis</i>)	29
3.4.2 Uji Klinis <i>Crude Peridinin</i> pada Ikan Kerapu Tikus	29
3.4.3 Pengukuran Konsentrasi Coat Protein VNN	30
3.4.4 Uji Klinis Infeksi VNN pada Ikan Kerapu Tikus	31
3.4.5 Identifikasi BM Profil Protein Organ Target & Analisa Ekspresi Molekul TNF- α menggunakan Metode SDS PAGE	31
3.4.5 Uji Hemaglutinasi (HA) <i>Crude Peridinin N. oculata</i> dan VNN terhadap Sel Darah Merah (RBC) Ikan Kerapu Tikus (<i>C. altivelis</i>)	34
3.5 Parameter Penelitian	35
3. 6 Teknik Analisa Data	36

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengukuran Konsentrasi Protein VNN pada Ikan Kerapu Tikus yang Terinfeksi VNN	37
4.2 Uji <i>in vivo Crude Peridinin</i> Mikroalga Laut <i>N. oculata</i> dan VNN pada Ikan Kerapu Tikus (<i>C. altivelis</i>)	37
4.3 Profil Protein Organ Ikan Kerapu Tikus (<i>C. altivelis</i>) dan Analisa Ekspresi Molekul TNF- α Menggunakan Metode SDS-PAGE	41
4.4 Hasil Uji Hemaglutinasi (HA) <i>Crude Peridinin N. oculata</i> dan VNN terhadap Ikan Kerapu Tikus (<i>C. altivelis</i>)	57
4.5 Data Kualitas Air	60

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan	68
5.2 Saran	68

DAFTAR PUSTAKA	69
-----------------------------	-----------

LAMPIRAN	77
DAFTAR SINGKATAN	84
DAFTAR ISTILAH	86

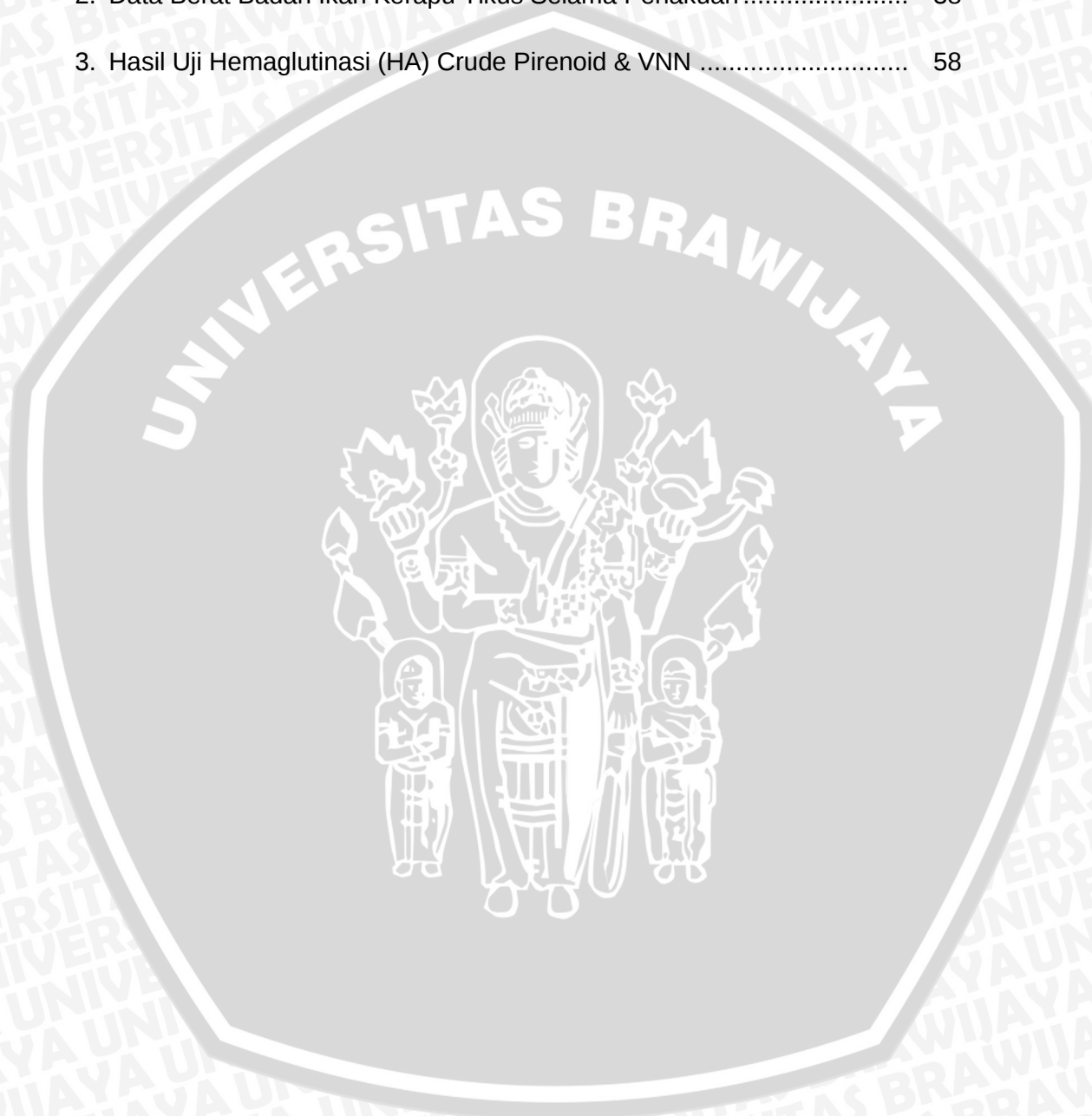


DAFTAR GAMBAR

No.	Halaman
1. Daerah Penyebaran VNN (<i>Viral Nervous Necrosis</i>) (Chi, 2006)	11
2. TEM (Transmission Electron Micrograph) VNN (Hegde <i>et al</i> , 2002)	12
3. Jaringan Mata Ikan Kerapu yang Terinfeksi VNN (Chi dan Shieh, 2005)	13
4. Ikan Kerapu yang Terinfeksi VNN (Seafdec, 2013)	13
5. Anatomi Jaringan Otak Ikan Kerapu yang Terinfeksi VNN (Moody <i>et al</i> , 2006)	14
6. Gambaran Umum Sistem Imun Vertebrata (Baratawijaya dan Rengganis, 2009)	15
7. Makrofag yang Memfagositosis Bakteri yang Kemudian Antigen dari Bakteri akan Dipresentasikan (Freeman, 2007)	17
8. Profil Beberapa Sel imun yang Mensekresikan TNF- α (Hindawi, 2010) ...	17
9. Morfologi dari mikroalga laut <i>Nanochloropsis oculata</i> (Sciencedirect, 2013)...	23
10. Struktur Ultra Alga Hijau Menggunakan TEM (He <i>et al</i> , 2003)	25
11. Profil Pita Protein Organ Mata Ikan Kerapu Tikus & Ekspresi Molekul TNF- α Menggunakan Metode SDS-PAGE.....	42
12. Profil Pita Protein Organ Otak Ikan Kerapu Tikus & Ekspresi Molekul TNF- α Menggunakan Metode SDS-PAGE.....	43
13. Proses Virus Masuk ke dalam Tubuh.....	45
14. Serangan Virus yang Memicu Sekresi IFN α/β	49
15. Proses Signaling Seluler dalam Reseptor dengan Aktivitas Kinase	53
16. Skema Komunikasi Antar Sel (Invitrogen, 2012)	55
17. Profil Reaksi Kerja Senyawa Antivirus terhadap Virus RNA.....	56

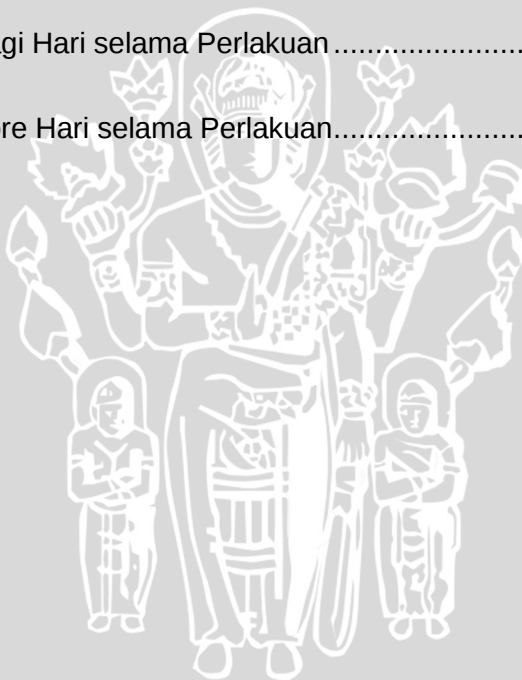
DAFTAR TABEL

No.	Halaman
1. Profil Sitokin pada Respon Imun Non Spesifik dan Spesifik	18
2. Data Berat Badan Ikan Kerapu Tikus Selama Perlakuan	38
3. Hasil Uji Hemaglutinasi (HA) Crude Pirenoid & VNN	58



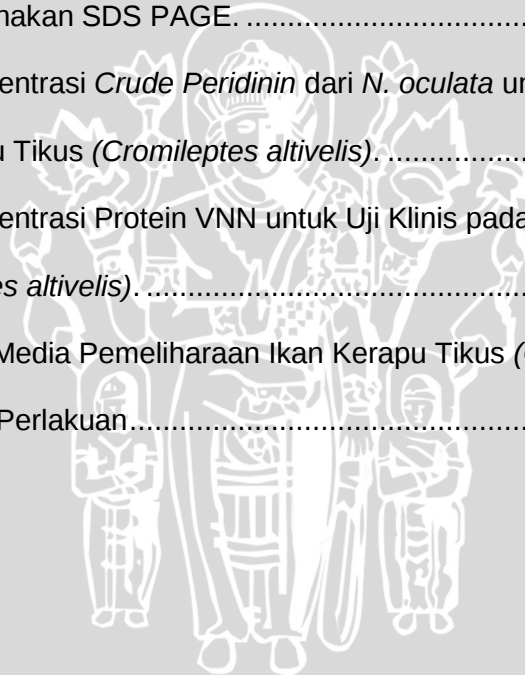
DAFTAR GRAFIK

Grafik.	Halaman
1. Data Suhu pada Pagi Hari selama Perlakuan	61
2. Data Suhu pada Sore Hari selama Perlakuan	61
3. Data Salinitas pada Pagi Hari selama Perlakuan	63
4. Data Salinitas pada Sore Hari selama Perlakuan.....	63
5. Data pH pada Pagi Hari selama Perlakuan.....	65
6. Data pH pada Sore Hari selama Perlakuan	65
7. Data DO pada Pagi Hari selama Perlakuan	66
8. Data DO pada Sore Hari selama Perlakuan.....	67



DAFTAR LAMPIRAN

No.	Halaman
1. Dokumentasi Kegiatan Isolasi <i>Crude Peridinin</i> Mikroalga Laut <i>Nanochloropsis oculata</i>	77
2. Dokumentasi Uji Klinis <i>Crude Peridinin</i> dari <i>N. oculata</i> terhadap Ikan Kerapu Tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>).....	78
3. Dokumentasi Isolasi Organ dan Pengambilan Serum Darah Ikan Kerapu Tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>).....	79
4. Dokumentasi Fraksinasi Protein Organ Ikan Kerapu Tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>) menggunakan SDS PAGE.....	80
5. Perhitungan Konsentrasi <i>Crude Peridinin</i> dari <i>N. oculata</i> untuk Uji Klinis pada Ikan Kerapu Tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>).....	81
6. Perhitungan Konsentrasi Protein VNN untuk Uji Klinis pada Ikan Kerapu Tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>).....	82
7. Data Kualitas Air Media Pemeliharaan Ikan Kerapu Tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>) Selama Perlakuan.....	83



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sebagai komoditas ekspor kedua setelah udang, ikan Kerapu Bebek atau Kerapu Tikus (*C. altivelis*) saat ini merupakan salah satu jenis ikan yang sangat diminati oleh petani ikan untuk dibudidayakan karena mempunyai nilai ekonomis tinggi, akan tetapi dalam perkembangan budidaya ikan kerapu ini masih dihadapkan pada beberapa masalah, diantaranya adalah penyakit yang disebabkan oleh mikroba yaitu VNN (Yanuhar, 2009).

Kemajuan teknologi molekuler dalam beberapa dekade ini terutama sejak ditemukannya sekuen genom lengkap dari mikroba-mikroba patogen, telah membuka jalan baru bagi dihasilkannya berbagai jenis protein rekombinan, baik vaksin, antibodi, maupun peptida sintetik yang memiliki manfaat tertentu. Pengetahuan tentang molekul-molekul sistem imun juga dapat digunakan untuk aplikasi selanjutnya yang lebih jauh dan lebih mendalam dalam budidaya perikanan antara lain untuk pengembangan 1) *Biomarker*, 2) Vaksin atau *Adjuvant*, 3). Ikan transgenik, misalnya penemuan promoter TNF yang dapat digunakan untuk mengekspresikan gen-gen asing pada Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) (Aoki *et al.*, 2008).

TNF- α adalah sitokin pleiotropik yang dapat menghambat infeksi virus (Granja *et al.*, 2008). Sitokin merupakan protein pembawa pesan kimiawi atau perantara dalam komunikasi antar sel yang sangat penting, aktif pada kadar rendah (10^{-10} - 10^{-15} mol/l dapat merangsang sel sasaran). Sitokin berperan dalam imunitas nonspesifik dan spesifik. TNF- α merupakan sitokin proinflamasi dan inflamasi spesifik. Sumber utama TNF (α dan β) adalah *fagosit mononuclear* dan sel T yang diaktifkan antigen, sel NK dan sel Mast. Banyak sitokin dilepas oleh

sistem imun spesifik seperti Interferon tipe I (IFN- γ) dan TNF- α yang memiliki efek antivirus (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009).

TNF- α disekresikan oleh banyak sel seperti makrofag dan limposit setelah serangan dari virus atau stimulasinya telah mengenai reseptor permukaan sel. TNF- α telah diidentifikasi berfungsi sebagai sitokin antiviral yang penting dan secara langsung bersifat sitotoksik terhadap sel yang terserang virus RNA maupun DNA dan telah berhasil diteliti bahwa TNF- α mampu menghambat proses replikasi dari *Herpes Virus Simplex (HSV)*, *Varicella-zoster Virus* dan *Cytomegaloviruses*. Pendukung gen TNF- α untuk diproduksi adalah adanya beberapa rangsangan dari antigen asing (*LPS*, asam nukleat dan kimia kompleks) (Granja *et al*, 2008).

Penelitian penanggulangan penyakit VNN masih terbatas pada pemakaian bahan-bahan kimia (Brown, 1998 dalam Suryati *et al*, 1998). Akan tetapi pada umumnya bahan-bahan tersebut tidak selektif sehingga dikhawatirkan akan menurunkan mutu lingkungan dan bersifat resisten pada patogen (Yanuhar, 2009). TNF- α disekresikan oleh banyak sel seperti makrofag dan limposit setelah serangan dari virus atau stimulasinya telah mengenai permukaan sel-sel reseptor, dan menyebabkan pembentukan sebuah serangan yang luas terhadap molekul yang menghubungkan antara respon inflamasi dan mengatur fungsi dari sel imun. Inflamasi merupakan respon fisiologis terhadap berbagai rangsangan seperti infeksi dan cedera jaringan (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009).

Perkembangan bioteknologi dibidang akuakultur telah banyak mendukung berbagai teknik untuk memanipulasi kondisi kesehatan ikan seperti memberikan jenis protein rekombinan tertentu untuk menstimulasi respon sistem imun ikan. Oleh karena itu pengembangan sistem ketahanan tubuh ikan perlu dilakukan dengan mengaplikasikan protein rekombinan yang ramah lingkungan. Secara

laboratoris dan aplikasi pada lapangan terbatas, imunostimulasi dapat meningkatkan daya tahan ikan budidaya (Alifuddin, 2002).

Ikan akan merespon adanya induksi protein tertentu dengan mensintesis antibodi yang dikenal sebagai imunoglobulin (Corbel, 1975). Maka dari itu, antibodi hanya akan bereaksi terhadap antigen penginduksinya dan berfungsi sebagai aglutinin, presipitin, opsonin dan antitoksin (Alifuddin, 2002). Menurut Sohne *et al* (2000), tujuan dari induksi protein antara lain : peningkatan daya tahan tubuh ikan, pencegahan efek samping kemoterapeutika, proteksi terhadap serangan penyakit, keamanan lingkungan budidaya dan keamanan konsumen dari residu antibiotik kimia.

Berbagai pendekatan terapi sudah diperoleh untuk mengurangi respon inflamasi serta mengurangi komplikasinya (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009). Mikroalga laut yang mengandung *peptida esensial* sebagai antibiotik/antimikroba adalah *Nanochloropsis oculata*. *N. oculata* mengandung vitamin C (*ascorbic acid*), *Peridinin Khlorofil Protein* (PCP), karbohidrat, lipid, EPA dan ARA. *N. oculata* juga meningkatkan aktivitas enzim inti sel sehingga membuat DNA dalam kondisi baik dan sehat. Pada kasus kanker, *N. oculata* berperan dalam mengontrol pH darah karena tingkat keasaman darah penderita kanker sangat rendah sekitar 5,7-6,3 sedangkan idealnya 7,3 (Trubus, 2006). Terutama senyawa *Peridinin Khlorofil Protein* (Peridinin), berpotensi sebagai bahan baku bio antibiotik (Putra, 2008). Di dalam kloroplas dari sebagian besar alga terdapat material berbentuk bulat, kaku dan bergerombol yang disebut *Peridinin* dengan rumus bangun kimia Ribulose-1, 5-diphosphate Carboxylase Oxygen (RUBISCO) (Holdsworth, 1971).

Peridinin merupakan golongan protein yang dapat larut oleh air dan juga pigmen penting dalam proses fotosintesis, berasosiasi di dalam *chloroplast*, mempunyai kemampuan sebagai antioksidan. Peridinin/PCP dibagi menjadi dua

bentuk, pertama sebagai *homodimer* (rantai pendek) dengan berat molekul 14-17 kDa dan yang kedua sebagai *monomer* (rantai panjang) dengan berat molekul 30-39 kDa (Weis *et al*, 2002). Menurut Hofmann *et al* (2004), hampir keseluruhan *chlorophyta* mempunyai *Peridinin* (PCP) dengan karotenoid sebagai pigmen utama, memungkinkan mereka menangkap energi matahari pada spektrum warna hijau-biru (470 – 550 nm).

Peridinin dalam penelitian ini berfungsi sebagai induser. Fungsi induser adalah untuk meregulatori ketahanan dan kelulus hidupan ikan Kerapu Tikus sehingga dapat meningkatkan sistem imun ikan tersebut sebagai salah satu komoditas unggulan sektor Perikanan dan Kelautan. Target penelitian adalah untuk mengeksplorasi secara *in vivo* crude *Peridinin N. oculata* pada ikan kerapu Tikus dan mengukur respon imun seluler ikan sebagai respon ketahanan tubuh dan antiviral terhadap infeksi virus melalui ekspresi molekul sel TNF- α dalam fungsinya sebagai inhibitor proliferasi virus RNA seperti VNN.

Berdasarkan keterangan di atas, maka perlu dilakukan studi secara mandiri mengenai protein *Peridinin (PCP) N. oculata* sebagai bahan protein rekombinan yang nantinya dipergunakan untuk uji molekuler imun yang diduga mampu menstimulasi munculnya sitokin anti virus yakni TNF- α yang merupakan *inhibitor* (penghambat) proliferasi virus VNN pada ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*).

1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian latar belakang di atas maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

Apakah *treatment crude Peridinin* dari mikroalga laut *N oculata* sebagai bahan induser berperan penting dalam ekspresi molekul sel imun proinflamasi TNF- α terkait upaya pencegahan terhadap infeksi *Viral Nervous Necrosis (VNN)* pada ikan Kerapu Tikus (*C altivelis*) ?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh *treatment crude Peridinin N oculata* yang mempunyai fungsi antiviral terhadap virus *Viral Nervous Necrosis* (VNN) pada ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*) dengan mengamati ekspresi molekul sel TNF- α yang merupakan sitokin pro inflamasi yang memiliki kemampuan sebagai inhibitor (penghambat) proliferasi sel virus VNN.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Praktis

Sebagai landasan penelitian lanjutan untuk mengeksplorasi potensi *Peridinin* dari mikroalga laut *N. oculata* sebagai bahan hayati yang berpotensi sebagai antiviral pada penyakit infeksi pada ikan melalui analisa proteomik maupun genomik.

1.4.2 Manfaat Teoritis

Sebagai langkah awal dalam menyusun suatu protein rekombinan berbasis biopeptida (bahan hayati) yakni *Crude Prenoid* dari *N. oculata* untuk selanjutnya bisa digunakan dalam upaya pencegahan (*Preventif*) terhadap penyakit infeksi virus VNN pada ikan Kerapu Tikus.

1.5 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Ilmu-ilmu Perairan dan Bioteknologi FPIK Universitas Brawijaya, Laboratorium Biologi Molekuler FMIPA Universitas Brawijaya, Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya, Laboratorium Biomedik dan Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Nutrisi dan Pakan Alami, Laboratorium Penyakit dan Parasit Ikan Balai Budidaya Air Payau (BBAP) Situbondo pada bulan November 2012 – Mei 2013 dengan pengamatan rutin setiap hari.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*)

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Weber dan Beofort (1940) dalam Ahmad (1991), klasifikasi ikan

Kerapu Tikus adalah sebagai berikut :

Phylum	: Chordata
Sub phylum	: Vertebrata
Class	: Osteichytes
Sub class	: Actinoptergi
Ordo	: Percomorphi
Sub ordo	: Percoidea
Family	: Serranidae
Genus	: <i>Cromileptes</i>
Species	: <i>C. altivelis</i>

Ikan kerapu Tikus mempunyai ciri-ciri morfologi sirip punggung dengan 10 duri keras dan 18 -19 duri lunak, sirip perut dengan 3 duri keras dan 10 duri lunak, sirip ekor dengan 1 duri keras dan 70 duri lunak. Panjang total 3,3 – 3,8 kali tingginya, panjang kepala seperempat panjang total, leher bagian atas cekung dan semakin tua semakin cekung, mata seperenam kepala, sirip punggung semakin ke belakang semakin melebar, warna putih kadang kecoklatan dengan totol hitam pada badan, kepala dan sirip (Weber dan Beoford, (1940) dalam Ahmad 1991).

Menurut Randall *et al.*, (1993) dalam Evalawati (2001), seluruh permukaan tubuh kerapu Tikus berwarna putih keabuan, berbintik bulat hitam dilengkapi sirip renang berbentuk melebar serta moncong kepala lancip menyerupai Bebek atau Tikus. Ikan kerapu Tikus mempunyai tubuh agak pipih

dengan warna dasar putih abu-abu berbintik-bintik hitam. Pada ikan muda, bintik-bintik hitam tersebut berukuran lebih besar dengan jumlah lebih sedikit

Ikan Kerapu Tikus mempunyai kepala yang datar mirip kepala bebek sehingga dikenal sebagai kerapu bebek. Adapun mulutnya atau moncongnya meruncing menyerupai moncong tikus sehingga juga disebut sebagai kerapu Tikus (Kordi, 2001)^b.

2.1.2 Habitat dan Penyebaran

Daerah penyebaran ikan kerapu Tikus (*C. altivelis*) dimulai dari Afrika Timur sampai Pasifik Barat Daya. Di Indonesia kerapu tikus banyak ditemukan di perairan Pulau Sumatra, Jawa, Sulawesi, Buru dan Maluku. Siklus hidup ikan kerapu Tikus muda hidup di perairan karang pantai dengan kedalaman 0,5-3 m. Kerapu Tikus muda dan larva banyak terdapat di perairan pantai dekat muara sungai dengan dasar perairan berupa pasir berkarang yang banyak ditumbuhi padang lamun. Pada kerapu dewasa bermigrasi ke perairan lebih dalam antara 7-40 m, biasanya perpindahan ini berlangsung pada siang dan sore hari. Telur dan larva bersifat pelagis, sedangkan kerapu muda hingga dewasa bersifat demersal. Ikan kerapu Tikus digolongkan sebagai ikan buas demersal atau ikan buas yang hidup di dasar laut. Dasar laut yang disukai adalah terdiri atas pasir karang yang terdapat di perairan dangkal dengan kedalaman berkisar antara 10-40 meter (Amiruddin *et al.*, 2010).

Menurut Yushimitsu dan Hiramatsu (1986) dalam Gunawan (2009), parameter ekologi yang cocok untuk pertumbuhan ikan kerapu yaitu pada temperatur air antara 24–31°C, salinitas antara 30–33 ppt, kandungan oksigen terlarut lebih dari 3,5 ppm dan pH antara 7,8 – 8.

2.1.3 Reproduksi

Kerapu Tikus bersifat *hermaprodit protogini*, yaitu pada perkembangan mencapai dewasa, matang gonad berjenis kelamin betina dan akan berubah menjadi jantan bila sudah tumbuh menjadi lebih besar atau umurnya bertambah tua. Berdasarkan pengamatan mikroskopis, telur kerapu Tikus berbentuk bulat tanpa kerutan, cenderung bergerombol pada kondisi tanpa aerasi, kuning telurnya tersebar merata, telur transparan dengan diameter sekitar 850 mikron dan tidak mempunyai rongga di dalam telur. Perkembangan embrional telur membutuhkan waktu setidaknya 19 jam sejak pembuahan hingga penetasan, sel pertama terjadi 40 menit setelah pembuahan, berikutnya setiap 15 - 30 menit sampai mencapai tahap multisel selama 2 jam 25 menit, tahap berikutnya adalah brastula, gastula, neurula dan embrio (Amiruddin *et al.*, 2010).

Aspek biologi reproduksi pada ikan kerapu tikus untuk induk betina mulai matang gonad pada ukuran panjang total 36 cm atau bobot 1,0 kg, sedangkan jantan mulai matang gonad ukuran panjang total 48 cm atau bobot 2,5 kg. Seekor induk betina berukuran 3 – 4 kg dapat menghasilkan 200 – 300 ribu butir telur/satu kali memijah. Telur yang dibuahi akan mengapung di permukaan air, sedangkan telur yang tidak dibuahi akan mengendap di dasar perairan, salinitas optimal untuk terjadinya pemijahan adalah antara 28 - 35 ppt (Cholik, 2005).

2.1.4 Kualitas Air Ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*)

a. Suhu

Suhu adalah besaran yang menyatakan derajat panas dingin suatu benda dan alat yang digunakan untuk mengukur suhu adalah thermometer (Alljabar, 2008). Parameter-parameter ekologis yang cocok untuk pertumbuhan ikan kerapu yaitu temperatur antara 24 – 31°C. Sedangkan menurut Amiruddin *et al.*, (2010), suhu air yang sangat cocok untuk pertumbuhan dan kelangsungan hidup

ikan kerapu Tikus adalah suhu 27 – 29°C (Amiruddin *et al.*, 2010).

Menurut Mahasri (1999) temperatur perairan akan berpengaruh pada metabolisme perairan, dimana semakin tinggi temperatur maka metabolisme organisme juga tinggi, sehingga konsumsi O₂ akan naik dan antara *demand suplay* tidak seimbang. Hal ini akan mengakibatkan ikan-ikan yang hidup di perairan itu menjadi stress. Apabila temperatur tinggi, maka kelarutan oksigen akan menurun (kecil) sehingga ikan akan menjadi stress, karena kekurangan oksigen.

Suhu tinggi tidak selalu berakibat mematikan tetapi dapat menyebabkan gangguan status kesehatan untuk jangka panjang, misalnya stres yang ditandai dengan tubuh lemah, kurus, dan tingkah laku abnormal. Pada suhu rendah, akibat yang ditimbulkan antara lain ikan menjadi lebih rentan terhadap infeksi fungi dan bakteri patogen akibat melemahnya sistem imun. Pada dasarnya suhu rendah memungkinkan air mengandung oksigen lebih tinggi, tetapi suhu rendah menyebabkan stres pernafasan pada ikan berupa menurunnya laju pernafasan dan denyut jantung sehingga dapat berlanjut dengan pingsannya ikan-ikan akibat kekurangan oksigen (Irianto, 2005).

b. Salinitas

Menurut Nybakken (1992) dalam Fuadi (2008), Salinitas adalah banyaknya zat terlarut. Zat padat terlarut meliputi garam-garam anorganik, senyawa-senyawa organik yang berasal dari organisme hidup, dan gas-gas terlarut. Menurut Nontji (1986) dalam Fuadi (2008), Ciri paling khas pada air laut yang diketahui oleh semua orang ialah rasanya yang asin. Ini disebabkan karena didalam air laut terlarut garam-garam yang paling utama adalah natrum klorida (NaCl) yang sering disebut garam dapur. Selain NaCl, di dalam air laut terdapat pula MgCl₂, kalium, kalsium dan sebagainya. Salinitas adalah jumlah berat

semua garam (dalam gram) yang terlarut dalam satu liter air, biasanya dinyatakan dengan satuan ‰ (permil, gram per liter). Menurut Tim Peneliti Udana (2009), Parameter-parameter ekologis yang cocok untuk pertumbuhan ikan kerapu yaitu salinitas antara 30 – 33 ppt.

c. pH

pH adalah merupakan istilah yang digunakan untuk menyatakan intensitas keadaan asam atau basa sesuatu larutan. pH merupakan salah satu cara untuk menyatakan konsentrasi H^+ . Yang sangat penting untuk diketahui yakni bahwa konsentrasi OH^- suatu larutan tak akan dapat diturunkan sampai nol, bagaimanapun asamnya larutan, dan bahwa konsentrasi H^+ tak akan dapat diturunkan sampai nol, bagaimanapun basanya larutan (Sutrisno dan Eny, 1991). Parameter-parameter ekologis yang cocok untuk pertumbuhan ikan kerapu yaitu pH antara 7,8 – 8.

2.2 Viral Nervous Necrosis (VNN)

Virus adalah organisme penyebab dan sumber penyakit yang sangat kecil, sehingga hanya dapat dilihat dengan menggunakan mikroskop elektron. Virus mempunyai struktur tubuh yang sederhana dan tidak mempunyai organ pencernaan sendiri (Kordi, 2011)^a.

Menurut Chi *et al.*, (2001) VNN merupakan *genom* + SS RNA Virus yang diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom : Virus

Divisio : RNA Virus

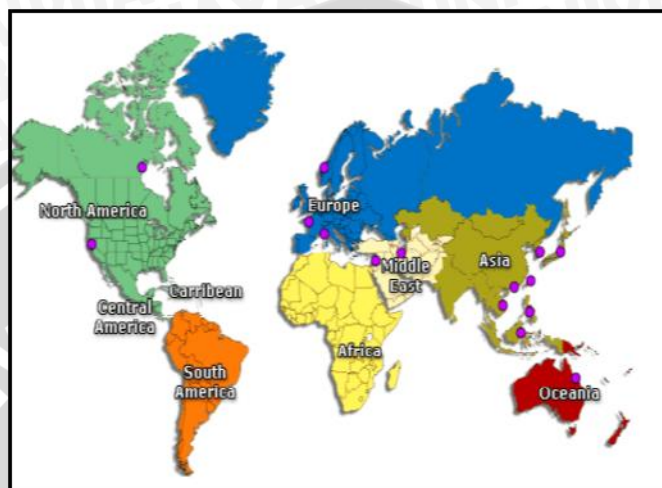
Class : *Single stranded* (+) RNA Virus

Family : Nodaviridae

Genus : Betanodavirus

Spesies : *Virus Nervous Necrosis*

VNN pertama kali ditemukan di Indonesia pada tahun 2000 oleh Yuasa dan kawan-kawan pada ikan kakap putih dengan metode deteksi PCR (Yuasa *et al.*, 2000). Lokasi daerah penyebaran VNN di dunia dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Daerah penyebaran VNN (*Viral Nervous Necrosis*) di dunia (Chi, 2006).

Keterangan : Lingkaran kecil warna pink adalah daerah penyebaran VNN (*Viral Nervous Necrosis*) (Jepang, Korea, Cina, Asia Tenggara, Australia Utara, Iran, Israel, Yunani, Perancis, Norwegia, Canada dan Amerika).

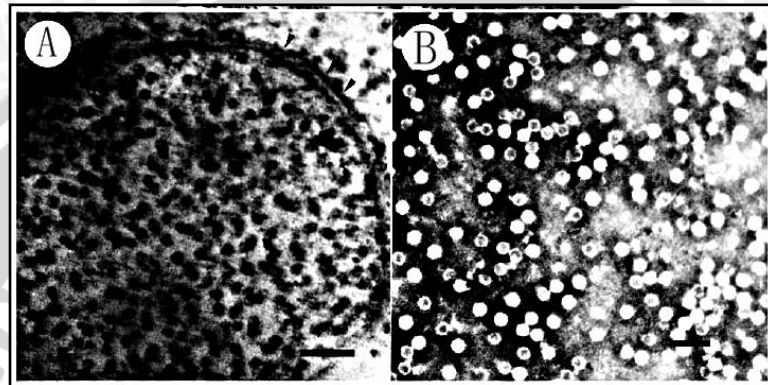
2.2.1 Morfologi dan Karakter VNN

VNN termasuk genus betanodavirus, yang merupakan golongan virus yang tidak memiliki *envelop*, berukuran kecil (25-35 nm), *spherical*, dengan sebuah *genom* yang terdiri dari dua untai tunggal molekul RNA positif-sense. Segmen *genom* yang lebih besar (RNA1) berukuran 3,1 kb, berperan dalam mengkode *polimerase* RNA (*RNA-dependent* dan *RNA polymerase*). Sedangkan segmen *genom* yang lebih kecil (RNA2) berukuran 1,4 kb, bertugas dalam mengkode *protein selubung* (*coat protein*) (Nishizawa *et al.*, 1995).

Virus single stranded (+)ss-RNA memiliki suatu enzim transkriptase reversal yang mentranskripsi (+)ss-RNA pertama menjadi ss-DNA, yang kemudian akan menjadi ds-DNA dan terintegrasi dalam kromosom dimana

mRNA diproduksi (Kordi, 2011)^b

Piscine nodaviruses (betanodaviruses) menginfeksi lebih dari 30 spesies ikan laut, khususnya pada *stadia larva* dan *juvenile*, dan infeksi biasanya menghasilkan *mortalitas* yang tinggi (Maeno *et al.*, 2007). Morfologi dari betanodavirus yang merupakan agen penyebab VNN dapat dilihat pada Gambar 2.

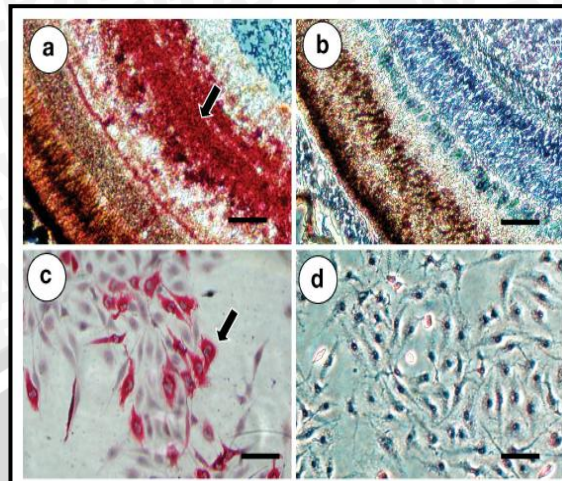


Gambar 2. TEM (*Transmission Electron Micrograph*) (A) Satu sel VNN dengan dua lapisan membran. (B) Partikel VNN, menunjukkan bentuk *icosahedral* dengan diameter 30 nm (Hegde *et al.*, 2002)

2.2.2 Infeksi VNN pada Ikan Kerapu Tikus

Nguyen *et al.*, (1996) melaporkan bahwa masuknya VNN ke tubuh inang (dalam hal ini larva *striped jack*) menyebabkan *vacuolasi*. Namun, secara alamiah hasil yang didapatkan dari pengamatan larva muda *striped jack* yang *terinfeksi* VNN menunjukkan bahwa pada tahap awal *infeksi* VNN, dapat dideteksi pada sel-sel *epitel* pada sisik dan sel-sel *epitel* pada usus bersamaan dengan sel-sel saraf pada CNS (*Central Nervous System*).

Partikel virus VNN yang menginfeksi mata ikan kerapu dapat dilihat pada Gambar 3. Gambar 4 memperlihatkan gejala *darkness* (warna kulit menjadi kehitaman atau gelap) larva *Baramundi* (*Lates calcarifer*) yang *terinfeksi* VNN.



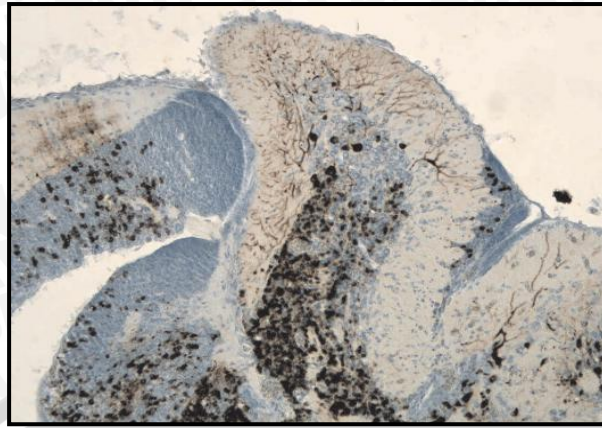
Gambar 3. Gambar jaringan mata ikan kerapu yang terinfeksi VNN yang mengalami *vacuolasi* dan partikel virus VNN yang menginfeksi sitoplasma sel mata ikan (Chi dan Shieh, 2005).

Keterangan : (a) Bipolar Selaput Ganglion (c) Sitoplasma pada retina ikan kerapu yang positif terinfeksi VNN dengan staining MAb spesifik VNN, tanda panah menunjukkan sel yang mengerut dan bundar sebagai akibat dari CPE (*cytophatic effect*) VNN. (b) dan (d) yang tidak menunjukkan hasil positif terinfeksi VNN. (a dan b skala 50 μm ; c dan d skala 100 μm)



Gambar 4. Ikan Kerapu yang terinfeksi VNN (*Viral Nervous Necrosis*) terlihat gejala warna menjadi kehitaman atau gelap (*darkness*) dan *whirling* (Seafdec, 2013).

Sel GF-1 yang ditunjukkan dengan gejala yang sama yaitu CPE (*cytophatic effect*) dengan ciri-ciri sel mengerut dan menjadi bundar dan pada hari kelima sel mengalami *lisis*.



Gambar 5. Anatomi jaringan otak ikan kerapu yang terinfeksi akut oleh virus VNN dengan IHC. Infeksi virus ditunjukkan oleh titik-titik hitam dan coklat gelap (Moody *et al.*, 2008).

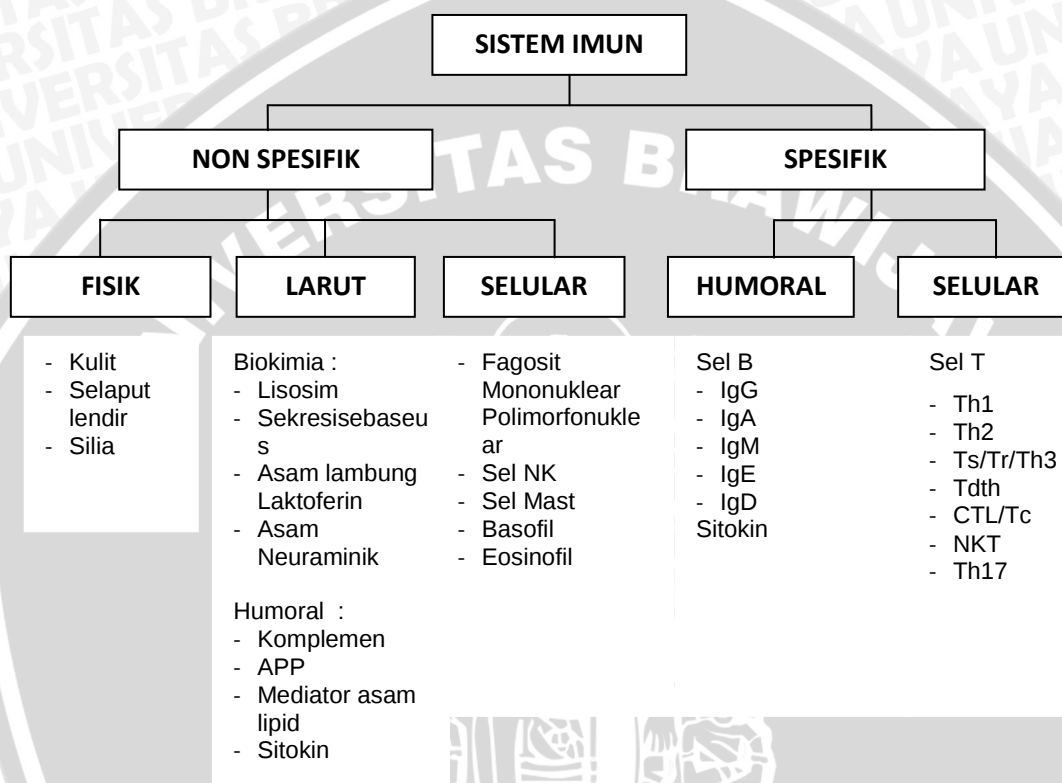
2.3 Sistem Pertahanan Tubuh Ikan

Sistem imun *innate* dan adaptif menggunakan 2 strategi fundamental yang berbeda untuk mengenali invasi mikroba khusus. Sistem imun *innate* mendeteksi infeksi menggunakan reseptor yang mengkode jumlah terbatas dari patogen, dan mengenali struktur unik molekul untuk menggolongkan mikroba penginfeksi. Sistem imun adaptif menggunakan reseptor secara acak, dan sangat spesifik dengan spesifikasi yang tampaknya tidak terbatas (Noah dan Ruslan, 2008).

Menurut Baratawidjaja dan Rengganis (2009), sistem imun nonspesifik mekanismenya tidak menunjukkan spesifisitas terhadap bahan asing dan mampu melindungi tubuh terhadap banyak patogen potensial. Sistem tersebut merupakan pertahanan terdepan dalam menghadapi serangan berbagai mikroba dan dapat memberikan respon langsung. Berbeda dengan sistem imun nonspesifik, sistem imun spesifik mempunyai kemampuan untuk mengenal benda yang dianggap asing bagi dirinya. Benda asing yang pertama kali menyerang tubuh segera dikenal oleh sistem imun spesifik. Serangan tersebut

menimbulkan sensitasi, sehingga antigen yang sama dan masuk tubuh untuk kedua kali akan dikenal lebih cepat dan kemudian dihancurkan.

Baratawidjaja dan Rengganis (2009), membagi secara garis besar sistem pertahanan tubuh (imun) ada 2 yaitu : sistem imun nonspesifik dan sistem imun spesifik, seperti yang digambarkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Gambaran umum sistem imun vertebrata (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009)

Faktor pertahanan humoral diantaranya adalah lysozyme, komplemen (substansi pelengkap), interferon, protein C-reaktif, transferrin dan lektin (*hemagglutinin*). Respon sistem imun spesifik pada pertahanan seluler merupakan antibodi yang *independent* yang dimasukkan secara bersama-sama dan dimediasi oleh sel pertahanan tubuh (*Cell Mediated Immunity*). Terminologi ini berasal dari kemampuan untuk mentransfer respon antigen spesifik dari satu individu ke individu lainnya dengan menggunakan sel hidup. Pada awal tahun 1950an hal ini telah dibuktikan bahwa sel yang bertanggung jawab untuk sel

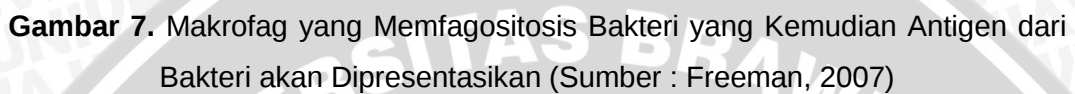
perantara pertahanan tubuh adalah lymphocytes, sekarang diidentifikasi sebagai T Cell (Iwama dan Nakanishi, 1996).

Pada prinsipnya ikan yang sehat dan berasal dari induk-induk yang sehat sulit diserang penyakit karena memiliki sistem pertahanan (imun) yang kuat. Sistem imun pada tubuh ikan dapat berubah-ubah bergantung pada aktivitas sel darah putih untuk memakan (fagositosis) mikroba patogen dan menurunnya produksi antibodi (Kordi, 2011).

2.3.1 Komponen dalam Sistem Pertahanan *Innate* (Non-Spesifik)

Kekebalan non spesifik bekerja tanpa membedakan antigen tertentu langsung memberikan respon ketika tubuh terpapar antigen. Kekebalan non spesifik disebut juga kekebalan bawaan atau alami, artinya kekebalan ini dimiliki seseorang sejak lahir dan sifatnya selalu bersiap menghadapi infeksi apapun yang masuk ke dalam tubuh. Jika tubuh terpapar oleh benda asing maka yang akan merespon pertama kali adalah kekebalan non-spesifik ini.

Kemudian Fujaya (2004), menjelaskan bahwa Leukosit pada ikan terdiri atas tujuh bentuk, yakni 3 tipe Eosinofil Granulosit dan masing-masing 1 tipe neutrofil granulosit, limposit, monosit dan trombosit. Eosinofil, neutrofil dan monosit merupakan leukosit fagosit. Fagositasi oleh neutrofil dilakukan dengan mendekati partikel yang akan difagositasi dengan cara mengeluarkan *pseudopodia* ke segala arah sekitar partikel, kemudian *pseudopodia* akan saling menyatu pada tempat yang berlawanan. Monosit atau makrofag lebih kuat dibandingkan neutrofil dalam memfagositasi partikel asing. Bahkan mampu memfagositasi partikel yang lebih besar. Bila partikel asing telah difagositasi, lisosom segera melekatkan diri pada vesikel fagositik sehingga kedua membran menyatu, kemudian lisosom melimpahkan enzim asam hidrolase ke dalam vesikel untuk menghancurkan partikel asing yang telah difagositasi.



Sitokin adalah polipeptida yang diproduksi sebagai respon terhadap rangsang mikroba dan antigen lainnya dan berperan sebagai mediator pada reaksi imun dan inflamasi. Sitokin merupakan protein pembawa pesan kimiawi atau perantara dalam komunikasi antarsel yang sangat penting, aktif pada kadar yang sangat rendah ($10^{-10} - 10^{-15}$ mol/l) dapat merangsang sel sasaran (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009).

Sitokin adalah protein mediator terlarut (kadang terikat dalam membran sel) yang mengikat reseptor pada sel target dan memicu, mengatur, atau

menghambat fungsi-fungsi seluler. Kebanyakan sitokin diproduksi dan berperan dalam sel-sel imun, tetapi ada juga sitokin yang diproduksi oleh sejumlah tipe sel dan berperan pada berbagai macam sel, sehingga sitokin menampakkan kisaran aktifitas yang sangat luas. Sitolin dikarakteristikan dengan sifat *redundancy* (memiliki peran yang sama antar satu jenis sitokin dengan jenis sitokin lainnya), memiliki aksi yang sinergis, dan memiliki sitem pengaturan yang berbalik (*regulatory loop*) (Cavaillon, 2007).

Sitolin berperan dalam imunitas nonspesifik dan spesifik, mengawali dan mempengaruhi peningkatan respon imun. Berikut sitokin-sitolin yang dihasilkan pada respon imun nonspesifik dan spesifik (lihat Tabel 1).

Tabel 1. Profil Sitolin pada respon imun Nonspesifik dan Spesifik

Sitolin pada Imunitas Nonspesifik		
Sitolin	Sumber Utama	Sasaran Utama dan Efek Biologis
IL-1	Makrofag, Endotel, beberapa sel epitel	Endotel : aktivasi (inflamasi,koagulasi) Hipotalamus : panas Hati : Sintesis APP
IL-6	Makrofag, sel endotel, sel T	Hati : Sintesis APP Sel B : Proliferasi sel plasma
IL-10	Makrofag, sek T terutama Th2	Makrofag, sel dendritik : mencegah produksi IL-21 dan ekspresi kostimulator dan MHC-II
IL-12	Makrofag, sel dendritik	Sel T : Diferensiasi Th1 Sel NK dan sel T : sintesis IFN- γ , meningkatkan aktivitas sitolitik
IL-15	Makrofag, sel lain	Sel NK : proliferasi Sel T : prooliferasi (sel memori CD 8 ⁺)
IL-18	Makrofag	Sel NK dan sel T : sintesis IFN- γ
IFN- α , IFN- β	IFN- α : makrofag IFN- β : fibroblast	Semua sel : antivirus, peningkatan ekspresi MHC-I Sel NK : aktivasi
IFN- γ	Th1	Aktivasi sel NK dan Makrofag, induksi MHC II
Kemokin	Makrofag, sel endotel, sel T, fibroblast, trombosit	Leukosit : kemotaksis, aktivasi, migrasi ke jaringan
TNF	Makrofag, Sel T	Sel endotel : aktivasi (inflamasi, koagulasi) Neutrofil : aktivasi Hipotalamus : panas Hati : sintesis APP Otot, Lemak : katabolisme (kaheksia) Banyak jenis sel : apoptosis
Sitolin pada Imunitas Spesifik		
IL-2	Sel T	Sel T : ploriferasi, peningkatan sintesis sitokin, menungkatkan apoptosis atas peran Fas. Sel NK : proliferasi, aktivasi Sel B : proliferasi, sintesis antibodi (<i>in vitro</i>)
IL-4	Th2, sel mast	Sel B : pengalihan ke isotope IgE

		Sel T : diferensiasi dan proliferasi Th2
IL-5	Th2	Eosinofil : aktivasi, peningkatan produksi Sel B : proliferasi, produksi IgA
IFN- γ	Th1, CD8 ⁺ , sel NK	Makrofag : aktivasi Sel B : pengalihan ke isotope IgG dalam meningkatkan opsonisasi dan ikatan komplemen Th1 : diferensiasi Berbagai sel : peningkatan ekspresi MHC-I dan MHC-II, peningkatan proses dan presentasi antigen ke sel T
TGF- β	Sel T, Makrofag, sel lain	Sel T : mencegah proliferasi dan fungsi efektor Sel B : mencegah proliferasi, produksi IgA Makrofag : pencegahan
Limfotoksin	Sel T	Pengerahan dan aktivasi neutrofil
IL-13	Sel Th2	Sel B : pengalihan ke isotope IgE Sel epitel : peningkatan produksi mucus Makrofag : pencegahan

2.3.2.1 Tumor **Necrosis Factor (TNF)**

Tumor Necrosis Factor adalah sitokin utama pada respon inflamasi akut terhadap infeksi bakteri patogen dan mikroba lainnya. Infeksi yang berat dapat memicu produksi TNF dalam jumlah besar yang menimbulkan reaksi sistemik. TNF disebut TNF- α atas dasar historis dan untuk membedakannya dari TNF- β atau limfotoksin. Sumber utama TNF adalah fagosit mononuclear dan sel T yang diaktifkan antigen, sel NK dan sel mas. LPS (*Lipopolisakarida*) merupakan rangsangan penting terhadap makrofag untuk mensekresi TNF. IFN- γ yang diproduksi sel T dan sel NK juga merangsang makrofag antara lain meningkatkan sintesis TNF.

Pada kadar rendah, TNF bekerja terhadap leukosit dan endotel, menginduksi inflamasi akut. Pada kadar sedang, TNF berperan dalam inflamasi sistemik. Pada kadar tinggi, TNF menimbulkan kelainan patologik syok septik (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009). Tumor Necrosis Faktor alpha (TNF- α) adalah sitokin pleiotropic yang dapat menghambat infeksi virus (Granja *et al.*, 2008). Sitokin merupakan protein pembawa pesan kimiawi atau perantara dalam komunikasi antar sel yang sangat penting, aktif pada kadar rendah (10^{-10} - 10^{-15}

mol/l dapat merangsang sel sasaran). Sitokin berperan dalam imunitas nonspesifik dan spesifik. TNF- α merupakan sitokin proinflamasi dan inflamasi spesifik. TNF- α adalah sitokin utama pada respon inflamasi akut terhadap mikroba patogen. Infeksi yang berat dapat memicu produksi TNF dalam jumlah besar yang menimbulkan reaksi sistemik. Banyak sitokin dilepas oleh sistem imun spesifik seperti interferon tipe I (IFN- γ) dan TNF- α yang memiliki efek antivirus (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009).

TNF- α disekresikan oleh banyak sel seperti makrofag dan limposit setelah serangan dari virus atau stimulasinya telah mengenai permukaan sel-sel reseptor, dan menyebabkan pembentukan sebuah serangan yang luas terhadap molekul yang menghubungkan antara respon inflamasi dan mengatur fungsi dari sel imun. Inflamasi merupakan respon fisiologis terhadap berbagai rangsangan seperti infeksi dan cedera jaringan. Infalamasi dapat terjadi pada local, sistemik, akut dan kronis yang menimbulkan kelainan patologis. Beberapa tanda inflamasi berupa kemerahan, bengkak, panas dan sakit serta dapat kehilangan fungsi jaringan yang terkena (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009). TNF- α telah dibuktikan untuk bekerja sebagai sitokin antiviral yang penting yang mana secara langsung bersifat sitotoksik terhadap sel yang terserang virus RNA maupun DNA dan telah dibuktikan bahwa TNF- α mampu menjadi penghambat proses replikasi dari *Herpes Virus Simplex (HSV)*, *Varicella-zoster Virus* dan *Cytomegaloviruses*. Pendukung terbentuknya rangkaian gen TNF- α adalah adanya beberapa rangsangan, diantaranya adalah adanya serangan virus, Forbol Ester, Calcium Ionophore atau LPS (*Lipopolisakarida*). Stimulus-stimulus inilah yang berperan penting dalam regulasi pembentukan TNF- α (Granja *et al.*, 2008).

Proses inflamasi akan berjalan sampai antigen dapat disingkirkan. Hal tersebut pada umumnya terjadi cepat berupa inflamasi akut yang berlangsung

beberapa jam sampai hari. Inflamasi akan pulih setelah mediator-mediator diinaktifkan. Bila penyebab inflamasi tidak dapat disingkirkan atau terjadi paparan berulang-ulang dengan antigen, akan terjadi inflamasi kronis yang dapat merusak jaringan dan kehilangan fungsi sama sekali.

Sitokin dalam pengobatan dapat diproduksi dalam jumlah besar. Sesuai dengan peranan biologisnya, maka sitokin dapat digunakan sebagai pengganti komponen sistem imun untuk mengarahkan sel-sel yang diperlukan dalam menanggulangi defisiensi imun primer atau sekunder seperti TNF- α yang telah digunakan dalam terapi anti viral. Berbagai pendekatan terapi sudah diperoleh untuk mengurangi respon inflamasi yang panjang serta mengurangi komplikasinya. Dewasa ini sudah dikembangkan Protein rekombinan untuk melindungi ikan terhadap penyakit infeksi bakteri dan virus yang terbuat dari bahan kimia (obat/kortokosteroid) maupun biologi (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009).

Zonneveld *et al.*, (1991), mengemukakan bahwa pencegahan penyakit infeksi dapat dilakukan dengan 4 cara, yaitu : (1) menghindari sentuhan antara biota kultur dengan patogen, (2) menurunkan tingkat infeksi dengan memperkecil jumlah patogen di dalam lingkungan, (3) mempertinggi daya tahan biota kultur dengan pemberian pakan optimum, dan (4) imunisasi. Cara keempat melalui imunisasi membuat biota kebal terhadap beberapa infeksi virus dan bakteri sudah berhasil. Penelitian penanggulangan penyakit *Viral Nervous Necrosis* (VNN) masih terbatas pada pemakaian bahan-bahan kimia seperti formalin, malachite green serta beberapa jenis antibiotik seperti chloramfenicol (Brown, 1998 dalam Suryati *et al.*, 1998). Penggunaan antibiotik itu belumlah diperoleh hasil yang memuaskan karena pada umumnya bahan-bahan tersebut tidak selektif sehingga dikhawatirkan akan menurunkan mutu lingkungan dan bersifat resisten (Yanuhar, 2009).

2.4 Mikroalga Laut *Nanochloropsis oculata*

Mikroalga merupakan tumbuhan air yang berukuran mikroskopik, memiliki berbagai potensi yang dapat dikembangkan sebagai sumber pakan, pangan, dan bahan kimia lainnya. Budidaya mikroalga sangat menarik karena tingkat pertumbuhannya yang tinggi, mampu menyesuaikan pada kondisi lingkungan yang bervariasi (Brown, 1997).

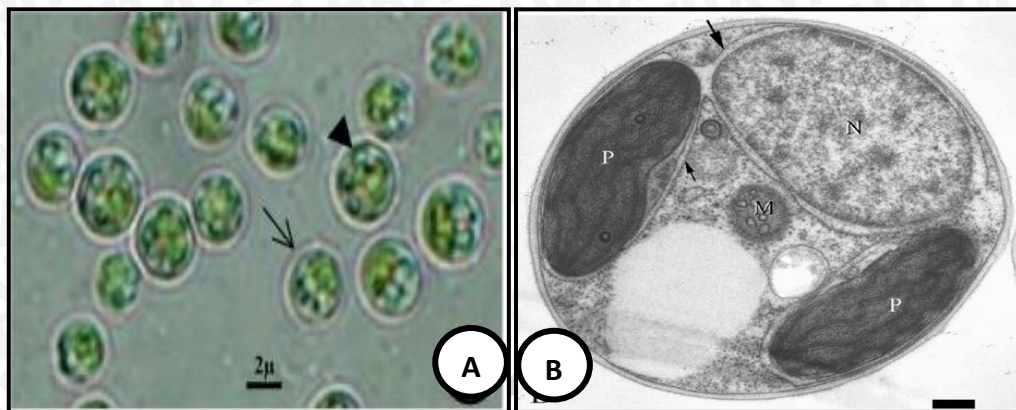
2.4.1 Klasifikasi dan Morfologi *N. oculata*

Menurut Hibberd (1981), klasifikasi *N. oculata* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Chromista
Divisi	: Ochrophyta
Class	: Eustigmaphyceae
Order	: Eustigmatales
Family	: Monodopsidaceae
Genus	: <i>Nanochloropsis</i>
Spesies	: <i>N. oculata</i>

N. oculata (eustigmatophyceae) yang lebih dikenal dengan nama *chlorella* Jepang, merupakan sel berwarna kehijauan, tidak motil, dan tidak berflagel. Selnya berbentuk bola berukuran sedang dengan diameter 2-4 μm , tergantung spesiesnya, dengan chloroplas berbentuk cangkir. Organisme ini merupakan divisi yang terpisah dari *Nannochloris* karena tidak adanya *chlorophyl b*. Selnya bereproduksi dengan membentuk dua sampai delapan sel anak didalam sel induk yang akan dilepaskan pada lingkungan.

N. oculata sebagai salah satu pakan alami yang banyak dimanfaatkan untuk pakan ikan dan juga digunakan sebagai pakan zooplankton. Morfologi *N. oculata* dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Morfologi dari mikroalga laut *N. oculata*. (A) menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 1000x (B) Ultrastruktur sel *N. oculata* (SciencDirect, 2013).

N. oculata merupakan sel yang mempunyai ciri-ciri berwarna kehijauan, tidak motil, dan tidak berflagel. Sel *N. oculata* berbentuk bola berukuran 4-6 μm . Spesies ini hidup di habitat air asin. Penggunaan mikroalga *N. oculata* secara komersial antara lain sebagai bahan makanan, energi biomass, pupuk pertanian, dan industri farmasi karena mikroalga ini mengandung protein, karbohidrat, lipid, dan berbagai macam mineral serta senyawa-senyawa potensial antibiotik (Sukenik *et al.*, 1989).

2.4.2 Sifat dan Ekologi

N. oculata bersifat kosmopolit yang dapat tumbuh dimana-mana, kecuali pada tempat yang sangat kritis bagi kehidupan. Algae ini tumbuh pada salinitas 0-35 ppt dengan suhu perairan berkisar 25-30 $^{\circ}\text{C}$ merupakan kisaran suhu yang optimal untuk pertumbuhan algae ini. *N. oculata* bereproduksi secara asexual dengan pembelahan sel, tetapi juga dapat dengan permisahan autospora dari sel induknya. Reproduksi sel ini diawali dengan pertumbuhan sel yang membesar, periode selanjutnya adalah terjadinya peningkatan aktifitas sintesa sebagai bagian dari persiapan pembentukan sel anak yang merupakan tingkat pemasakan awal. Tahap selanjutnya terbentuk sel induk muda yang merupakan tingkat pemasakan akhir, yang akan disusul dengan pelepasan sel anak

(Isnansetyo dan Kurniastuti, 1995). Menurut Yuli dan Kusriani (2005), reproduksi aseksual bisa juga terjadi karena terbentuknya *flagella zoospora*.

2.5 *Peridinin (Peridinin Chlorophyl Protein/PCP)*

Alga hijau seperti *Nanochloropsis oculata* mengandung satu atau lebih daerah khusus yang membedakan dengan lainnya disebut *Peridinin*. *Peridinin* merupakan golongan protein yang dapat larut oleh air dan juga pigmen penting dalam proses fotosintesis alga pada umumnya, berasosiasi di dalam *chloroplast*, mempunyai kemampuan sebagai antioksidan. *Peridinin* adalah organel, pusat fiksasi karbon dioksida dalam kloroplas ganggang. *Peridinin* tidak terikat oleh membran, akan tetapi *Peridinin* merupakan wilayah khusus di dalam plastida.

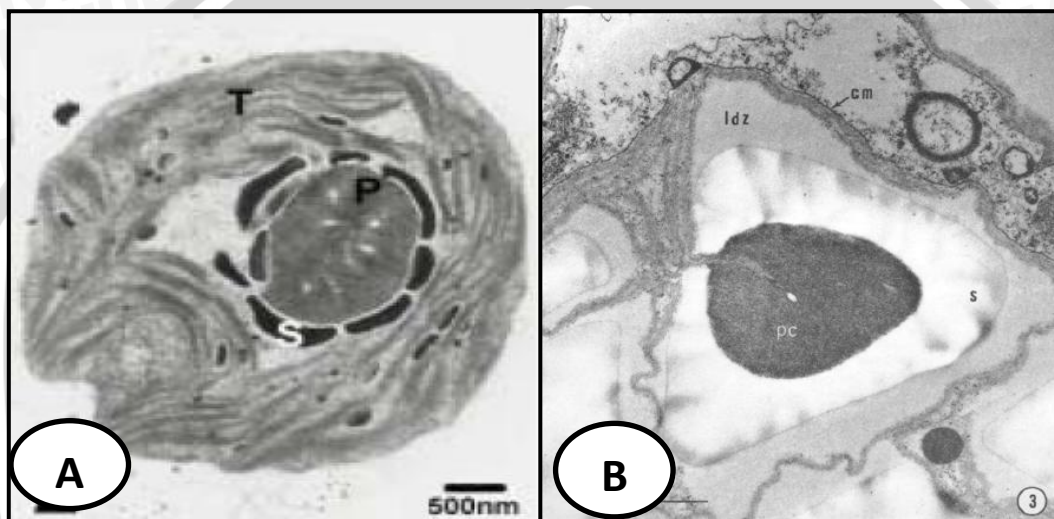
Peridinin/PCP dibagi menjadi dua bentuk, pertama sebagai *homodimer* (rantai pendek) dengan berat molekul 14-17 kDa dan yang kedua sebagai *monomer* (rantai panjang) dengan berat molekul 30-39 kDa (Weis *et al.*, 2002). Pada ganggang hijau *Peridinin* adalah salah satu tempat utama dalam proses pembentukan pati, tepung terbentuk dalam kloroplas dan melekat pada permukaan pyrenoid. Dan telah disebutkan bahwa *Peridinin* adalah wilayah penyimpanan sementara untuk produk awal dari proses fotosintesis, selanjutnya diubah menjadi pati ketika cadangan makanan berlebih.

Peridinin Khlorofil Protein (*Peridinin*), berpotensi sebagai bahan baku bio antibiotik (Putra, 2008). Di dalam kloroplas dari sebagian besar alga terdapat material berbentuk bulat, kaku dan bergerombol yang disebut *Peridinin* dengan rumus bangun kimia Ribulose-1, 5-diphosphate Carboxylase Oxygen (RUBISCO) (Holdsworth, 1971).

Beberapa jenis alga hanya mempunyai satu bentuk *Peridinin* saja, namun beberapa spesies memiliki bentuk *Peridinin* keduanya. Menurut Hofmann *et al.* (2004), hampir keseluruhan *chlorophyta* mempunyai *Peridinin* (PCP)

dengan karotenoid sebagai pigmen utama, memungkinkan mereka menangkap energi matahari pada spektrum warna hijau-biru (470 – 550 nm).

Peridinin telah ditemukan letaknya berada diantara *tilakoid* di tengah-tengah dari chloroplast di bagian dasar sel. Berbentuk bulat kaku berukuran 1.000 – 1.200 nm. Selaput yang menyelubungi *Peridinin* disebut dengan selaput kanji yang mana mempunyai kepadatan elektron yang tinggi (He *et al.*, 2003). Berikut ini adalah letak *Peridinin* dalam sel alga dapat dilihat pada Gambar 10.

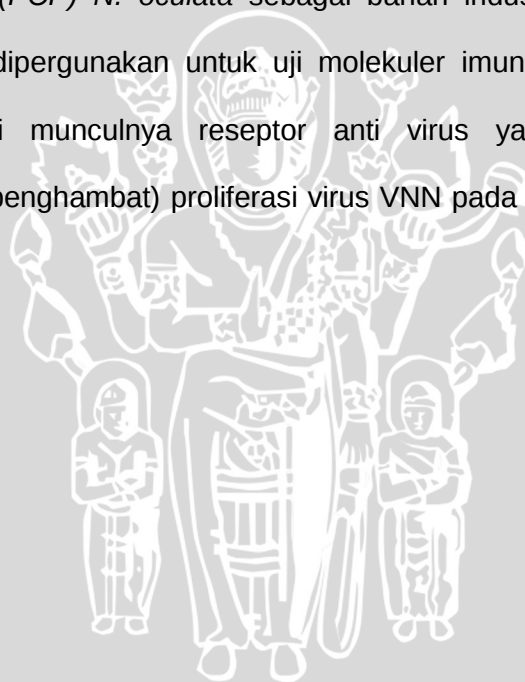


Gambar 10. Struktur Ultra Alga Hijau menggunakan Transmission Electron Micrograph (TEM) (A) Anatomi sel alga perbesaran 10.000x, (B) Anatomi pyrenoid sel alga perbesaran 30.000x (He *et al.*, 2003).
Keterangan : Pyrenoid (P) ; Strach (S); TylacoidsStroma (T) ; Pyrenoid Core (PC)

Peridinin adalah pigmen yang distribusinya cukup luas di alam terutama dimiliki oleh alga maupun tumbuhan tingkat tinggi. Berpengaruh penting dalam melindungi sel dan organisme. Aktivitas antioksidan adalah fungsi utama lainnya dari *Peridinin*. *Peridinin* merupakan karotenoid yang unik, membantu memaksimalkan penyerapan cahaya dalam proses fotosintesis. Ia berasosiasi dengan sebuah protein dan *Chlorophyl-a* menjadi protein kompleks yang disebut dengan *Peridinin Chlorophyl Protein* (PCP). Selanjutnya, *Peridinin* merupakan senyawa biologi penting yang dapat mempertahankan elektron bermanfaat saat proses fotosintesis berlangsung (Pinto *et al.*, 2000).

Peran terpenting *Peridinin* dalam proses fisiologis adalah sebagai zat antioksidan, yakni merupakan senyawa yang melindungi sel dari efek berbahaya radikal bebas. Dalam tumbuhan dan alga, *Peridinin* memegang peranan penting dipusat reaksi fotosintesis, dan juga terlibat dalam proses transfer energi. *Peridinin* efisien menangkal radikal bebas dan juga meningkatkan kekebalan tubuh vertebrata. Konsumsi komponen *Peridinin* yang sudah berasosiasi ke dalam bentuk karotenoid dalam jumlah tertentu secara signifikan mampu mengurangi resiko kanker (Hirschberg *et al.*, 1997).

Dalam penanggulangan penyakit, mencegah adalah lebih baik daripada mengobati. *Peridinin* (PCP) *N. oculata* sebagai bahan induser yang nantinya hasil dari isolasi ini dipergunakan untuk uji molekuler imun yang diharapkan mampu menstimulasi munculnya reseptor anti virus yakni TNF- α yang merupakan *inhibitor* (penghambat) proliferasi virus VNN pada ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*).



3. MATERI DAN METODE

3.1 Materi Penelitian

Materi dari penelitian ini adalah mengetahui efek antiviral dari *treatment Crude Peridinin* mikroalga laut *N. oculata* yang diujikan klinis pada ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*) kemudian diberi perlakuan induksi VNN dan selanjutnya melihat dan menganalisa ekspresi molekul TNF- α yang merupakan sitokin pro inflamasi yang mempunyai fungsi fisiologis sebagai antivirus pada respon imun non spesifik maupun spesifik. *Crude Protein Peridinin* didapatkan dari isolasi protein *Peridinin* mikroalga laut *N. oculata* menggunakan metode Dialisa dan Purifikasi dan dibuktikan dengan SDS-PAGE yang dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler FMIPA-UB dan Laboratorium Bioteknologi FPIK-UB. Ikan Kerapu Tikus yang digunakan sebagai hewan uji adalah berukuran ± 15 cm sebanyak 30 ekor yang berasal dari BBAP Situbondo, Jawa Timur. Waktu penelitian dilaksanakan mulai bulan November 2012 – Mei 2013.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi pH meter, refraktometer, termometer, DO meter, aquarium, pipet tetes, beaker glass, perangkat aerasi, erlenmeyer, mortar, autoclave, section set, *microplate*, spatula, *eppendorf* 1,5 ml, *falcon* 15 ml dan 50 ml, *mikropipet* 20 μ l, 200 μ l dan 1000 μ l, *blue tip*, *yellow tip*, deepfreezer -80 $^{\circ}$ C, freezer -20 $^{\circ}$ C *aluminium foil*, *sentriuge* 4 $^{\circ}$ C, *refrigerator* 4 $^{\circ}$ C, *sput* 1 cc 1/2"X26G, pipet pastur, timbangan analitik, tabung reaksi, nanodrop spektrofometer, *magnetik stirrer*, sendok erlenmeyer, membran celovan, tubing, petri disk, hotplate, obyek glass, cover glass, mikroskop, spatula, tabung nitrogen cair, chamber, water bath shaker, seperangkat alat *elektroforesis* (SDS-PAGE), baki/nampan, kotak penyimpan gel, kamera digital.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) normal, *Nanochloropsis oculata*, buffer ekstrak, PBS (*Phospat Buffer Saline*), masker, sarung tangan karet (gloves), *alkaline phospatase subtrat* (chromogen NBT) dan aquadest, *stacking gel* 5% yang meliputi : akrilamid 30%, Tris HCL 1.5 M pH 6.8, dH₂O, SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 10%, APS (*Ammonium Persulfat*) 10%, TEMED (*tetra ethylene diamine*); *separating gel* 12,5% dengan komposisi meliputi : akrilamid 30%, Tris HCL 1.5 M pH 8.8, dH₂O, SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 10%, APS (*Ammonium Persulfat*) 10%, TEMED (*tetra ethylene diamine*); RSB (*Reducing Sampel Buffer*) dengan perbandingan 1:1 (RSB : sampel); marker PRO-STAIN™; *staining solution* (commasie blue) dan *destaining solution* (metanol; asam asetat glasias; aquades), *running buffer*, es batu, es kering, *Xylen*, *Xylol*, SAS (*Sodium Amonium Sulphate*), Glicyn, Na-EDTA, EDTA, Air laut, nitrogen cair, kertas saring, chloroform, minyak cengkeh, alkohol 70%, aquades dan secondary antibody anti *TNF-α conjugate biotin*.

3.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode Eksperimen, dimana metode ini merupakan metode penelitian yang memungkinkan peneliti memanipulasi variabel dan meneliti akibatnya. Menurut Atmodjo (2011), penelitian eksperimen adalah suatu penelitian yang meneliti hubungan sebab akibat dengan memanipulasikan satu (lebih) variabel pada satu (lebih) kelompok eksperimen dan membandingkannya dengan kelompok lain yang tidak mengalami manipulasi.

Teknik pengambilan data dalam penelitian ini dilakukan dengan cara observasi langsung, yaitu menyelidik mengadakan pengamatan terhadap gejala-

gejala subyek yang diselidiki baik secara langsung dalam situasi yang sebenarnya maupun dalam situasi buatan atau dengan perantara sebuah alat, baik alat yang sudah ada maupun yang sengaja dibuat untuk keperluan khusus (Surachmad, 1998).

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Aklimatisasi Ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*)

Ikan uji yang digunakan yaitu ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*) yang didatangkan dari BBAP Situbondo berukuran antara 13-15 cm. Pakan diberikan setelah ikan terlihat normal dan agresif. Pakan yang diberikan berupa ikan kembung segar yang di cincang kecil-kecil dan pemberian makannya secara *adlibitum* (sampai kenyang) dilakukan 2-3 hari setelah ikan pertama kali di masukkan di akuarium. Pemberian pakan dilakukan sebanyak dua kali per hari. Selain itu setiap harinya dilakukan pengukuran parameter kualitas air seperti suhu, salinitas, DO dan pH untuk menjaga agar kondisi lingkungan Ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*) tetap normal.

3.4.2 Uji Klinis *Crude Peridinin* Mikroalga Laut *N. oculata* pada Ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*)

Sebagai suatu upaya pencegahan penyakit, pemberian protein rekombinan yang mempunyai efek antimikroba pada biota budidaya harus dilakukan dan merupakan tahap dalam proses produksi. (Alifuddin, 2001), Dalam penelitian ini dilakukan uji *in vivo crude protein Peridinin* dari mikroalga laut *N. oculata* pada ikan Kerapu Tikus. Proses pengujian dilakukan secara Entral (metode *Per-oral*) sebanyak 6 kali dengan ketetapan konsentrasi 33 µg/ml tiap 150 gram ikan dengan volume 0,1 ml/ikan (Yanuhar, 2012) yang berfungsi sebagai *inducer* pada sistem imun ikan. Penyondean menggunakan *Feeding Tube* dilakukan pada hari ke-0, ke-5, ke-9, ke-14, ke-19 dan hari ke-23. Dosis penyondean yang diberikan pertama pada hari ke-0 sebanyak 165 µl ; hari ke-5 =

179 µl ; hari ke-9 = 191 µl ; hari ke-14 = 205 µl ; hari ke-18 = 216 µl dan hari ke-22 dengan dosis 227 µl (Yanuhar, 2012-2013, *dalam* Laporan Penelitian Hibah Pascasarjana dan BOPTN, Penelitian *in process*).

Protein rekombinan berupa *Crude Peridinin* dari *N. oculata* merupakan *inducer* yang mampu meningkatkan mekanisme respon imunitas ikan baik non spesifik sampai pada spesifik. Mengingat keragaman patogen yang ada dalam media budidaya ikan seperti virus, bakteri, parasit maupun fungi, aplikasi protein rekombinan merupakan alternatif upaya pengendalian penyakit infeksi ikan. Pemanfaatannya dalam kegiatan budidaya dapat mengoptimalkan produksi budidaya melalui peningkatan ketahanan tubuh ikan terhadap penyakit infeksi (Anderson, 1992). Diamati setiap perubahan tingkah laku ikan tiap jam sampai terlihat gejala pengaruh klinis dari pemberian *Crude Peridinin* dari *N. oculata*. Semua ikan perlakuan dipelihara dan diamati dari hari ke-0 sampai hari ke-27 yang selanjutnya dilakukan proses pemanenan.

3.4.3 Pengukuran Konsentrasi Coat Protein VNN pada Ikan Kerapu Tikus yang Terinfeksi VNN

Coat protein dari virus VNN diisolasi dari organ ikan Kerapu Tikus yang positif terinfeksi VNN, meliputi otak, mata, daging dan ginjal. Metode isolasi *Coat protein* antara lain dengan melakukan penggerusan organ-organ tersebut dengan mortar kemudian ditambahkan larutan *buffer ekstrak* sebanyak 500 µl tiap 1 gram sampel. Homogenat kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 jam pada suhu 4°C dan dilanjutkan dengan 18.000 rpm selama 3 jam pada suhu 4 °C dengan menggunakan sentrifus Mikro 22R *Centrifuge* (Hettich-Zentrifugen). Langkah berikutnya adalah diambil supernatan yang merupakan *Coat protein* VNN yang selanjutnya dilakukan pengukuran

konsentrasi Coat protein VNN menggunakan Nanodrop–spectrophotometry UV-VIS dengan Absorbansi 1 pada 280 nm dan didapatkan hasil.

3.4.4 Uji Klinis Infeksi VNN pada Ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*)

Dalam penelitian ini dilakukan pengujian protein VNN dari ikan Kerapu Tikus yang sudah positif terinfeksi VNN sebelumnya pada ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*) normal. Metode infeksi melalui metode Entral (*Per-oral*), yakni berupa ikan rucah segar yang di dalamnya disisipkan daging ikan kerapu yang positif terinfeksi VNN sebanyak $\pm 1,0625$ gram (Yanuhar, 2012-2013 dalam Laporan Penelitian Hibah Pascasarjana, Penelitian *in process*).

Dosis pakan untuk sekali pemberian maksimal sebanyak $\pm 5\%$ dari berat ikan. Pemberian pakan infeksius setelah penyondean *crude Peridinin* hari ke-14 pada waktu sore hari. Dan selanjutnya pemberian pakan infeksius dilakukan secara berkala yakni 2 kali sehari dan waktu sore saja. Dilakukan hingga hari ke-23 perlakuan. Diamati setiap perubahan tingkah laku ikan tiap jam sampai terlihat gejala pengaruh klinis dari pemberian VNN. Semua ikan perlakuan dipelihara dan diamati dari hari ke-0 sampai hari ke-27 yang selanjutnya dilakukan proses pemanenan.

3.4.5 Identifikasi Berat Molekul Profil Protein Organ Target dan Analisa Ekspresi Molekul TNF- α menggunakan Metode SDS-PAGE

Hasil isolasi organ target ikan yaitu mata dan otak yang sudah diberi perlakuan pada penelitian ini selanjutnya diidentifikasi berat molekulnya untuk mengetahui profil proteinnya melalui metode SDS PAGE. Langkah-langkahnya adalah sebagai berikut : organ ikan hasil isolasi dikeluarkan dari *deep freezer* - 80°C kemudian diaklimatisasi dengan suhu ruang hingga suhu normal. Sampel dihomogenasi dengan cara digerus sampai halus dengan menggunakan mortar

steril yang sudah didinginkan di dalam *refrigator* dan kemudian ditambahkan dengan larutan *buffer ekstrak* $\pm 500 \mu\text{l}$ tiap 1 gram sampel lalu dilanjutkan penggerusan sampai homogen. Sampel hasil dari homogenisasi dimasukkan ke dalam *ependorf* steril dengan *micropipet*. Sampel tersebut di sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit menggunakan Sentrifuge Mikro 22R (*Hettich-Zentrifugen*). Supernatan diambil dengan *micropipet* dan dimasukkan ke dalam *ependorf* steril yang masing-masing sudah diberi label untuk membedakan antara masing-masing sampel dan kemudian supernatan tersebut disimpan pada suhu dingin. Supernatan sampel diambil sebanyak $\pm 50 \mu\text{l}$ dan ditambahkan dengan larutan RSB $5 \mu\text{l}$, dihomogenkan menggunakan ujung *yellow tip* dan dipanaskan selama 5 menit di dalam air pada suhu 100°C .

Preparasi Separating dan Stacking Gel, Plate pembentuk gel disusun. Separating gel 12,5 % dibuat dengan cara menyiapkan tabung polipropilen 50 ml dan diisi dengan *Acrylamide* 30 % sebanyak 2,063 ml (untuk 1 slab), Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 sebanyak 1,25 ml, *aquabidest* sebanyak 1,637 ml, SDS 10 % sebanyak $50 \mu\text{l}$, TEMED sebanyak $10 \mu\text{l}$ dan APS 10 % sebanyak $50 \mu\text{l}$. Bahan separating gel yang sudah siap dihomogenkan menggunakan ujung tip. Kemudian larutan dituang ke dalam plate pembentuk gel (dijaga jangan sampai ada gelembung udara) sampai batas yang terdapat pada plate. Pada bagian atas larutan gel dalam plate ditambahkan aquadest agar permukaan gel tidak bergelombang. Gel dibiarkan memadat selama kurang lebih 30 menit (ditandai dengan terbentuknya garis transparan diantara batas air dan gel yang terbentuk). Setelah itu, air yang menutup separating gel dibuang.

Stacking gel dibuat dengan cara mencampurkan *acrylamide* 30% sebanyak 0,2575 ml (untuk 1 slab), Tris-HCl 1 M pH 6,8 sebanyak 0,3125 ml, *aquabidest* sebanyak 0,6625 ml, SDS 10 % sebanyak $12,5 \mu\text{l}$, TEMED sebanyak $2,5 \mu\text{l}$ dan APS 10% sebanyak $3,75 \mu\text{l}$. Bahan stacking gel yang sudah siap

dihomogenkan menggunakan ujung tip. Kemudian larutan dimasukkan ke dalam plate pembentuk gel sampai batas yang terdapat pada plate untuk bagian upper. Dipasang sisir di atasnya, untuk mengetahui apakah gel sudah terbentuk, dari sisa pembuatan gel yang ada di tabung *polipropilen*. Apabila gel sudah siap, maka sisir bisa diambil lagi.

Running Sampel SDS-PAGE, plate yang sudah berisi gel dimasukkan dalam *chamber* elektroforesis. *Running buffer* dituang sampai bagian atas dan bawah gel terendam. Bila terbentuk gelembung udara pada dasar gel sumur sampel, harus dihilangkan. Sampel sebanyak 5 μ l dimasukkan secara hati-hati ke dalam sumur gel. Untuk marker diambil sebanyak 4 μ l, kemudian langsung dimasukkan ke dalam sumur secara hati-hati. Untuk memulai running, perangkat elektroforesis dihubungkan dengan *power supply*. Running dilakukan pada voltage 120 V, kuat arus 400 mA (menyesuaikan) selama 90 menit atau sampai *tracking dye* mencapai jarak 0,5 cm dari dasar gel. Jika gel belum turun dan belum berwarna bening bisa ditambah lagi. Setelah selesai, running buffer dituang dan gel diambil dari plate.

Pewarnaan Gel, tahap ini diperlukan pewarna *Comassie Brilliant Blue*, larutan staining untuk mewarnai protein pada gel dan larutan destaining untuk menghilangkan warna pada gel dan memperjelas pita protein yang terbentuk. Gel direndam dalam staining solution dan digoyang selama kurang lebih 30 menit. Setelah itu gel direndam dalam destaining solution sambil digoyang selama kurang lebih 15 menit atau sampai pita protein terlihat jelas.

Pengukuran Berat Molekul Protein Sampel, setiap sampel protein, diamati terlebih dahulu beberapa jumlah pita protein yang nampak. Masing-masing pita protein dari setiap sampel ditentukan nilai R_f -nya (Retardation factor) dengan rumus :

$$R_f = \frac{\text{jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

Nilai R_f yang diperoleh dihitung berat molekulnya dengan bantuan persamaan garis linier dari kurva standar berat molekul kemudian dicatat hasil yang diperoleh dalam tabel.

Pembuatan Kurva Standar Berat Molekul, Berat molekul dari protein standar ditentukan dengan menghitung nilai R_f dari masing-masing pita. Jarak pergerakan masing-masing protein standar diukur dan catat nilai R_f nya, kemudian gambarkan kurva standar berat molekul pada sumbu Y dan dihitung persamaan garis liniernya.

3.4.6 Uji Hemaglutinasi (HA) Crude Peridinin *N. oculata* dan VNN terhadap Sel Darah Merah (RBC) Ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*)

Salah satu cara untuk mengukur tingkat kekebalan secara serologis dan evaluasi program aplikasi senyawa/obat pada organisme, maka dikerjakan secara *Hemaglutinasi Test* (HA) atau uji HA. Pada prinsipnya uji HA merupakan reaksi molekul adhesi di dalam sel darah merah yang mampu berikatan dengan *epitop/determinan* dari antigen.

Kusmaedi (2001), menyatakan untuk melakukan uji HA yang dilakukan adalah diisolasi darah dari hewan (ikan) kontrol menggunakan spuit yang sebelumnya sudah dibasahi dengan EDTA 10%. Sampel darah selanjutnya dicuci menggunakan PBS sebanyak 2 kali dan dihomogenkan, kemudian disentrifuse selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm dan suhu 4°C. Dibuang supernatan dan didapatkan pelet berupa endapan sel darah merah (RBC/erotsit). RBC diencerkan menggunakan PBS dengan perbandingan 1;200 (v/v) untuk digunakan dalam uji HA.

Uji HA dilakukan dengan cara mengisi larutan PBS sebanyak 50 µl pada mikropate V-bottom (96 well) dengan menggunakan mikropipet yang sudah dilabel untuk masing-masing well. Untuk well A1 – A12 merupakan Kontrol Positif

dan well H1 – H12 merupakan Kontrol Negatif. Sebanyak 50 µl masing-masing *crude protein* organ dari setiap perlakuan dimasukkan dalam sumuran dan dibuat pengenceran bertingkat menggunakan PBS hingga pengenceran 2^6 (1/64). Selanjutnya ditambahkan RBC yang sudah diencerkan dengan PBS pada semua well mikroplate dan dihomogenkan dengan cara digoyang-goyang. Reaksi *Hemaglutinasi* diamati minimal setelah 20 menit dihomogenkan. Reaksi positif ditunjukkan dengan tidak adanya endapan (dot) RBC pada dasar well mikroplate (Yanuhar, 2012-2013 dalam Laporan Penelitian Hibah Pascasarjana dan BOPTN, Penelitian *in process*) :

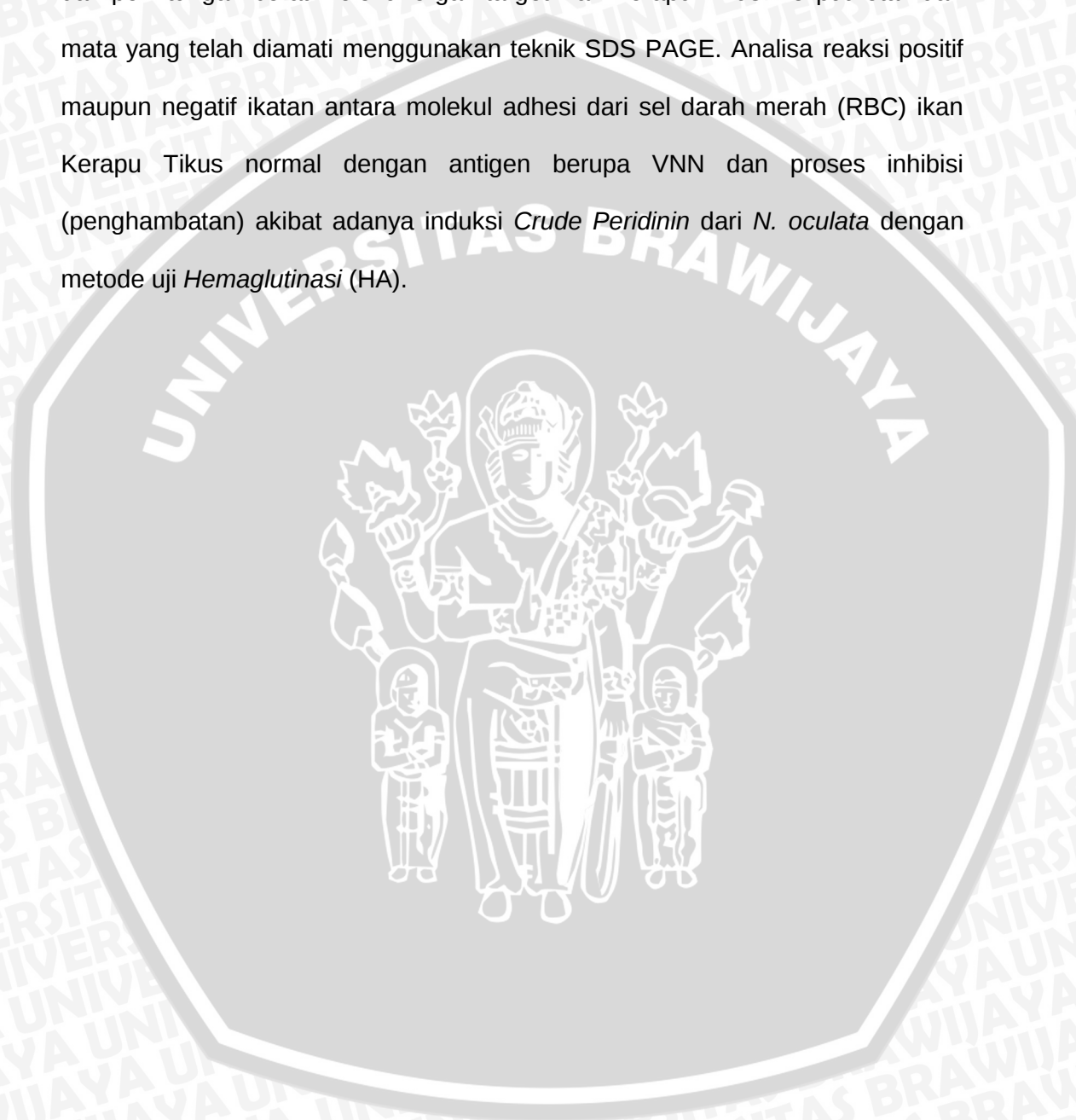
Interpretasi hasil kuat atau tidaknya reaksi positif maupun negatif dilakukan dengan cara menghitung lubang dimana terdapat reaksi positif atau negatif, dimulai dari pengenceran paling pekat (1/2). Apabila terjadi *aglutinasi* sampai pada lubang ke-6, maka titer reaksi tersebut dinyatakan dengan nilai 2^6 atau sama dengan 64 (Kurniadhi, 2002).

3.5 Parameter Penelitian

Parameter yang diamati dan dianalisa pada penelitian ini adalah terekspresinya molekul sel *Tumor Necrosis Factor – alpha* (TNF- α) yang mempunyai respon antiviral terhadap VNN pada sampel organ target yakni otak dan mata ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) yang telah diuji klinis dengan *crude protein Peridinin* mikroalga laut *Nanochloropsis oculata* dan paparan *Viral Nervous Necrosis* (VNN). Dan mengetahui reaksi ikatan antara molekul adhesi dari sel darah merah (RBC) ikan Kerapu Tikus normal dengan epitop antigen berupa VNN dan proses inhibisi (penghambatan) akibat adanya induksi *Crude Peridinin*.

3.6 Teknik Analisa Data

Analisa hasil ekspresi dari molekul sel TNF- α yang merupakan sitokin Proinflamasi antiviral dilakukan secara kualitatif berdasarkan profil pita protein dari perhitungan berat molekul organ target ikan Kerapu Tikus meliputi otak dan mata yang telah diamati menggunakan teknik SDS PAGE. Analisa reaksi positif maupun negatif ikatan antara molekul adhesi dari sel darah merah (RBC) ikan Kerapu Tikus normal dengan antigen berupa VNN dan proses inhibisi (penghambatan) akibat adanya induksi *Crude Peridinin* dari *N. oculata* dengan metode uji *Hemaglutinasi* (HA).



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Pengukuran Konsentrasi Protein VNN pada Ikan Kerapu Tikus yang Terinfeksi VNN

Hasil isolasi Coat protein VNN pada ikan yang positif terinfeksi VNN sebelumnya, diukur konsentrasi protein VNN menggunakan spektrofotometer UV-VIS. Hasil pembacaan spektrofotometer UV-VIS terhadap konsentrasi protein VNN dengan panjang gelombang 550 nm adalah 0,320 mg/ml atau 320 µg/ml. Pemberian dosis protein VNN untuk uji klinis pada ikan adalah sebanyak 0,51 mg/ml atau 510 µg/ml tiap 150 gram ikan (Yanuhar, 2013). Sehingga Dosis pakan yang diberikan untuk sekali uji adalah sebanyak 1,0625 gram (Yanuhar, 2012-2013, dalam Laporan Penelitian Hibah Pascasarjana dan BOPTN, *in process*).

4.2. Uji *in vivo* Crude Peridinin Mikroalga Laut *N. oculata* dan VNN pada Ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*)

Inducer dalam penelitian ini adalah protein rekombinan berupa *Crude Peridinin* yang merupakan zat atau obat yang dapat memulihkan ketidakseimbangan sistem kekebalan yang terganggu dengan cara merangsang dan memperbaiki fungsi sistem kekebalan. Larasati, (2013, *unpublished*) dalam Yanuhar, 2012-2013 dalam Laporan Penelitian Hibah Pascasarjana dan BOPTN, *in process*), menyatakan hasil analisa *Crude Peridinin* menggunakan SDS PAGE menunjukkan bahwa molekul *Peridinin* terekspresi dengan berat molekul (BM) 16 kDa (*homodimer*) dan 37 kDa (*monomer*). Weis *et al.*, (2002), menjelaskan *Peridinin/PCP* dibagi menjadi dua bentuk, pertama sebagai *homodimer* (rantai pendek) dengan BM 14-17 kDa dan yang kedua sebagai *monomer* (rantai panjang) dengan BM 30-39 kDa. Hasil pengukuran konsentrasi protein dari

Crude Peridinin menggunakan Spektrofotometer UV-VIS adalah sebesar 17 µg/ml.

Tabel 2. Data Berat Badan Ikan Kerapu Tikus Selama Perlakuan

Perlakuan	Berat Awal (gr)	Berat Akhir (gr)	Rata ² Penambahan per hari (gr)
Kontrol	49	77,08	1,04
Infeksi VNN	48	59,61	0,43
Induksi Peridinin	50	71,6	0,8
Induksi Peridinin & VNN	51	73,95	0,85

Sumber : Yanuhar, 2012-2013 *dalam* Laporan Penelitian Hibah Pascasarjana dan BOPTN, *in process*

Analisa hasil uji klinis pada penelitian ini dibagi dalam 4 perlakuan. Yang pertama adalah ikan Kontrol, yakni ikan Kerapu Tikus sehat atau normal tanpa adanya pengaruh perlakuan. Tingkah laku ikan kontrol selama pengamatan adalah berenang aktif ketika diberi pakan, merespon adanya interaksi dari peneliti, warna tubuh putih cerah dan kadang agak keabu-abuan, nafsu makan normal, tidak stres, berenang di semua bagian kolom air (sering bergerombol di dasar akuarium). Penambahan berat rata-rata ikan dari hari ke-0 (nol) sampai hari ke-27 adalah 1,04 gram perharinya. Penambahan berat sebanyak 28,09 gram dalam 27 hari pemeliharaan yakni mulai 49 gram menjadi 77,08 gram.

Perlakuan kedua, yaitu ikan Kerapu Tikus yang diinfeksi VNN. Uji klinis dilakukan secara per-oral yakni melalui pemberian pakan berupa daging ikan yang sudah positif terinfeksi VNN sebelumnya dengan tujuan untuk mengetahui respon ketahanan tubuh ikan terhadap adanya paparan suatu penyakit yakni virus VNN. Pengamatan tingkah laku yakni ikan berenang di dasar akuarium dan bergerombol disekitar aerasi. Ikan kurang agresif ketika interaksi dengan peneliti, nafsu makan menurun, warna kulit adalah cenderung gelap (coklat tua sampai

hitam) pada hari pertama perlakuan sampai masa panen, terjadi *whirling* sampai kematian ikan. Chi (2006), menyatakan bahwa perilaku ikan yang *terinfeksi* VNN menunjukkan gejala-gejala antara lain nafsu makan berkurang, gerakan lemah, berenang tidak normal (memutar-mutar), pembesaran gelembung renang pada beberapa spesies ikan, dan warna menjadi kehitaman. Penambahan berat rata-rata ikan dari hari ke-0 (nol) sampai hari ke-27 adalah 0,43 gram perharinya. Penambahan berat sebanyak 11,61 gram dalam 27 hari yakni berat awal 48 gram menjadi 59,61 gram. Penambahan berat tidak sebanyak ikan kontrol karena terjadi infeksi virus yang menyebabkan penurunan nafsu makan ikan. Ikan yang terinfeksi VNN, mengalami imunosupresi disebabkan karena sel imun digunakan secara terus-menerus untuk sistem perlindungan diri terhadap invasi/serangan virus.

Pengamatan selanjutnya adalah pada perlakuan ketiga, yakni ikan Kerapu Tikus yang diinduksi *crude* protein *Peridinin* dari salah satu spesies mikroalga laut, *N. oculata* yang berperan sebagai *inducer* pada sistem imun ikan. Protein rekombinan yang dapat diaplikasikan sebagai imunostimulan merupakan senyawa kimia, obat atau bahan lainnya yang mampu meningkatkan respon imunitas ikan (Alifuddin, 2002). Bentuk daripada *crude Peridinin* adalah berupa cairan yang mengandung senyawa bermanfaat. Cara penginduksian/pemberian *crude Peridinin* dilakukan secara Entral yakni pemberian senyawa/obat melalui saluran cerna atau dari rongga mulut sampai rektum. Dalam sistem pemberian secara Entral, dikenal istilah pemberian Oral (*Per-oral*), merupakan cara pemberian obat yang ditempatkan di mulut kemudian obat bergerak melalui saluran pencernaan. Proses absorpsi bisa terjadi di sepanjang saluran pencernaan terutama lambung dan usus halus. Pemberian obat dengan cara ini merupakan metoda Ekstravaskuler (diluar sirkulasi sitemik) (Nugroho, 2012). Keuntungan pemberian obat bentuk cair melalui metode per-oral menurut

Ritshchel dan Kearns (2004), adalah mudah diserap di dalam saluran pencernaan, mudah ditelan, kerja obat lebih cepat karena obat cepat diabsorpsi, tidak mengalami proses pemecahan terlebih dahulu, bioviabilitas tinggi, dan mudah bercampur dengan cairan biologis.

Analisis terhadap tingkah laku yakni ikan berenang aktif pada seluruh kolom akuarium, warna cenderung putih cerah hingga keabu-abuan, kadang bergerombol di sekitar aerasi, menunjukkan respon aktif ketika terjadi interaksi dengan peneliti. Namun setelah dilakukan proses penyondean, ikan menunjukkan respon stres, sehingga kurang agresif terhadap rangsangan (pakan). Beberapa jam setelah penyondean, perilaku ikan kembali normal, dan responsif ketika berinteraksi dengan peneliti. Penambahan berat rata-rata ikan dari hari ke-0 (nol) sampai hari ke-27 adalah 0,8 gram perharinya. Penambahan berat sebanyak 21,6 gram dalam 27 hari pemeliharaan yakni mulai dari 50 gram menjadi 71,6 gram. Penambahan berat ikan pada perlakuan ini tidak sebanyak pada ikan kontrol. Hal ini diduga karena adanya faktor stres ikan saat proses penyondean *crude Peridinin* sehingga mempengaruhi tingkah laku ikan dan nafsu makannya. Menurut Kordi (2011)^a, biota yang dibudidayakan atau dipelihara harus diperlakukan secara baik, penuh perhatian. Hindari biota dari perlakuan kasar yang dapat menyebabkan stres, memar, luka atau bahkan mati.

Induksi *crude Peridinin N. oculata* berpotensi sebagai bahan antiviral pada ikan, maka dilakukan pengamatan mengenai respon imun ikan pada perlakuan keempat, yaitu ikan Kerapu Tikus normal/sehat yang diinduksi dengan *Crude Peridinin N. oculata* dan dipapar VNN.

Analisis yang dilakukan terhadap tingkah laku pada perlakuan ini tidak terlalu berbeda dengan ikan yang mendapat perlakuan *treatment crude Peridinin N. oculata* saja, yakni ikan berenang aktif pada seluruh kolom akuarium, warna cenderung putih cerah hingga keabu-abuan, kadang bergerombol di sekitar

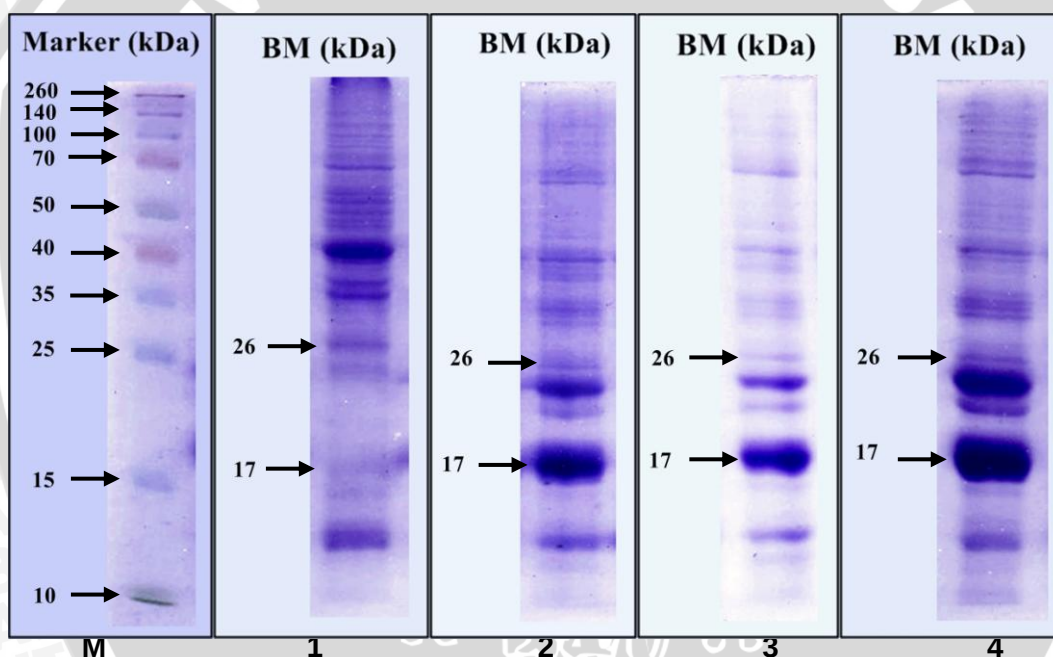
aerasi, menunjukkan respon aktif ketika terjadi interaksi dengan peneliti. Namun setelah dilakukan proses penyondean dan adanya induksi VNN, ikan menunjukkan respon stres, sehingga kurang agresif terhadap rangsangan (pakan), bahkan hilang nafsu makan. Tetapi beberapa jam setelah perlakuan, aktivitas ikan kembali normal, dan responsif ketika berinteraksi dengan peneliti. Penambahan berat rata-rata ikan dari hari ke-0 (nol) sampai hari ke-27 adalah 0,85 gram perharinya. Penambahan berat sebanyak 22,95 gram selama 27 hari pemeliharaan yakni mulai dari 51 gram menjadi 73,95 gram. Penambahan berat ikan pada perlakuan ini tidak sebanyak pada ikan kontrol namun lebih banyak dibandingkan pada perlakuan kedua dan ketiga. Hal ini diduga pengaruh pemberian *crude Peridinin* berhasil menginduksi munculnya respon imun sehingga kesehatan ikan lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan yang lain sehingga secara langsung juga mempengaruhi kualitas nafsu makan. *Peridinin* merupakan antigen permukaan yang dapat menginduksi kekebalan spesifik dan non-spesifik pada hewan. Tikus yang diberi crude protein alga terbukti meningkatkan fungsi makrofag, produksi antibodi dan sel T terhadap paparan infeksi (Boajiang, 1994).

4.3. Profil Protein Organ Ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*) dan Analisa Ekspresi Molekul TNF- α Menggunakan Metode SDS-PAGE

Organ dari ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*) yang sudah diberi perlakuan telah di isolasi. Selanjutnya dilakukan analisis gambaran protein pada masing-masing organ tersebut untuk mengetahui profil protein yang mana hasilnya akan dijadikan dasar untuk melakukan analisa ekspresi molekul TNF- α . Analisa profil protein pada organ ikan menggunakan metode SDS-PAGE dengan tegangan sebesar 120 V dan kuat arus sebesar 20 mAh selama 1,5 jam. SDS PAGE diartikan sebagai suatu metode untuk mendeteksi suatu molekul yang ada di jaringan yang dapat memberikan gambaran secara kualitatif yakni gambaran

berat molekul pita protein target dari molekul yang terekspresi pada gel elektroforesis.

Gel hasil running diberi pewarnaan (*Staining*) menggunakan larutan CBB (*Comassie Brilliant Blue*) yang berfungsi untuk memperjelas warna pita protein pada gel dan kemudian dilakukan proses *destaining*, yaitu untuk memudarkan warna gel. Hasil dari SDS-PAGE discan menggunakan mesin *scanner*. Perhitungan BM pita protein pada tiap sumuran menggunakan *software* komputer yakni **ArcSoft PhotoStudio** dan **Microsoft Excel**. Profil pita organ ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) dapat dilihat pada Gambar 11 dan 12.



Gambar 11. Profil Pita Protein Organ Mata Ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*) dan Ekspresi Molekul TNF- α dari Beberapa Perlakuan menggunakan SDS-PAGE

Keterangan :

M = Marker

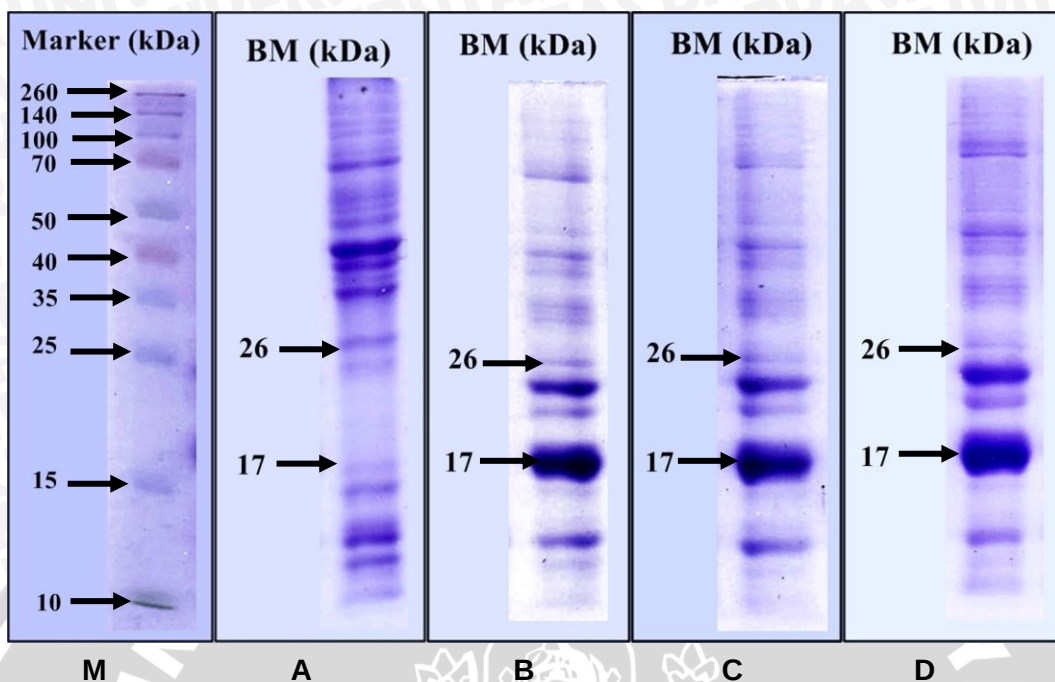
1 = Mata Ikan Kontrol

2 = Mata Ikan Perlakuan VNN

3 = Mata Ikan Perlakuan *Crude Peridinin*

4 = Mata Ikan Perlakuan *Crude Peridinin* & VNN

Sumber : Yanuhar, 2012-2013 dalam Laporan Penelitian Hibah Pascasarjana dan BOPTN, *in process*



Gambar 12. Profil Pita Protein Organ Otak Ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*) dan Ekspresi Molekul TNF- α dari Beberapa Perlakuan menggunakan SDS-PAGE

Keterangan :

M = Marker

A = Otak Ikan Kontrol

B = Otak Ikan Perlakuan VNN

C = Otak Ikan Perlakuan *Crude Peridinin*

D = Otak Ikan Perlakuan *Crude Peridinin* & VNN

Sumber : Yanuhar, 2012-2013 dalam Laporan Penelitian Hibah Pascasarjana dan BOPTN, Penelitian *in process*

Dalam sebagian besar penelitian aktivitas seluler mendeskripsikan bahwa TNF- α dikeluarkan dalam bentuk matang dan larut dalam air dengan berat molekul (BM) 17 kDa. Selama proses pembentukan, bentuk matang TNF- α 17 kDa dihasilkan dari pembelahan proteolitik oleh bagian ekstraseluler pro-TNF- α bentuk transmembran dengan berat molekul 26 kDa. Oleh karena itu TNF- α diekspresikan dalam bentuk yang berbeda yaitu bentuk matang yang dapat larut dengan BM 17 kDa dan bentuk transmembran dengan BM 26 kDa (Goetz *et al*, 2004). Yang pada akhirnya akan melakukan aktivitas biologi dalam formasi 52

kDa (homotrimer) (Shurety *et al*, 2001). Sekali dikeluarkan dari sel, TNF- α akan berinteraksi dengan salah satu dari dua reseptor yaitu *Tumor Factor Necrosis Receptore 1* (TNFR-1/p55) dengan BM 55 kDa, afinitas tinggi dan dapat larut, kemudian *Tumor Necrosis Factor Receptore 2* (TNFR-2/p75) dengan BM 75 kDa, afinitas rendah.

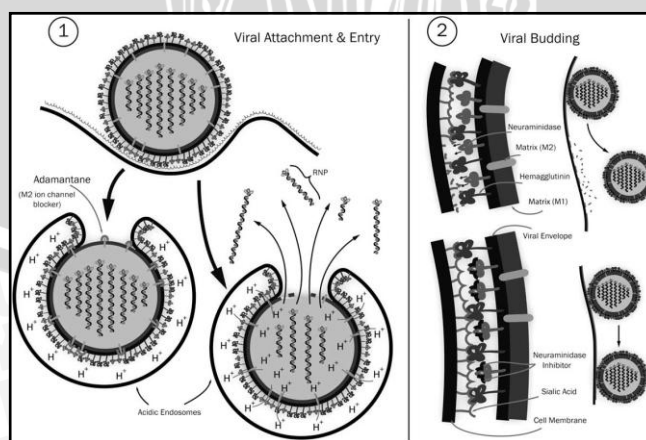
Proses perhitungan dan pengamatan pada Pita Protein organ target ikan Kerapu Tikus yang telah diberi perlakuan melalui metode SDS-PAGE, molekul TNF- α terekspresi pada semua perlakuan. Hal ini diketahui karena pada pita protein terekspresi molekul sel TNF- α dengan berat molekul 17 kDa (bentuk matang/mature) dan 26 kDa (bentuk transmembran).

Analisis ekspresi molekul sel TNF- α pada penelitian ini dibagi dalam 4 perlakuan. Yang pertama adalah ikan Kontrol, yakni ikan Kerapu Tikus sehat atau nomal tanpa adanya pengaruh perlakuan. Pengamatan secara SDS PAGE pada organ target ikan kontrol yakni mata dan otak menunjukkan bahwa jaringan tersebut mengekspresikan molekul TNF- α dengan berat molekul (BM) sebesar 26 kDa. Jumlah ekspresi sel imun adalah berbeda-beda, hal ini tergantung daripada sel target dari masing-masing organnya. Qin *et al* (2001), menjelaskan bahwa TNF- α memegang peranan penting dalam mekanisme imun dan respon inflamasi baik dalam kondisi sehat/normal maupun keadaan sakit (*Pathologys condition*). Feldman *et al* (2000), menyebutkan dalam kondisi normal atau sehat, TNF- α berfungsi dalam memodulasi proses regenerasi sel (*apoptosis* dan perancangan kembali), memodulasi pertumbuhan dan diferensiasi sel, ovulasi, reproduksi, menangkal radikal bebas, dan merancang gen sitotoksik sebagai pertahanan sel inang melalui inisiasi aktivitas antitumor terhadap serangan agen patogen.

Perlakuan kedua, yaitu ikan Kerapu Tikus yang diinfeksi VNN. Ikan yang terinfeksi VNN, mengalami *imunosupresi* disebabkan karena sel imun digunakan

secara terus-menerus dalam sistem perlindungan diri terhadap invasi/serangan virus. Pengamatan secara SDS PAGE pada organ target ikan yang diberi perlakuan infeksi VNN menunjukkan bahwa jaringan mata dan otak mengekspresikan molekul TNF- α dengan BM 26 kDa dengan profil pita lebih tebal dibandingkan dengan ikan kontrol. Ekspresi dari molekul TNF- α diduga lebih banyak dibandingkan dengan ikan kontrol. VNN berperan sebagai antigen asing yang menyebabkan reaksi infeksi sehingga akan memicu aktifnya sel dan diferensiasi sel imun.

Virus dapat masuk ke dalam tubuh melalui 2 cara, yaitu 1). Virus memasuki tubuh pada suatu tempat, kemudian ikut peredaran darah mencapai organ sasaran, dan 2.) Virus langsung mencapai organ sasaran, tidak melalui peredaran darah jadi tempat masuk virus merupakan organ sasaran. Proses infeksi virus selalu diawali dengan perlekatan antara *protein adhesin (ligand)* pada *patogen* dengan *reseptor* pada inang. Tidak semua organ atau jaringan pada inang merupakan tempat yang cocok untuk *patogen* tertentu. *Portal of entry* yaitu sel atau jaringan pada inang yang merupakan target khusus tempat masuknya *patogen* ke dalam tubuh inang (Madigan *et al*, 2003 dalam Yanuhar *et al*, 2012).



Gambar 13. Proses Virus masuk ke dalam tubuh. 1.) Pelekatan dan masuknya virus. 2.) Munculnya virus baru (Sumber : Burke dan Fish, 2009)

Goldsby *et al* (2000), menjelaskan bahwa saat terjadi inflamasi kronis didalam sel inang yang dipapar oleh bahan antigen akan menghasilkan sitokin. Sitokin adalah suatu glikoprotein yang berasal dari sel T helper, sel natural killer (NK) dan makrofag, yang berperan penting pada respon tubuh melawan infeksi patogen. Respon-respon terhadap sitokin diantaranya meningkatkan atau menurunkan ekspresi protein-protein membran (termasuk reseptor-reseptor sitokin), proliferasi, dan sekresi molekul-molekul efektor. Sitokin bisa beraksi pada sel-sel yang mensekresinya (aksi autokrin), pada sel-sel terdekat dari sitokin disekresi (aksi parakrin). Sitokin bisa juga beraksi secara sinergis (dua atau lebih sitokin beraksi secara bersama-sama) atau secara antagonis (sitokin menyebabkan aktivitas yang berlawanan).

Respon imun yang dibentuk oleh sel inang terhadap adanya infeksi virus dibagi menjadi dua macam. Yaitu pertahanan tubuh yang diperantarai *antibodi* (*antibody mediated immunity*, AMI) dan pertahanan tubuh yang diperantarai sel (*cellular mediated immunity*, CMI). Sistem AMI melibatkan antibodi yang disintesis oleh sel plasma yang merupakan turunan dari sel B. Untuk mengaktifkan sel B dalam mensintesis antibodi, antigen yang masuk ke dalam tubuh dipresentasikan oleh APC (*antigen presenting cell*) melalui molekul MHC I kepada sel T $CD4^+$ (*sel T helper*). Sel Th selanjutnya akan *mensekresi sitokin-sitokin* yang memberikan sinyal kepada sel B untuk mengadakan *proliferasi* dan *diferensiasi* menjadi *sel plasma* dan *sel B memori*. Sedangkan CMI ditujukan untuk *antigen-antigen* yang terdapat di dalam sel.

Antigen-antigen tersebut akan dipecah oleh *protease* menjadi molekul-molekul yang lebih kecil (*Antigen Fagmen*) yang selanjutnya diikat oleh molekul MHC I untuk dipresentasikan ke permukaan sel kepada sel T $CD8^+$ (*sel T cytotoxic*). Sel Tc yang teraktivasi akan mencari sel target yang ditandai dengan

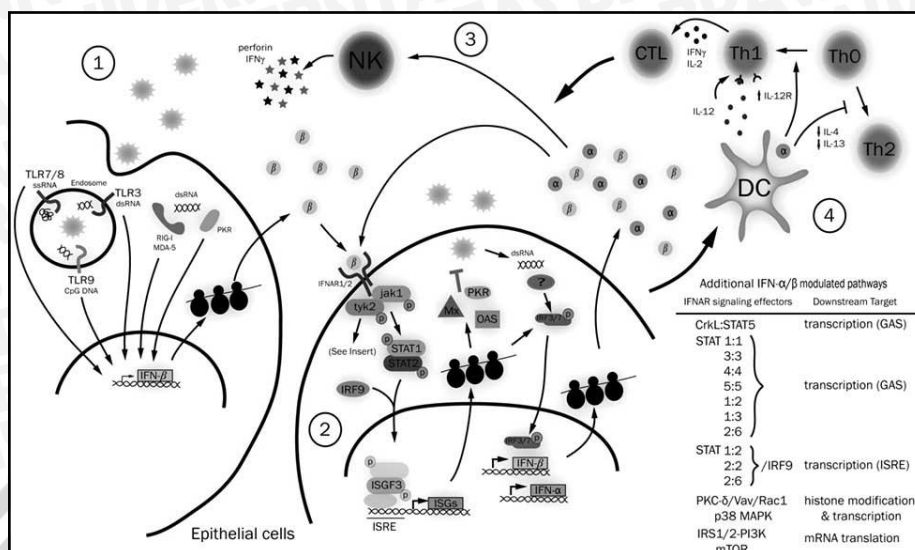
adanya *ekspresi* MHC I pada permukaan sel yang mempresentasikan *antigen* asing. Sel Tc akan berikatan dengan sel target melalui Fas dan Fas *ligand* kemudian mensekresi *perforin* dan *granzyme* yang menginduksi terjadinya *apoptosis* pada sel target (Szomolanyi-Tsuda *et al.*, 2002 dalam Yanuhar *et al.*, 2012).

Tahap awal dari infeksi virus, sitokin diproduksi ketika respon imun *non-spesifik/innate* diaktifkan. Pelepasan sitokin yang cepat pada area infeksi memulai respon radang/inflamasi. Peran dari respon inflamasi antara lain : 1.) Penambahan molekul dan sel efektor ke lokasi infeksi untuk meningkatkan kinerja makrofag, 2.) Mensintesis *inhibitor* untuk mencegah penyebaran infeksi, dan 3.) Melakukan proses perbaikan untuk jaringan yang rusak. Salah satu sitokin yang paling awal disekresikan adalah TNF- α , yang disintesis oleh monosit dan makrofag teraktivasi. Sitokin ini merubah kapiler didekatnya menjadi sempit sehingga sirkulasi sel darah putih dengan mudah dibawa menuju area infeksi. TNF- α juga dapat mengikat reseptor pada sel yang terinfeksi dan merangsang respon antivirus. Sehingga dalam hitungan detik, serangkaian sinyal yang ada menyebabkan kematian sel (*cell death*) yang merupakan usaha untuk mencegah penyebaran infeksi (Judarwanto, 2012). Bersama dengan sel yang terinfeksi, sel dendritik (DC) dan makrofag kemudian menghasilkan sitokin yang dapat berfungsi terhadap fase inflamasi kronis dan juga memodulasi respon imun *Spesifik/adaptif*.

Sel T helper tipe 1 (Th-1) menghasilkan IFN- γ (interferon gama), IL-2 (interleukin-2) dan TNF- α (tumor necrosis factor alfa). Sitokin ini mengaktifkan makrofag, untuk membentuk sitokin pro inflamasi seperti TNF- α , IL-1 dan IL-6 dan menginduksi mekanisme imun efektor sitotoksik dari makrofag. TNF- α merupakan sitokin yang bersifat sebagai pirogen (Pichyangkul *et al.*, 1994). Pada kadar rendah ia dapat menghambat pertumbuhan mikroba patogen dengan

mengaktifkan sistem imun seluler, dan juga dapat membunuh patogen tersebut secara langsung namun aktifitasnya lemah. Peran ganda dari sitokin terutama TNF- α yaitu pada kadar yang tepat akan memberi perlindungan dan penyembuhan. Akan tetapi kadar berlebihan yang mungkin merupakan tanggapan terhadap *hiperpatogenimia* dan pertumbuhan virus yang berlebihan akan menyebabkan kerusakan jaringan yang sangat berat dan fatal (Plebanski *et al*, 2002).

Irawati *et al* (2008), menjelaskan karakteristik pertama dari virus meningkatkan sitokin TNF- α adalah dari makrofag pada infeksi sel-sel tubuh oleh virus. TNF- α berperan dalam pengaturan makrofag memproduksi IL-12 dan menunjukkan TNF- α penting sebagai ko-faktor untuk IL-12 dalam meningkatkan produksi IFN- γ oleh sel NK. TNF- α ketika diekspresikan secara lokal oleh sel-sel imun, sitokin ini mempunyai efek terapeutik bermanfaat. TNF- α sendiri kini dikenal sebagai mediator utama inflamasi. TNF- α akan menginduksi mediator inflamasi lain dan protease yang merupakan pemain dalam respon inflamasi. TNF- α juga diproduksi oleh tumor dan dapat beraksi sebagai tumor promotor endogen. Peran TNF- α bahkan dikaitkan pada semua tahapan pada proses karsinogenesis, termasuk transformasi seluler, proliferasi, invasi, angiogenesis, dan metastasis. Untuk membatasi penyebaran virus dan mencegah reinfeksi, sistem imun harus mampu menghambat masuknya virion ke dalam sel dan memusnahkan sel yang terinfeksi. Sel T yang terstimulasi oleh antigen virus akan melepaskan sitokin seperti IFN- γ dan kemokin makrofag atau monosit. Sitokin ini akan menarik fagosit mononuklear dan teraktivasi untuk mengeluarkan TNF. Sitokin TNF bersama IFN- γ akan menyebabkan sel menjadi *non-permissive*, sehingga tidak terjadi replikasi virus yang masuk melalui transfer intraseluler.



Gambar 14. Serangan virus yang memicu sekresi IFN α/β (Sumber : Burke dan Fish, 2009)

Respon sistem imun akibat adanya serangan VNN yang menyebabkan terekspresinya molekul TNF- α pada organ mata dan otak ikan Kerapu Tikus. Ekspresi TNF- α dalam jumlah banyak diduga karena tingkat infeksius dari VNN yang tinggi dalam menyerang jaringan organ ikan, maka respon imun teraktivasi dan memberikan sinyal pada sel-sel imun untuk mensintesis mediator inflamatori untuk *menginhibitori* (menghambat) infeksi lanjut dan proliferasi VNN di dalam jaringan yang terinfeksi, menginduksi kematian sel (*cells death/apoptosis*) yang telah terinfeksi, memperbaiki jaringan yang rusak, dan melindungi sel-sel lain yang belum terinfeksi.

Pengamatan selanjutnya adalah pada perlakuan ketiga, yakni ikan Kerapu Tikus yang diinduksi *crude Peridinin* mikroalga laut, *N. oculata* yang berperan sebagai *inducer* pada sistem imun ikan. Aplikasi protein rekombinan dianggap sebagai senyawa yang dapat meningkatkan mekanisme pertahanan tubuh baik secara spesifik maupun non spesifik, dan terjadi induksi non spesifik baik mekanisme pertahanan seluler maupun humoral. Pertahanan non spesifik

terhadap antigen ini disebut *paramunitas*, dan zat berhubungan dengan penginduksi disebut *paraimunitas*. Induktor semacam ini biasanya tidak atau sedikit sekali kerja antigennya, akan tetapi sebagian besar bekerja sebagai *mitogen* yaitu meningkatkan proliferasi sel yang berperan pada imunitas. Sel tujuan adalah makrofag, granulosit, limfosit T dan B, karena induktor *paramunitas* ini bekerja menstimulasi mekanisme pertahanan seluler (Usman, 2010). Aktivitas suatu senyawa yang dapat merangsang sistem imun tidak tergantung pada ukuran molekul tertentu. Efek ini dapat diberikan baik oleh senyawa dengan berat molekul yang kecil maupun oleh senyawa polimer. Karena itu usaha untuk mencari senyawa semacam ini hanya dapat dilakukan dengan metode uji imunobiologi saja. Metode pengujian yang dapat dilakukan adalah metode *in vitro* dan *in vivo*, yang akan mengukur pengaruh senyawa kimia terhadap fungsi dan kemampuan sistem mononuklear, demikian pula kemampuan terstimulasi dari limfosit B dan T. Bahan *inducer* untuk sistem imun harus memenuhi syarat sebagai berikut :

1. Secara kimiawi murni atau dapat didefinisikan secara kimia,
2. Secara biologik dapat diuraikan dengan cepat,
3. Tidak bersifat karsinogenik atau ko-karsinogenik,
4. Baik secara akut maupun kronis tidak toksis dan tidak mempunyai efek samping farmakologik yang merugikan,
5. Tidak menyebabkan stimulasi yang terlalu kecil (tidak berefek) ataupun terlalu besar (*over dosis*).

Dasar fungsional *paramunitas* menurut (Mayr, 2007) adalah sebagai berikut : Terjadinya peningkatan kerja mikrofaag dan makrofaag serta pembebasan mediator ; menstimulasi limfosit terutama mempotensiasi proliferasi dan aktivitasnya ; mengaktifkan sitotoksitas spontan ; induksi pembentukan Interferon dan mengaktifkan faktor pertahanan humoral non spesifik

Penelitian ini mempelajari prinsip umum antara **Farmakokinetik** dan **Farmakodinamika**. Menurut Stringer (2001) dalam Nugroho (2012), secara ringkas, **Farmakodinamika** adalah pengaruh senyawa/obat terhadap organisme hidup. Sedangkan **Farmakokinetik** adalah pengaruh organisme hidup terhadap senyawa/obat (nasib obat dalam tubuh). Maksud daripada pemberian *crude Peridinin* pada ikan Kerapu Tikus adalah suatu upaya *Preventif*, yaitu merupakan suatu pengobatan guna mencegah timbulnya penyakit. Tujuan pengobatan ini adalah untuk menghindari terjangkitnya dan perkembangan suatu penyakit pada ikan yang sehat. Farmakodinamika, kerja dan efek merupakan bagian terpenting dan kompleks. Efek utama (*main effect*) suatu obat adalah efek yang diharapkan dalam penggunaannya.

Berkaitan dengan mekanisme kerja senyawa/obat di dalam tubuh, maka akan dibahas mengenai *Komunikasi Sel*. Semua sel terus-menerus menerima informasi dari lingkungan di sekelilingnya, dan sel-sel tersebut harus dapat merespon dengan tepat. Pertumbuhan, proliferasi, diferensiasi, pergerakan dan *apoptosis* semuanya bergantung pada sinyal-sinyal yang mengubah fisiologi suatu sel baik sementara maupun permanen. Tingkatan utama komunikasi pada sistem biologis dari sederhana menuju yang kompleks adalah : molekuler, sub seluler, sel, organ, jaringan, organisme, dan interaksi antar organisme. Dari tingkatan tersebut suatu senyawa atau obat berkerja dalam tubuh individu (Stanfield *et al*, 2000).

Prinsip dasar dari farmakologi salah satunya adalah molekul obat dapat mempengaruhi komponen organisme hidup sehingga dapat menghasilkan efek atau respon. Lebih lanjut Rang *et al* (1999), mengungkapkan beberapa senyawa/obat menghasilkan suatu efek setelah berikatan atau berinteraksi dengan komponen organisme yang spesifik. Komponen tersebut tersusun atas

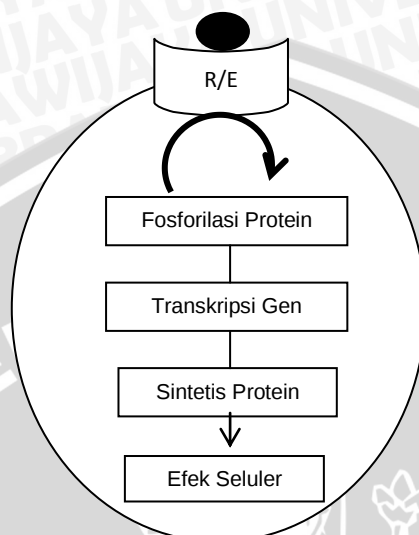
protein yang disebut dengan **Reseptor** yang secara normal merespon senyawa kimia endogen dalam tubuh dan mampu mengenali senyawa kimia dari luar tubuh (eksogen).

Senyawa atau obat yang mengaktifasi reseptor dan menghasilkan respon dinamakan **Agonis**. Secara definitif, Reseptor adalah suatu molekul target yang jelas dan spesifik dalam organisme, tempat molekul agonis berinteraksi membentuk suatu kompleks yang *reversible* sehingga pada akhirnya menimbulkan respon. Dalam penelitian ini, *agonis* diperankan oleh *crude Peridinin* dari *N. oculata* yang akan mengaktifasi reseptor sel dan menghasilkan suatu respon imun. Aktivasi reseptor oleh agonis (*Crude Peridinin*) disertai respon biokimia atau fisiologi oleh mekanisme transduksi yang melibatkan molekul-molekul yang dinamakan pembawa pesan kedua (**Second messenger**).

Molekul yang paling sesuai dengan reseptor dan mempunyai jumlah ikatan yang banyak (*non kovalen*) yang terkuat akan mengalahkan senyawa lain dalam berinteraksi dengan sisi aktif reseptornya. Oleh karena itu senyawa tersebut mempunyai afinitas terbesar terhadap reseptornya. Senyawa non kovalen di dalamnya termasuk Protein dan Asam Nukleat (Nugroho, 2012). *Crude Peridinin* merupakan protein makromolekul di dalam kloroplast mikrolaga yang mempunyai efek antioksidan dan tersusun dari ikatan non kovalen.

Crude Peridinin dari *N. oculata* bereaksi pada reseptor dengan aktivitas kinase (*Kinase-Linked Reseptors*) yang merupakan jalur komunikasi sel. Reseptor ini merupakan reseptor membran yang mempunyai daerah protein kinase intraselular (biasanya *tirosin kinase*) dalam struktur reseptor. Reseptor tipe ini setelah teraktivasi membangkitkan jalur kinase (*Kinase cascade*). Reseptor sitokin tidak mempunyai aktivitas kinase intrinsik, dan ketika teraktivasi oleh agonis (*Crude Peridinin*), berasosiasi dengan kinase yang dikenal dengan nama JAKS. Mekanisme transduksi sinyal kimia terutama yang tergolong ke

dalam kelompok berbasis protein dan peptida seperti sitokin dan faktor pertumbuhan diawali dengan perikatan antara molekul sinyal dengan reseptornya, yang akan mengaktifasi reseptor tersebut.



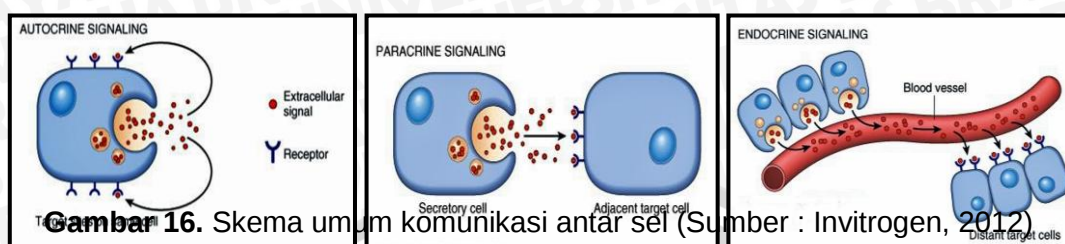
Gambar 15. Proses Signaling Seluler dalam Reseptor dengan Aktivitas Kinase dan Struktur Molekulnya (Sumber : Nugroho, 2012)

Proses biokimia dalam sel tersebut melalui jalur utama sebelum terbentuk respon fisiologis yaitu Jalur JAKs/STAT, dimana sebuah agonis (*Crude Peridinin*) melibatkan jalur ini, emigrasi ke inti sel untuk mengaktifasi ekspresi gen untuk melakukan fungsi fisiologis sel selanjutnya. Proses agonis oleh *Crude Peridinin* terdiri dari 2 tahap yaitu : 1.) Pemberian sinyal dari agonis kepada reseptor untuk mengaktifasinya, agonis berperan sebagai pembawa pesan pertama (*First messenger*), 2.) Penerusan sinyal oleh reseptor teraktivasi ke dalam komponen seluler untuk menginduksi respons seluler. Selanjutnya molekul transduktor membran yang telah teraktifasi akan menstimulasi aktifitas molekul transduktor di sitosol yang biasanya merupakan enzim protein kinase. Enzim protein kinase yang teraktifasi pada gilirannya akan mengaktifasi protein faktor transkripsi terkait. Adanya aktifasi protein faktor transkripsi akan mengakibatkan protein tersebut berikatan dengan segmen pemicu (*enhancer*) atau segmen promotor, yang akan memicu proses transkripsi gena struktural yang diharapkan.

Pengikatan *Crude Peridinin* pada reseptornya akan mengaktifkan suatu protein kinase yang dikenal sebagai Janus Kinase-2 (JAK-2). JAK-2 yang teraktifasi akan memfosforilasi dirinya dan juga reseptor yang dituju. JAK-2 yang telah terfosforilasi pada gilirannya akan mengaktifasi tiga protein yang tergolong dalam keluarga *Signal transducer and activation of transcription (STAT)*, masing-masing STAT-1, STAT-3, dan STAT-5. Protein STAT-1 dan STAT-3 akan berikatan dengan segmen pemicu (*enhancer*) pada struktur DNA yang secara spesifik akan memicu gen struktural penyandi protein faktor transkripsi fos. Sementara itu protein STAT-5 akan berikatan dengan segmen pemicu pada struktur DNA yang akan memicu proses transkripsi gen struktural bagi protein faktor transkripsi Spl21. Protein fos dan Spl21 akan memicu proses penyandian beberapa gen struktural yang akan menghasilkan beberapa sitokin proinflamasi, TNF- α . Molekul sel TNF- α yang disintesa kemudian akan menuju membran luar sel dan masih berikatan dengan reseptornya yang disebut dengan *Tumor Necrosis Factor Reseptor (TNFR)*. TNF- α yang terbentuk akibat induksi dari *Crude Peridinin* "release" dan melakukan fungsi fisiologisnya melalui mekanisme komunikasi antar sel yakni *Autocrine*, *Paracrine* maupun *Endocrine* untuk merangsang terbentuknya respon imun non spesifik (fagositosis oleh makrofag maupun sel dendritik/DC) dan apabila diperlukan maka akan berlanjut pada respon imun spesifik pada sistem imun ikan Kerapu Tikus melalui aktivasi Limfosit yang akan menghasilkan antibodi. Fujaya (2004), menyebutkan komunikasi antar sel biasanya melewati enam tahap, yaitu :1.) sintesis materi, 2.) pelepasan materi, 3.) transpor ke organ target, 4.) pengenalan petunjuk (sering oleh reseptor protein yang spesifik), 5.) penerjemahan, dan 6.) respon.

Terdapat tiga kelompok komunikasi ekstraseluler yang terjadi di dalam tubuh vertebrata, yaitu isyarat autocrine, isyarat paracrine dan isyarat endocrine

(Gambar 16) yang merupakan cara komunikasi yang juga dilakukan oleh TNF- α dalam melakukan fungsi fisiologisnya.

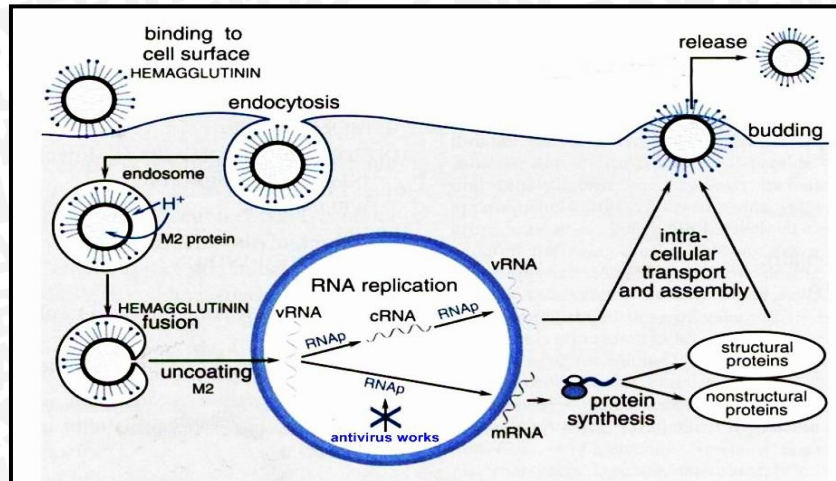


Gambar 16. Skema umum komunikasi antar sel (Sumber : Invitrogen, 2012)

Induksi *crude Peridinin N. oculata* berpotensi sebagai bahan antiviral pada ikan, maka dilakukan pengamatan mengenai respon imun ikan pada perlakuan keempat, yaitu ikan Kerapu Tikus normal/sehat yang diinduksi dengan *Crude Peridinin N. oculata* dan dipapar VNN.

Analisa pada perlakuan ketiga dan keempat, pemberian *treatment crude Peridinin* berperan sebagai agonis yang mengaktivasi reseptor sel dan kemudian memberikan sinyal transduksi biokimia intraseluler sehingga membentuk molekul protein target yakni TNF- α yang mempunyai fungsi fisiologis sebagai antivirus. Respon antiviral/antivirus adalah suatu proses melumpuhkan atau membunuh virus yang menyerang individu yang dilakukan oleh gen tertentu yang dihasilkan oleh sel hospes/inang (Shurety et al, 2001).

Induksi *Crude Peridinin* pada ikan Kerapu Tikus akan menciptakan respon imun non spesifik hingga spesifik. Secara molekuler telah dibuktikan bahwa molekul sel TNF- α terekspresi dengan pengamatan SDS PAGE pada jaringan mata dan otak ikan Kerapu Tikus dengan BM 17 kDa dan 26 kDa. Sistem kerja dari respon antiviral yang diperantarai TNF- α dapat dilihat Gambar 17 di bawah ini.



Gambar 17. Profil Reaksi Kerja Senyawa Antivirus terhadap Virus RNA

Proses replikasi virus RNA maupun DNA berlangsung di dalam sel hospes dan membutuhkan enzim serta bahan lain dari hospes. Senyawa yang menginduksi respon antiviral pada prinsipnya bekerja untuk menghambat secara spesifik salah satu proses replikasi virus seperti pelekatan, *uncoating* dan replikasi. Biermer *et al* (2003), menyebutkan bahwa sitokin TNF- α menunjukkan kemampuan menghambat replikasi virus dengan tidak membunuh sel inang tetapi dengan mengaktifkan sinyal jalur NF- κ B melalui proses biokimiawi sel, yang sebagian besar menghalangi pembentukan capsid baru oleh virus yang menyerang. Pertama, efek antiviral dari TNF- α terjadi pada konsentrasi sitokin yang tidak sampai menginduksi terjadinya *apoptosis*. Kedua, efek nonsitopatik antiviral dari TNF- α akan bekerjasama oleh teraktivasi NF- κ B. Ketiga, regulasi intraseluler yang kuat oleh NF- κ B pada akhirnya akan memodulasi produksi molekul sel imun untuk penghambat proses transkripsi yang dilakukan oleh virus sehingga siklus replikasi virus akan terhenti dan tidak akan muncul virion-virion baru (Gambar 17).

Molekul-molekul tersebut bekerja dalam menghambat aktifitas enzim *reverse transcription* (RT) dari virus dengan cara berikatan di tempat yang dekat

dengan tempat aktif enzim dan menginduksi perubahan konformasi pada situs aktif ini sehingga tidak akan terjadi pembentukan rantai RNA virus baru. Mekanisme antiviral penghambatan proses transkripsi virus ini sering disebut dengan *Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor* (NRTI), bekerja pada tahap awal replikasi virus RNA dengan menghambat terjadinya infeksi akut sel yang rentan (Kol *et al*, 1998).

Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan aplikasi imunostimulan untuk memacu terbentuknya ketahanan spesifik pada ikan menurut Alifuddin (2002), antara lain : kualitas imunostimulan (struktur molekul, mudah dikenali limfosit, dan kekuatan berikatan dengan reseptor), ikan (umur, jenis, kondisi fisiologis) dan lingkungan media pemeliharaan (kualitas air).

4.4. Hasil Uji Hemaglutinasi (HA) *Crude Peridinin N. oculata* dan VNN terhadap Ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*)

Uji serologis yang dilakukan dalam penelitian ini adalah uji Hemaglutinasi (HA). Uji HA digunakan untuk mengetahui reaksi ikatan antara molekul adhesi sel darah merah dengan epitop dari antigen.

Hasil daripada uji HA *Crude Peridinin N. oculata* dan VNN terhadap RBC Ikan Kerapu Tikus normal dapat dilihat pada Tabel 3. Perlakuan kontrol, baik pada organ (MTK) maupun otak (OTK) terdapat dot/endapan RBC dengan ukuran lebih kecil dari pada dot pada kontrol negatif pada pengenceran 1/2. Diduga molekul adhesi yang terdapat pada organ ikan kontrol jumlahnya lebih sedikit dibandingkan dengan jumlah molekul adhesi pada sel darah merah ikan, sehingga ikatan hanya terjadi pada sebagian RBC dan sisanya menyebabkan adanya endapan/dot pada dasar *well*. Berdasarkan ukuran dot dengan acuan pada kontrol positif, maka reaksi positif hanya terjadi pada pengenceran 1/2 saja

sehingga nilai sensitivitas sebesar 0,5 baik pada organ mata maupun otak ikan kontrol (lihat Tabel 3).

Perlakuan ikan yang dipapar virus VNN, baik organ mata (MTV) maupun otak (OTV) didapatkan titer tertinggi yakni 1/64 (lihat Tabel 3). yang berarti bahwa tingkat infeksius VNN yang parah mampu memicu proliferasi sel-sel imun dapat jumlah banyak sehingga dapat *mengaglutinasi* RBC ikan Kerapu Tikus normal hingga pada pengenceran 64 kali. Hal ini didasarkan pada tidak adanya endapan sel RBC pada dasar *well* (hasil positif), seperti dikatakan oleh peneliti sebelumnya, hal ini menunjukkan bahwa protein tersebut adalah *haemagglutinin*. Protein *haemagglutinin* yang ditemukan pada virus VNN ini merupakan residu glikoprotein, dimana apabila suatu protein yang mempunyai sifat residu glikoprotein akan berbahaya bagi ikan dan bisa menyebabkan kematian (Yanuhar, 2009).

Tabel 3. Hasil Uji Hemaglutinasi (HA) Crude Peridinin *N. oculata* dan VNN

Sampel	Titer Pengenceran						Kontrol
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	
MTK	+	-	-	-	-	-	-
MTV	+	+	+	+	+	+	-
MTN	+	+	+	+	+	-	-
MTNV	+	+	+	+	+	+	-
OTK	+	-	-	-	-	-	-
OTV	+	+	+	+	+	+	-
OTN	+	+	+	+	+	-	-
OTNV	+	+	+	+	+	-	-

Sumber : Yanuhar, 2012-2013 dalam Laporan Penelitian Hibah Pascasarjana dan BOPTN, *in process*

Reaksi positif juga terjadi pada perlakuan induksi Crude Peridinin dari *N. oculata* baik pada organ mata (MTN) maupun otak (OTN). Reaksi positif terjadi pada pengenceran 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 dan 1/32 karena Crude Peridinin dari *N.*

oculata mampu memodulasi ikan memproduksi sel-sel imun dalam jumlah banyak. Molekul adhesi terdapat pada semua sel yang mempunyai inti, khususnya pada plasma lema. Sehingga produksi sel-sel imun yang meningkat menyebabkan meningkatnya jumlah molekul adhesi pada tubuh ikan. Molekul adhesi dalam jumlah banyak mampu *mengaglutinasi* RBC yang ditunjukkan dengan tidak adanya endapan (dot) pada dasar *well* mikroplate.

Konsentrasi HA sampai dengan pengenceran 1/32 menunjukkan bahwa reaksi *aglutinasi* antara *crude Peridinin* dengan sel darah merah (RBC) ikan Kerapu Tikus memiliki nilai titer mencapai 2^5 . Pada kondisi ini titer molekul adhesi termasuk dalam konsentrasi tinggi. Titer dengan nilai $2^5 - 2^6$ memberikan pengaruh angka kematian pada individu sebesar 0% (Allan, 1978 dalam Kusmaedi, 2001). Sehingga pada perlakuan ini dapat disimpulkan bahwa kondisi ikan adalah sehat.

Crude Peridinin mampu menginduksi proliferasi sel-sel imun pada ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*) dalam menghambat proliferasi virus VNN, maka dilakukan pengamatan uji HA pada perlakuan pemberian *Crude Peridinin* dari *N. oculata* dan paparan virus VNN terhadap RBC ikan. Hasil menunjukkan reaksi positif untuk organ mata (MTNV) mulai pengenceran 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, sampai dengan pengenceran 1/64. Reaksi positif ditunjukkan dengan tidak adanya endapan RBC pada dasar *well* mikroplate. Diduga adanya induksi protein yakni *Crude Peridinin* dari *N. oculata* mampu menstimulasi sel-sel imun ikan untuk memproduksi molekul adhesin dalam jumlah banyak sehingga mampu *mengaglutinasi* sel darah merah sampai pada pengenceran tertinggi.

Organ otak ikan (OTNV) perlakuan pemberian *Crude Peridinin* dari *N. oculata* yang kemudian dipapar virus VNN menunjukkan reaksi positif mulai pengenceran 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 sampai dengan pengenceran 1/32. Reaksi positif ditunjukkan dengan tidak adanya endapan RBC pada dasar *well* mikroplate.

4.5. Data Kualitas Air

Pada prinsipnya penyakit yang menyerang ikan tidak datang begitu saja, melainkan melalui proses hubungan antara tiga faktor, yaitu kondisi lingkungan (kondisi di dalam air), kondisi inang (ikan) dan kondisi jasad patogen (agen penyakit). Dari ketiga hubungan faktor tersebut dapat mengakibatkan ikan sakit. Penyakit ikan biasanya timbul berkaitan dengan lemahnya kondisi ikan yang diakibatkan oleh beberapa faktor yaitu antara lain penanganan ikan, faktor pakan yang diberikan, dan keadaan lingkungan yang kurang mendukung. Untuk dapat mengetahui dan memahami dengan baik penyebaran penyakit dan pola penyakit ketika menginfeksi ikan, maka diperlukan pengetahuan mengenai karakteristik air yang merupakan habitat ikan dan penyakit tersebut.

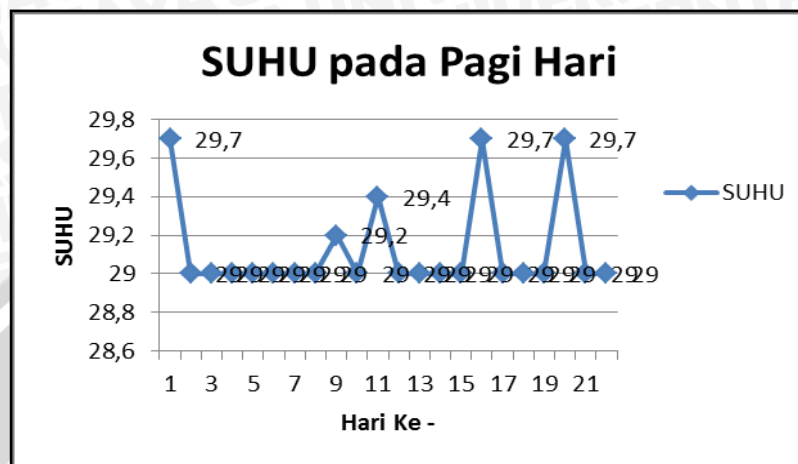
Virus (VNN) terdapat pada lingkungan perairan seperti juga ikan hidup di lingkungan air. Jika kualitas air menurun, maka menyebabkan ikan menjadi *stress*, tetapi kondisi ini justru merupakan media yang baik bagi virus sehingga mereka berproliferasi sampai pada populasi yang mampu menginfeksi ikan hingga sakit dan mati.

Dengan mengetahui hubungan antara aspek kualitas fisika dan kimia air, maka dapat diketahui seberapa besar hubungan parameter kualitas air dengan prevalensi serangan virus VNN terhadap ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*).

1. Suhu

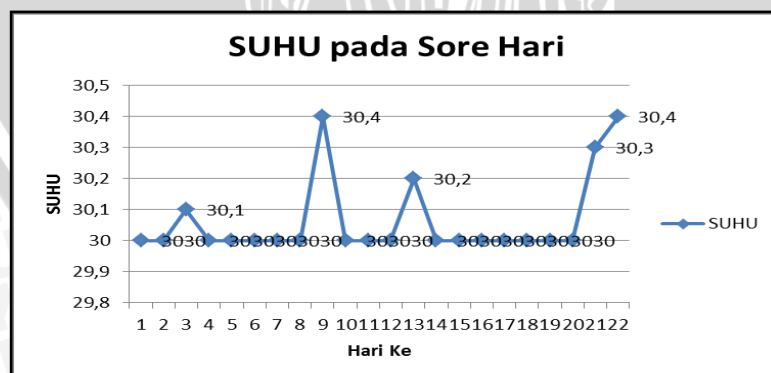
Data kualitas air pada penelitian ini dari parameter fisika salah satunya adalah suhu. Pengukuran suhu dilakukan pada pagi dan sore hari dengan pengamatan rutin setiap hari selama perlakuan. Kordi (2011)^b, menyebutkan bahwa suhu mempengaruhi aktivitas biota, secara umum laju pertumbuhan meningkat seiring dengan kenaikan suhu namun dapat menekan kehidupan biota bahkan menyebabkan kematian apabila fluktuasi suhu sampai ekstrim (drastis).

Perubahan suhu terjadi secara stabil setiap harinya. Suhu pada pagi hari berkisar antara 29° - $29,7^{\circ}$ C. Berikut adalah Grafik distribusi suhu pada pagi hari selama perlakuan (Grafik 1).



Grafik 1. Data suhu pada pagi hari selama perlakuan berkisar antara 29° - $29,7^{\circ}$ C (Sumber : Yanuhar, 2012-2013 dalam Laporan Penelitian Hibah Pascasarjana dan BOPTN, *in process*)

Pada pengamatan suhu disore hari, didapatkan nilai berkisar antara 30° - $30,4^{\circ}$ C. Perubahan suhu pada sore hari cenderung stabil setiap harinya. Perbedaan suhu antara siang dan sore hari sangat kecil karena perubahan suhu antara siang dan sore hari terjadi secara stabil dan tidak mengalami perubahan secara drastis, sehingga kondisi ikan stabil.



Grafik 2. Data suhu pada Sore hari selama perlakuan berkisar antara 30° - $30,4^{\circ}$ C (Sumber : Yanuhar, 2012-2013 dalam Laporan Penelitian Hibah Pascasarjana dan BOPTN, *in process*).

Suhu perairan sangat mempengaruhi kehidupan dan pertumbuhan ikan. Perubahan suhu yang drastis dapat mematikan ikan karena terjadi perubahan daya angkut darah. Daya angkut darah akan lebih rendah pada suhu tinggi dan suhu juga mempengaruhi selera makan ikan (Taukhid, 2006). Apabila suhu rendah maka ikan akan kehilangan nafsu makan sehingga pertumbuhan lambat dan pada saat kondisi ikan lemah maka serangan virus, dalam penelitian ini adalah virus VNN sangat cepat bereaksi menginfeksi ikan karena beberapa pathogen berkembang pada kondisi tertentu.

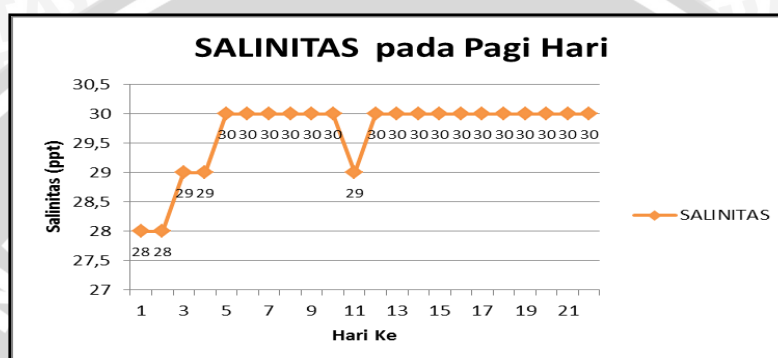
Noga (1996), menyatakan menurunnya suhu perairan menyebabkan kondisi immunosupresi, sedangkan meningkatnya suhu perairan menyebabkan tekanan hormon sehingga virus dapat masuk secara cepat. Penurunan suhu yang tajam, sangat mengganggu kemampuan ikan dalam mensekresikan sel-sel imun terhadap patogen. Perlu waktu panjang untuk memproduksi antibodi dalam merespon patogen yang menyerang tubuh sehingga memungkinkan organisme patogen berkembangbiak dan dengan mudah menyebabkan ikan menjadi sakit. Stres yang berlangsung lama akan semakin menurunkan efektivitas sistem imun sehingga kemungkinan timbulnya penyakit menjadi tinggi (Irianto, 2005).

Suhu tinggi tidak selalu berakibat mematikan tetapi dapat menyebabkan gangguan status kesehatan untuk jangka panjang, misalnya *stress* yang ditandai dengan tubuh lemah, kurus, dan tingkah laku abnormal.

Alifuddin (2002), suhu media pemeliharaan harus optimal bagi proses pembentukan respon imunitas spesifik. Respon spesifik yang terbentuk yakni ini respon yang sangat bergantung kepada suhu (*temperature dependent*). Karena itu, suhu media budidaya harus diatur sedemikian rupa berkisar 25-32°C, agar respon spesifik dapat terbentuk optimum untuk mencegah terjadinya serangan penyakit.

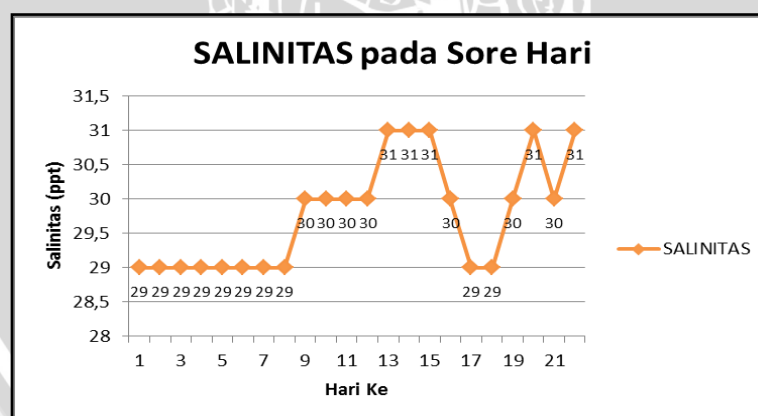
2. Salinitas

Faktor fisika lainnya yang diamati pada penelitian ini adalah Salinitas. Menurut Kordi (2011), salinitas adalah konsentrasi rata-rata seluruh larutan garam yang terdapat dalam air laut. Pengukuran salinitas dilakukan pada pagi dan sore hari dengan pengamatan rutin setiap hari selama perlakuan. Pada pengamatan pagi hari diperoleh nilai salinitas berkisar antara 28-30 ppt.



Grafik 3. Data Salinitas air Pagi Hari selama perlakuan berkisar antara 28-30 ppt (Sumber : Yanuhar, 2012-2013 dalam Laporan Penelitian Hibah Pascasarjana dan BOPTN, *in process*)

Pengamatan salinitas disore hari, didapatkan nilai berkisar antara 29-31 ppt. Perubahan salinitas pada sore hari cenderung stabil setiap harinya.



Grafik 4. Data Salinitas air Sore hari selama perlakuan berkisar antara 29-31 ppt (Sumber : Yanuhar, 2012-2013 dalam Laporan Penelitian Hibah Pascasarjana dan BOPTN, *in process*)

Perbedaan salinitas antara pagi dan sore hari sangat kecil karena perubahan salinitas antara pagi dan sore hari terjadi secara stabil dan tidak

mengalami perubahan secara drastis, sehingga kondisi ikan tetap stabil. Hasil pengamatan ini diperoleh nilai salinitas sebesar 28-31 ppt. Kisaran salinitas tersebut cocok untuk kehidupan ikan Kerapu Tikus hal ini sesuai dengan pernyataan Putra (2008), Salinitas yang ideal untuk pembesaran ikan Kerapu tikus adalah 28-33 ppt.

Efek salinitas terhadap ikan secara langsung mempengaruhi tingkat kerja osmotik, sebagai akibat perbedaan osmolaritas antara cairan dalam tubuh ikan dengan media eksternalnya, kemudian daya absorpsi air media, adapun secara tidak langsung salinitas berpengaruh terhadap ketersediaan oksigen terlarut di dalam air.

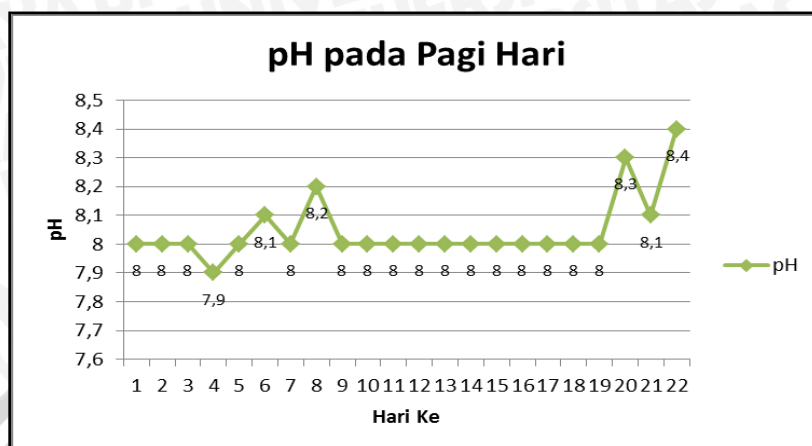
Osmoregulasi adalah upaya hewan air untuk mengontrol keseimbangan air dan ion antara tubuh dan lingkungannya, atau suatu proses pengaturan tekanan osmose (Effendi, 2003).

Semakin besar jumlah ion yang terkonsentrasi didalam air, maka tingkat salinitas dan kepekatan osmolar larutan semakin tinggi, sehingga tekanan osmotik media semakin membesar. Tingkat salinitas yang terlalu tinggi, atau rendah dan fluktuasinya lebar, dapat menyebabkan kematian pada ikan. Sehingga, salinitas media pemeliharaan harus dikondisikan optimal bagi kehidupan ikan, agar sistem imun ikan terjaga dan terhindar dari infeksi virus.

3. pH Air

pH menunjukkan aktivitas ion hidrogen dalam suatu larutan dan dinyatakan sebagai konsentrasi ion hidrogen (dalam mol per liter) pada suhu tertentu (Kordi, 2011)^b. Pengukuran pH dilakukan pada pagi dan sore hari dengan pengamatan rutin setiap hari selama perlakuan. Pada pengamatan pagi hari diperoleh nilai pH berkisar antara 7,9 – 8,3. Perubahan pH sedikit saja dari pH alami akan menyebabkan terganggunya sistem penyangga. Hal ini dapat

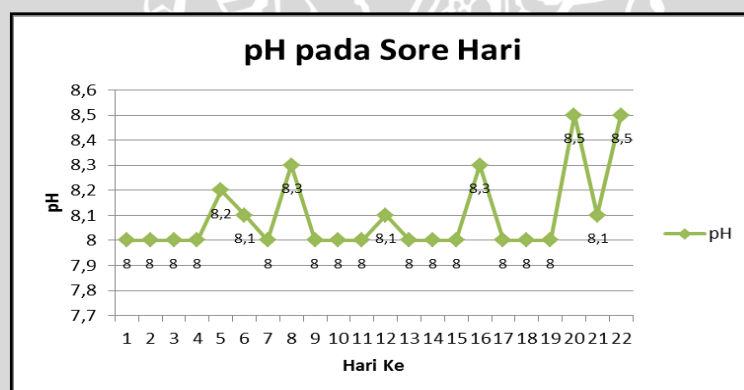
menimbulkan perubahan dan ketidak seimbangan kadar CO_2 yang dapat membahayakan kehidupan ikan.



Grafik 5. Data pH air pagi hari selama perlakuan berkisar antara 7,9 – 8,4 (Sumber : Yanuhar, 2012-2013 *dalam* Laporan Penelitian Hibah Pascasarjana dan BOPTN, *in process*)

Pengamatan pH disore hari, didapatkan nilai berkisar antara 8-8,5 ppt.

Perubahan pH pada sore hari cenderung stabil setiap harinya..



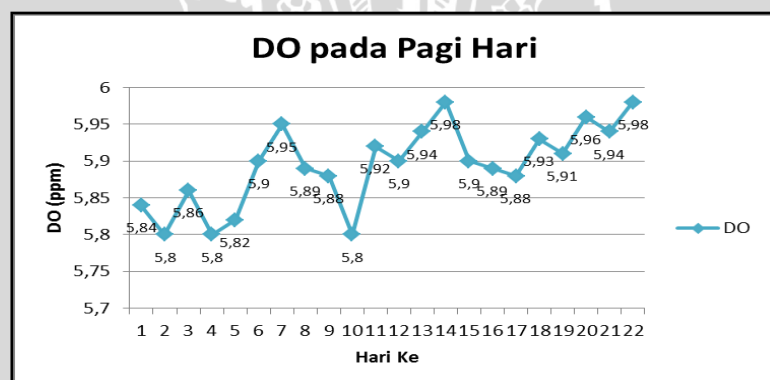
Grafik 6. Data pH air Sore hari selama perlakuan berkisar antara 8 – 8,5 (Sumber : Yanuhar, 2012-2013 *dalam* Laporan Penelitian Hibah Pascasarjana dan BOPTN, *in process*)

Akibat langsung perubahan pH adalah menyebabkan immunosupresi pada ikan sehingga ikan rentan terhadap serangan infeksi virus dan sampai pada kematian. Akibat tidak langsung adalah perubahan toksisitas zat-zat yang ada dalam air. Perbedaan pH antara pagi dan sore hari sangat kecil karena perubahan salinitas antara pagi dan sore hari terjadi secara stabil dan tidak

mengalami perubahan secara drastis, sehingga kondisi ikan tetap stabil. pH optimum untuk kehidupan ikan Kerapu Tikus adalah 7,6 – 8,7 (Kordi, 2011)^a.

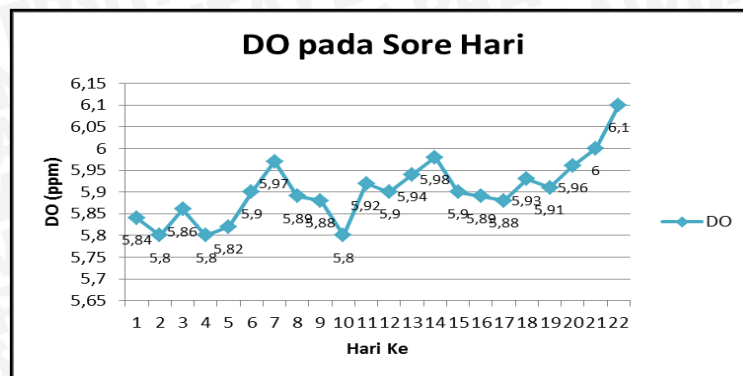
4. Oksigen Terlarut (DO)

Oksigen merupakan salah satu faktor pembatas, sehingga apabila ketersediaannya dalam air tidak mencukupi, maka segala aktivitas biota akan terhambat. Rendahnya kadar oksigen di suatu perairan dapat menyebabkan ikan menjadi *stress* sehingga sistem imun tubuh ikan menurun. Pada kondisi yang demikian, ikan akan sangat mudah terekspose oleh patogen, baik parasit, bakteri, fungi maupun infeksi virus (VNN). Pengukuran DO dilakukan pada pagi dan sore hari dengan pengamatan rutin setiap hari selama perlakuan. Pada pengamatan pagi hari diperoleh nilai DO berkisar antara 5,8 – 5,98 ppm.



Grafik 7. Data DO air Pagi hari selama perlakuan berkisar antara 5,8-5,98 ppm (Sumber : Yanuhar, 2012-2013 *dalam* Laporan Penelitian Hibah Pascasarjana dan BOPTN, *in process*)

Pengamatan DO disore hari, didapatkan nilai berkisar antara 5,8-6,1 ppt. Perubahan salinitas pada sore hari cenderung stabil setiap harinya. Ikan Kerapu Tikus membutuhkan oksigen guna pembakaran makanan untuk menghasilkan aktivitas, seperti pergerakan, pertumbuhan, reproduksi dan lain sebagainya. Oleh karena itu ketersediaan oksigen bagi biota menentukan lingkaran aktivitasnya (Kordi, 2011).



Grafik 8. Data DO air Sore hari selama perlakuan berkisar antara 5,8-6,1ppm
(Sumber : Yanuhar, 2012-2013 dalam Laporan Penelitian Hibah Pascasarjana dan BOPTN, *in process*)

Secara teoritis, kandungan oksigen terlarut dalam air minimal 4 ppm dan untuk kandungan optimum bagi kehidupan ikan berkisar antara 5 – 6 ppm (Effendi, 2004). Perbedaan DO antara pagi dan sore hari sangat kecil karena perubahan DO antara pagi dan sore hari terjadi secara stabil dan tidak mengalami perubahan secara drastis, sehingga kondisi ikan tetap stabil.

Kualitas air memberikan korelasi yang kuat terhadap kondisi kesehatan ikan dan prevalensi serangan penyakit infeksi seperti virus VNN terhadap ikan budidaya. Kualitas perairan sebagai media hidup ikan harus dikondisikan seoptimal mungkin demi menjaga kesehatan ikan serta pemantauan parameter-parameter kualitas air seperti fisika, kimia maupun biologis harus dilakukan secara rutin dan berkala untuk mengetahui status media budidaya agar mampu meminimalisir dan menanggulangi setiap ancaman yang terjadi.

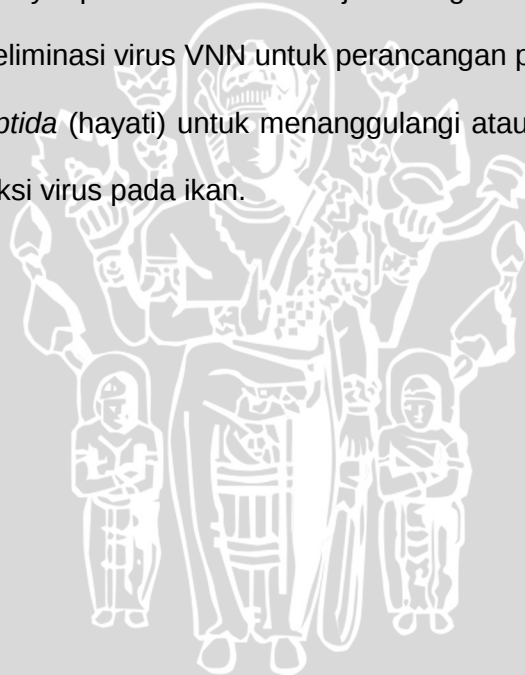
5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan data hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa adanya pengaruh *treatment Crude Peridinin* dari mikroalga *Nanochloropsis oculata* dapat digunakan sebagai bahan induser yang berperan penting dalam ekspresi molekul sel imun proinflamasi TNF- α terkait upaya pencegahan terhadap infeksi VNN pada ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*)

5.2 Saran

Perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut mengenai analisis genomik *Peridinin* dalam mengeliminasi virus VNN untuk perancangan protein rekombinan berbasis bahan *biopeptida* (hayati) untuk menanggulangi atau langkah preventif terhadap penyakit infeksi virus pada ikan.



DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K. and A. H. Lichtman. 2005. **Cellular and Molecular Immunology**, fifth edition, updated edition. Elsevier saunders, Pennsylvania.
- Alifuddin, M. 1999. **Peranan Immunostimulan (Lipopolisakarida, *Saccharomyces cerevisiae* dan Levamisol) pada Gambaran Respon Imunitas Ikan Jambal Siam (*Pangasius hypothalmus* Fowler)**. Tesis, Program Pascasarjana – IPB. Bogor. 40 hal.
- _____. 2002. **Imunostimulasi pada Hewan Akuatik**. Jurnal Akuakultur Indonesia 1(2) : 87 – 92(2002).
- Angka dan Suhartono. 2000. **Tentang *Spirulina***. <http://www.find-pdf.com>.
- Anderson, D.P. 1992. **Immunostimulant, adjuvant and vaccine carrier in fish: Applications to aquaculture**. Annual Review of Fish Diseases, 21: 281-307.
- Aoki, T., T. Takano, M. D. Santos, H. Kondo and I. Hirono. 2008. **Molecular Innate Immunity in Teleost Fish: Review and Future Perspectives**. Fisheries for Global Welfare and Environment, 5th World Fisheries Congress 2008, pp. 263–276.
- Atmodjo, J.T. 2011. **Modul 9 dan 10 Jenis Metode Penelitian**. Universitas Mercubuana. Jakarta. 19 hlm.
- Bachtiar, Eri. 2007. **PENELUSURAN SUMBER DAYA HAYATI LAUT (ALGA) SEBAGAI BIOTARGET INDUSTRI**. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Padjadjaran. Bandung.
- Barathawidjaja, K. G, Rengganis. 2009. **Imunologi Dasar**. Edisi Kelima. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 263p.
- Biermer, M., Puro, R., dan Schneider, R.J. 2003. **Tumor Necrosis Factor Alpha Inhibition of Hepatitis B Virus Replication Involves Disruption of Capsid Integrity Through Activation of NF- κ B**. Journal of Virology, Apr.2003,p. 4033-4042. American Society for Microbiology

Brown, V K; Ogle E W, Burkhardt A L, Rowley R B, Bolen J B, Justement L B (1994). **"Multiple components of the B cell antigen receptor complex associate with the protein tyrosine phosphatase, CD45"**. J. Biol. Chem. (UNITED STATES) 269 (25): 17238–44. ISSN 0021-9258. PMID 7516335.

Burke, J.D., dan Fish, E.N. 2009. **Antiviral Strategies : The Present and Beyond**. Current Molecular Pharmacology, 2009. 2, 32-39 University of Toronto, Canada

Cavaillon, Jean-Marc. 2007. **Molecular Mediators : Cytokines**. In: Meyers (ed.). **Immunology: From Cell Biology To Disease**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, p: 137-166.

Chi, S.C., B.-J. Lo, and S.-C. Lin. 2001. **Characterization of Grouper Nervous Necrosis Virus (GNNV)**. J. Fish Dis. 24:3–14.

Chi, S. C., Y. C. Wu, T. M. Cheng. 2005. **Persistent Infection of Betanodavirus in a Novel Cell Line Derived from the Brain Tissue of Barramundi (*Lates calcarifer*)**. *Dis Aquat Org* Vol. 65: 91–98.

Chi, S. C. 2006. **Piscine nodavirus infections in Asia**. First International Symposium on Viral Nervous Necrosis of Fish International Conference Center, Hiroshima November 28 to December 1, 2006.

Chilmawati, Diana. 2007. **Dasar-dasar Budidaya Pakan Alami**. www.budidayapakanalami.blogspot.com/2007/12/kulturmikroalga

Cholik, F., Jagatraya, A.G., Poernomo, dan Jauzi, A., 2005. **Akuakultur Tumpuan Harapan Masa Depan Bangsa**. Masyarakat Perikanan Nusantara dengan Taman Aquarium Air Tawar. Jakarta.

Corbel, M.J. 1975. **The Immune Response in Fish : A Review**. J. Fish Biol., 7 ; 539 – 563

Effendi, H. 2003. **Telaah Kualitas Air**. Kanisius. Yogyakarta

Ekawati, A. W. 2005. **Budidaya Pakan Alami**. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang

Evalawati, Meiyana M, Aditya TW 2001. **Biologi Kerapu: Pembesaran Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dan Kerapu Tikus**

(*Cromileptes altivelis*) di Karamba Jaring Apung. Balai Budidaya Laut Lampung, Departemen Kelautan dan Perikanan. Jakarta.

Feldman, A.M., Combes, A., Wagner, D., Kadakomi, T., Kubota, T., Li, Y.Y., McTierman, C. 2000. **The Role of Tumor Necrosis Factor in the Pathophysiology of Heart Failure.** Journal of the American College of Cardiology Vol. 35, No.3, 2000

Freeman, W.H. 2007. **Kuby Immunology.** USA

Fujaya, Y. 2004. **Fisiologi Ikan : Dasar Pengembangan Teknologi Perikanan.** Rineka Cipta. Jakarta

Galeotti, M. 1998. **Some Aspect of the Application of Immunostimulant and A Critical Review of Methods for Their Evaluation.** J. Ichthyology. 14 : 89 – 199.

Goetz, F.W., Planas, J.V., MacKenzie, S. 2004. **Tumor Necrosis Factor.** Elsevier. Developmental and Comparative Immunology 28 (2004) 487 – 497.

Goldsby A. Richard, Kindt J. Thomas, Osborne A. Barbara (2000). **Kuby – Immunology, Fourth Edition.** W.H. Freeman and Company, All Right Reserved. United States of America.

Granja AG, Nogal ML, Hurtado C, del Aguila C, Carracosa AL, Salas ML, Fresno M, Revilla Y. 2008. **The Viral Protein A238L Inhibits Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) Expression Through a CBP/p300 Transcriptional Coactivators Pathway.** Centro de Biología Molecular Universidad Autónoma de Madrid, Spain.

Gunawan, I. 2009. **Identifikasi Coat Protein Viral Nervous Necrosis (VNN) Pada Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*).** Tesis, Pascasarjana S2 Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya. Malang.

He, P., Zhang, D., Chen, G., Liu, Q., dan Wu, W. 2003. **Gold Immunolocalization of Rubisco and Rubisco Activase in Pyrenoid of *Chlamydomonas reinhardtii*.** Algae Volume 18(2) : 121 – 127 (2003).

Hedge, A., Chen, C.L., Qin, Q.W., Lam, T.J., Sin, Y.M. 2002. **Characterization, Pathogenicity and Neutralization Studies of a Nervous Necrosis Virus Isolated From Grouper, *Epinephelus tauvina* in Singapore.** Elsevier Aquaculture 213 (2002) 55 – 72.

Herawati, E.Y dan Kusriani. 2005. **Planktonologi.** Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Malang.

Hibberd. 1981. ***Nanochloropsis oculata*.** <http://www.algaebase.org>. Diakses tanggal 10 Januari 2012.

Hindawi. 2010. **Gambar Release TNF- α .** <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2010/254521/fig2/> . Diakses tanggal 15 Januari 2012.

Hirschberg J, Cohen M, Harker M, Lotan T, Mann V, Pecker I. 1997. **Molecular Genetics of The Carotenoid Biosynthesis Pathway in Plants and Algae.** Pure & Appl Chem 69 (10) :2151.

Hoffman, E., Wrench P.M., Sharples, F.P., Hiller, R.G., Welte, W., Diederichs, K. 1996. **Structural Basis of Light Harversting by Carotenoids : Peridinin-Chlorophyll-Protein from *Amphidinium carterae*.** Sciene New Series, Vol. 272, No. 5269 (Jun, 21, 1996), 1788 – 1791.

Holdsworth, R.H. 1971. The **Isolation and Partial Characterization of The Pyrenoid Protein of *Eremosphora viridis*.** The Journal of Cell Biology. Volume 51, 1971. Pages 499 – 513.

Husgard, S., Grotmo, S., Hjeltne, B.K., Rodseth, O.M., dan Biering, E. 2001. **Immune Response to a Recombinant Capsid Protein of Striped Jack Nervous Necrosis Virus (SJNNV) in turbot *Scophthalmus maximus* and Atlantic Halibut *Hippoglossus hippoglossus*, and Evaluation of a Vaccine Against SJNNV.** Diseases of Aquatic Organism Vol. 45:33 – 44.

Invitrogen. 2013. **Pictures about Cells of Vertebrates Immune System.** <http://www.invitrogen.com>.

Irawati, L., Acang, N., Irawati, N. 2008. **Ekspresi Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) dan Interleukin-10 (IL-10) pada Infeksi Malaria Falciparum.** Majalah Kedokteran Andalas No.1 Vol. 32 Januari-Juni 2008.

Irianto, A. 2005. **Patologi Ikan Teleostei.** Gajah Mada University Press. Yogyakarta.

Isnansetyo, A dan Kurniastuty. 1995. **Teknik Kultur Phytoplankton dan Zooplankton.** Penerbit Kanisius. Yogyakarta.

Iwama, G and Nakanishi, T. 2001. **The Fish Immune System : Organism, Pathogen, and Environment.** Academic Press. 395 Pages.

Judarwanto, W. 2012. **Imunologi Dasar Reaksi Radang dan Respon Inflamasi.** <http://allergyclinic.wordpress.com/2012/02/03/imunologi-dasar-radang-dan-respon-inflamasi/>

Junita. 2002. **Potensi *Spirulina platensis* Sebagai Immunostimulan Pada Ikan Patin (*Pangasius djambal*).** Tesis Pascasarjana – IPB. Bogor.

Kokawa, Y., Takami, I., Mishizawa, T., dan Yoshimizu. 2008. **A mixed Infection in Sevenband Grouper *Ephinephelus septemfasciatus* Affected with Viral Nervous Necrosis (VNN).** Elsevier, Aquaculture 248 (2008) 41-45.

Kol, A., Sukhova, G.K., Lichtman, A.H., dan Libby, P. 1998. **Chlamydial Heat Shock Protein 60 Localizes in Human Atheroma and Regulates Macrophage Tumor Necrosis Factor- α and Matrix Metalloproteinase Expression.** Circulation 98:300-307.

Kordi, K.M.G. 2001. **Usaha Pembesaran Ikan Kerapu Di Tambak.** Kanisius, Yogyakarta. 151 hal.

_____.^a. 2011. **Buku Pintar Budidaya 32 Ikan Laut Ekonomis.** Penerbit : Lily Publisher. Yogyakarta.

_____.^b. 2011. **Marikultur : Prinsip dan Praktik Budidaya Laut.** Penerbit : Lily Publisher. Yogyakarta

Kurniadhi, P. 2002. **Metode Uji Hambat Hemaglutinasi (HI Test) sebagai Teknik Pemeriksaan Diagnosis Serologik terhadap Penyakit Aujeszky**. Buletein Teknik Pertanian Vol. 7 nomor 2, 2002

Kumala, S., Dewi, A.T., Nugroho, Y.A. 2005. **Efek Immunostimulan Ekstrak Etanol Herba Pegagan (*Centell asiatica*) Terhadap IgG Mencit Jantan Yang Diinduksi Sel Darah Merah Domba**. Jurnal Farmakologi (5)1 Hlm. 19-25.

Kusmaedi, 2001. **Teknik Uji Hemagglutination Inhibition untuk Mengukur Tingkat kekebalan terhadap Newcastle Disease dan Egg Drop Syndrome**. Temu Teknisi Fungsional Non Peneliti

Madigan, M.T., J.M. Martinko, dan J. Parker. 2003. ***Brock Biology of Microorganisms, Tenth edition***. Prentice Hall, Pearson education, Inc., New Jersey. 1019p.

Maeno, Y., Leobert D. De La Pena and Erlinda R. Cruz-Lacierda. 2007. **Susceptibility of Fish Species Cultured in Mangrove Brackish Area to *Piscine Nodavirus***. JARQ 41 (1), p: 95 – 99.

Moody, N.J, dan Horwood, P.F. 2008. **Betanodavirus Infections of Finfish**. Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedure.

Nguyen, P.V, T Abel, and ER Kandel. 2004. **Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP**. Science, Vol 265, Issue 5175, 1104-1107. American Association for the Advancement of Science.

Nishizawa, T., K. Mori, M. Furuhashi, T. Nakai, I. Furusawa and K. Muroga. 1995. **Comparison of the Coat Protein Genes of Five Fish Nodaviruses, the Causative Agents of Viral Nervous Necrosis in Marine Fish**. *Journal of General Virology* 76, 1563-1569.

Noah W. Palm and Ruslan Medzhitov, 2008. **Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity**. Immunological Reviews, Volume 227 Issue 1, Pages 221 – 233,

Noga, E.J. 1996. **Fish Disease. Diagnosis and Treatment.** Department of Companion Animal and Special Species Medicine. North Caroline State University.

Nontji, A. 1987. **Laut Nusantara.** Jakarta : Djambatan

Nugroho, A.E., 2012. **Prinsip Aksi dan Nasib Obat Dalam Tubuh.** Pustaka Pelajar. Yogyakarta

Nybakken, J.W. 1988. **Biologi Laut Suatu Pendekatan Ekologis.**(Penerjemah : M. Ediman, Koesoebiono, Dietrich, Hutomo dan Sukardjo). Jakarta : PT. Gramedia

Pichyangkul, S., Saengkrai, P, Webster, HK. **Plasmodium falciparum pigment induces monocytes to release high levels of tumor necrosis faktor-alpha and interleukin-1 beta.** AmJ Trop Med Hyg. 1994; 51(4): 430 – 35.

Pinto, E., Catalani, L.H., Lopes, N.P., Mascio, P.D., dan Colepicolo, P. 2000. **Peridinin as the Major Biological Carotenoid Quencher of Singlet Oxygen in Marine Algae *Gonyaulax polyedra*.** Biochemical and Biophysical Research Communication 268, 496 – 500

Plebanski, M., Proudfoot, O., et al. **Immunogenetics and the design of plasmodium falciparum vaccines for use in malaria-endemic populations.** J. Clin. Invest. 2002; 110: 295 – 30

Putra, Sinly Evan. 2008. **Alga Laut sebagai Biotarget Industri.** www.chem-is-try.org.

Qin, W.Q., Ototake, M., Noguchi, K., Soma, G.I., Yokomizo, Y., Nakanishi, T. 2001. **Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α)-Like Factor Produced by Macrophages in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*.** Fish and Shellfish Immunology (2001) 11, 245-256.

Raa, J. G. Roerstad, R. Engstad dan B. Robersten. 1992. **The Use of Immunostimulant to Increase Resistance of Aquatic Organisme to Microbial Infection.** Diseases in Asian Aquaculture I. Fish Healt Sec. Asian Fish Soc. Manila.

Randall, John E. Phillip C. Heemstra,.1993. **FAO Species Catalogue** : Vol. 16. **Groupers Of The World**. Food And Agriculture Organization Of The United Nations. Roma.

Ritschel, W.A., dan Kearn, G.L. 2004. **Handbook of Basic Pharmacokinetics Edisi ke-6**. America Pharmacist Association. Washington

Scenedirect. 2013. **Pictures about Cells of Vertebrates Immune System**.
<http://www.sciencedirect.com>

Shoemaker, C.A., P.H. Klesius, and J.J. Evans. 2001. **Prevalence Of *Streptococcus Iniae* In Tilapia, Hybrid Striped Bass, And Channel Catfish On Commercial Fish Farms In The United States**. American Journal of Veterinary Research 62: 174-177.

Shurety, W., Pagan, J.K., Prins, J.B., Stow, J.L. 2001. **Endocytosis of Uncleaved Tumor Necrosis Factor – α in Macrophages**. Laboratory Investigation The US and Canadian Academy of Pathology. Vol. 81, No. 1, p.107.

Sohne, K.S., Kim, M.K., Kim, J.D., & Han, L.K. 2000. **The Role of Immunostimulants in Monogastric Animal and Fish – Review**. J. Anim. Sci., 13 (8) ; 1178 – 1187

Stagg, A.J., dan Knight, S.C. 2001. **Antigen Presenting Cells**. Encyclopedia of Life Sciene/Nature Publihsing Group. <http://www.els.net>

Stringer, J.L. 2001. **Basic Concepts in Pharmacology Edisi ke-2**. McGraw-Hill International. Singapura

Subowo. 1996. **Efek Imunomodulator dari Tumbuhan Obat**. Warta Tumbuhan Indonesia (3)1 hal. 1-4.

Sugawara T, Yamashita K, Sakai S, Asai A, Nagao A, Shiraishi T, Imai I, Hirata T. 2007. **Induction of Apoptosis in DLD-1 Human Colon Cancer Cell by Peridinin Isolated from the Dinoflagellate, *Heterocapsa triquetra***. Biosci. Biotechnol. Biochem 71 (4), 1069-1072

Surachmad, W. 1998. **Pengantar Penelitian Ilmiah Dasar**. Penerbit Tarsito. Bandung. 118 hlm.

Suryaningtyas, 2008. **Analisis Ekspresi Protein Reseptor Organ-organ Ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*)** Tesis. Program Pasca Sarjana. Universitas Brawijaya.

Taukhid, 2006. **Manajemen Kesehatan Ikan dan Lingkungan**. Laboratorium Riset Kesehatan Ikan. Bogor

Tort, L., J.C. Balasch, S. Mackenzie. 2003. **Fish Immune System. A Crossroads Between Innate And Adaptive Responses** (Rev.). *Immunología* Vol. 22 / Núm 3/ p :277-286.

True, L.D. 1990. **Principles of Immunohistochemistry**, Gower Medical Publishing. New Yorkm USA,

Weis, V.M., Verde, E.A., & Reynold, W.S. 2002. **Characterization of a Short Form Peridinin-Chlorophyll-Protein (PCP) cDNA and Protein From the Symbiotic Dinoflagellate *Symbiodinium muscatinei* (Dinophyceae) From the Sea Anemone *Anthopleura elegantissima* (Cnidaria)**. *J.Phycol.* 38, 157 – 163

Yanuhar, Uun. (2008; 2009; 2010). **Laporan Penelitian Program Insentif Dasar. Pengembangan Vaksin Berbasis Peptida yang Tereksresi pada Reseptor Ikan Kerapu Tikus yang Mengenali Antigen Sebagai Transgenik Antibodi dalam Upaya Penyiapan Bibit Unggul**. Lembaga Penelitian UB dengan KMNRT-RI. Unpublished.

Yanuhar, Uun. 2009. **Pengaruh Pemberian Bahan Aktif Ekstrak *Nannochloropsis oculata* Terhadap Kadar Radikal Bebas pada Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) yang Terinfeksi Bakteri *Vibrio alginoliticus***.

Yanuhar, U., Gusman, E., dan Arfiati, D. 2012. **The Exposure Immunogenic Protein of Viral Nervous Necrotic on Humpback Grouper (*Cromileptes altivelis*) that Influences to Proliferation and**

Expression of Immune Cells (Interferon γ and NF- κ B). Advances
in Enviromental Biology, 6(1): 388 – 396, 2012.



Lampiran 1. Dokumentasi Kegiatan Isolasi *Crude Peridinin* Mikroalga Laut *N. oculata* (Sumber : Yanuhar, 2012-2013 dalam Laporan Penelitian Hibah Pascasarjana dan BOPTN, *in process*)



N. oculata setelah diberi Nitrogen Cair



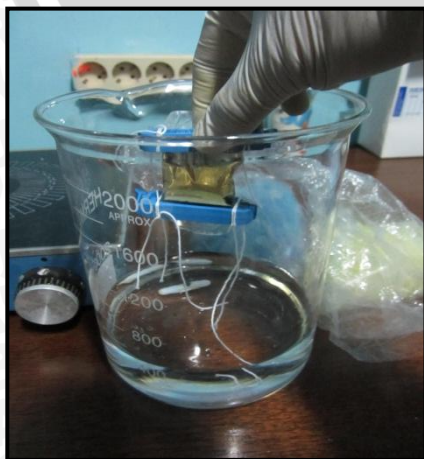
Homogenasi *N. oculata*



Sentrifugasi Mikro22 Centrifuge



Supernatan setelah penambahan SAS



Dialisa I dan Dialisa II



Crude Peridinin

Lampiran 2. Dokumentasi Uji Klinis *Crude Peridinin* dari *N. oculata* terhadap Ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*) (Sumber : Yanuhar, 2012-2013 dalam Laporan Penelitian Hibah Pascasarjana dan BOPTN, *in process*)



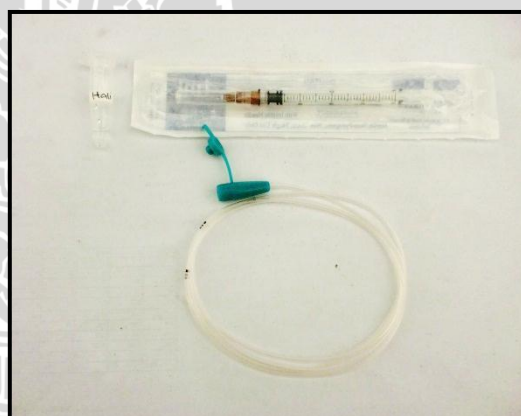
Persiapan Bak Perlakuan



Persiapan Ikan Sebelum uji Klinis



Penimbangan Ikan Kerapu Tikus



Alat untuk Uji Klinis



Induksi Per-oral *Crude Peridinin*

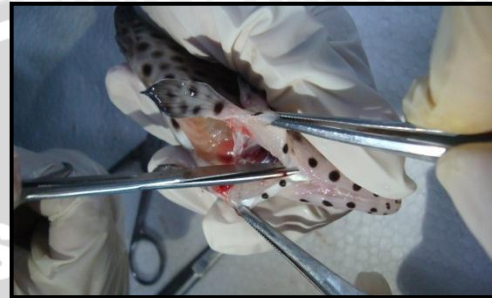


Kondisi Ikan setelah Uji Klinis (terlihat agresif)

Lampiran 3. Dokumentasi Isolasi Organ dan Pengambilan Serum Darah Ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*) (Sumber : Yanuhar, 2012-2013 dalam Laporan Penelitian Hibah Pascasarjana dan BOPTN, *in process*)



Pembiusan Ikan sebelum pembedahan



Pembedahan dan Pengambilan Organ Ikan



Pengambilan Darah Ikan



Serum Darah Ikan



Organ dimasukkan dalam tanki Nitrogen Cair



Organ Hati Ikan setelah diberi Nitrogen Cair



Penyimpanan sampel di dalam Deepfreezer -80°C

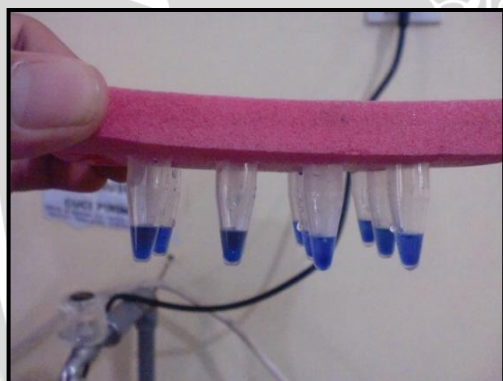
Lampiran 4. Dokumentasi Fragsinasi Protein Organ Ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*) menggunakan SDS PAGE (Sumber : Yanuhar, 2012-2013 dalam Laporan Penelitian Hibah Pascasarjana dan BOPTN, *in process*)



Homogenisasi Organ Target



Pembuatan Gel Acrylamide



Crude Organ yang sudah ditambahkan larutan RSR



Perebusan Crude Organ pada suhu 100°C .



Proses *Running* Crude Organ pada Gel Acrvlamide



Proses *Staining* dan *Destaining* Gel

Lampiran 5. Perhitungan Konsentrasi *Crude Peridinin* dari *N. oculata* untuk Uji Klinis pada Ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*) (Sumber : Yanuhar, 2012-2013 dalam Laporan Penelitian Hibah Pascasarjana dan BOPTN, *in process*)

- Konsentrasi protein *Crude Peridinin* adalah 0,017 mg/ml = 17 µg/ml
- Dosis pemberian dalam uji klinis adalah 33 µg/ml 150 g ikan dengan volume 0,1 ml/ikan atau 100 µl
- Ikan biasanya diinduksi dengan volume 0,1 ml atau 0,2 ml
- Jika 150 gr = 33 µg , maka 50 gr = $(150/50) \times 33 = 11 \mu\text{g}$ diambil dari konsentrasi 17 µg/ml

sehingga

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

$$17 \times a = 0,1 \times 11$$

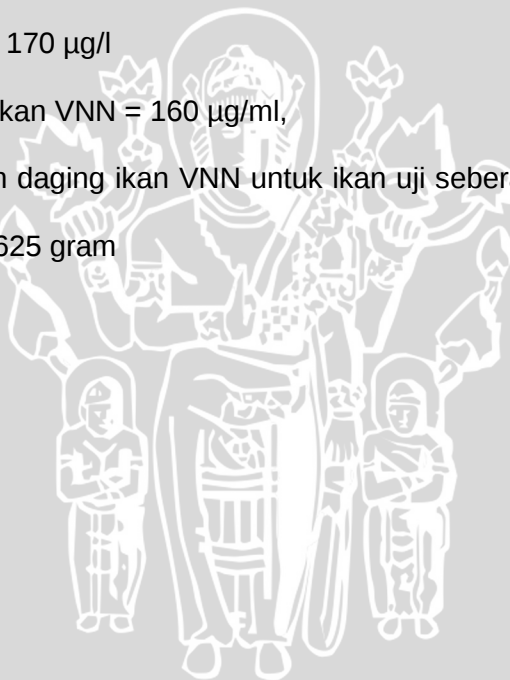
$$a = 0,065 \text{ ml dilarutkan dalam } 0,1 \text{ ml}$$

- Dosis untuk 50 gram ikan adalah
 $= 0,065 + 0,1 = 0,165 \text{ ml} = 165 \mu\text{l}$ (pembulatan)

- ✓ Penyondean I (Hari ke-0) = 165 µl
- ✓ Penyondean II (Hari ke-5) = 178,9 µl dibulatkan menjadi 179 µl
- ✓ Penyondean III (Hari ke-9) = 190,25 µl dibulatkan menjadi 191 µl
- ✓ Penyondean IV (Hari ke-14) = 204,3 µl dibulatkan menjadi 205 µl
- ✓ Penyondean V (Hari ke-18) = 215,5 µl dibulatkan menjadi 216 µl
- ✓ Penyondean VI (Hari ke-22) = 226,7 µl dibulatkan menjadi 227 µl

Lampiran 6. Perhitungan Konsentrasi Protein VNN untuk Uji Klinis pada Ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*) (Sumber : Yanuhar, 2012-2013 dalam Laporan Penelitian Hibah Pascasarjana dan BOPTN, *in process*)

- a. Konsentrasi protein VNN adalah $0,320 \text{ mg/ml} = 320 \text{ } \mu\text{g/ml}$
- b. Dalam 1 gram daging ikan dengan VNN mengandung konsentrasi protein
 $= 320 / 2 (1 \text{ ml}/500 \text{ } \mu\text{l}) = 160 \text{ } \mu\text{g/ml}$
- c. Dosis pemberian uji klinis pada ikan menurut Yanuhar (2012) adalah sebanyak $0,51 \text{ mg/ml} = 510 \text{ } \mu\text{g/ml}$ tiap 150 gr ikan.
- d. Dosis pemberian untuk uji klinis berat ikan 50 gram adalah
 $510 / (150/50) = 170 \text{ } \mu\text{g/l}$
Apabila 1 gram ikan VNN = $160 \text{ } \mu\text{g/ml}$,
maka pemberian daging ikan VNN untuk ikan uji seberat 50 gram adalah
 $= 170/160 = 1,0625 \text{ gram}$



Lampiran 7. Data Kualitas Air Media Pemeliharaan Ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*) Selama Perlakuan (Sumber : Yanuhar, 2012-2013 dalam Laporan Penelitian Hibah Pascasarjana dan BOPTN, *in process*)

Data Kualitas Air selama Pengamatan								
Hari ke -	Suhu (°C)		Salinitas (ppt)		DO (ppm)		pH	
	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore
1	29,7	30	28	29	5,84	5,84	8	8
2	29	30	28	29	5,8	5,8	8	8
3	29	30,1	29	29	5,86	5,86	8	8
4	29	30	29	29	5,8	5,8	7,9	8
5	29	30	30	29	5,82	5,82	8	8,2
6	29	30	30	29	5,9	5,9	8,1	8,1
7	29	30	30	29	5,95	5,97	8	8
8	29	30	30	29	5,89	5,89	8,2	8,3
9	29,2	30,4	30	30	5,88	5,88	8	8
10	29	30	30	30	5,8	5,8	8	8
11	29,4	30	29	30	5,92	5,92	8	8
12	29	30	30	30	5,9	5,9	8	8,1
13	29	30,2	30	31	5,94	5,94	8	8
14	29	30	30	31	5,98	5,98	8	8
15	29	30	30	31	5,9	5,9	8	8
16	29,7	30	30	30	5,89	5,89	8	8,3
17	29	30	30	29	5,88	5,88	8	8
18	29	30	30	29	5,93	5,93	8	8
19	29	30	30	30	5,91	5,91	8	8
20	29,7	30	30	31	5,96	5,96	8,3	8,5
21	29	30,3	30	30	5,94	6	8,1	8,1
22	29	30,4	30	31	5,98	6,1	8,4	8,5
23	29	30	30	30	5,9	5,96	8	8

DAFTAR SINGKATAN

Ab	<i>Antibody</i>
Ag	<i>Antigen</i>
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i>
APS	<i>Ammonium Persulfat</i>
BBAP	Balai Budidaya Air Payau
BM	Berat Molekul
CBB	<i>Comassie Brulliant Blue</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDR	<i>Complementary Determining Regions</i>
CNS	<i>Central Nervous System</i>
CPE	<i>Cytophatic Effect</i>
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocyte</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DC	<i>Dendritic Cell</i>
DS	<i>Double Standet</i>
EDTA	<i>Etilen Diamin Tetra Acetat</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
Fab	<i>antigen-binding Fragmen</i>
Fc	<i>cristalisable Fragmen</i>
GF	<i>Grouper Fin</i>
IFN	<i>Interferon</i>
Ig	<i>Imunoglobulin</i>
IHC	<i>Immunohistochemistry</i>

IL	<i>Interleukin</i>
JAK/STAT	<i>Janus Kinases/Signal Transduction and Activator of Transcription</i>
Kbp	kilo base pairs
kDa	kilo Dalton
LPS	<i>Lipopolysakarida</i>
LSIH	Laboratorium Sentral Ilmu Hayati
LT	<i>Lymphotoxin</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
ml	mili liter
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
NC	<i>Nitrocellulosa</i>
NF κ B	<i>Nuclear Factor Kappa Beta</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
nm	nano meter
OIE	<i>Office International des Epizooties</i>
PAMPs	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PBS	<i>Phospat Buffer Saline</i>
PCP	<i>Peridinin Chlorophyll Protein</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PMN	<i>Polimorphonuclear</i>
PRR	<i>Pathogen-Recognition Receptor</i>
RF	<i>Retadaction Factor</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RPM	<i>Radian per Minute</i>
RSB	<i>Reducing Sampel Buffer</i>

SAS	<i>Sodium Amonium Sulfat</i>
SBG	<i>Seven-banded grouper</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Elektrophoresis</i>
SS	<i>Single Stranded</i>
Tc	<i>Sel T cytotoxic</i>
TCR	<i>T Cell Receptor</i>
TEM	<i>Transmission Electron Micrigraph</i>
TEMED	<i>Tetra Ethylene Diamine</i>
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNFR	<i>Tumor Necrosis Factor Reseptor</i>
μl	mikro liter
μm	Mikro meter
VNN	<i>Viral Nervous Necrosis</i>

DAFTAR ISTILAH

ISTILAH	DESKRIPSI
<i>Acquired Immunity</i>	Sistem kekebalan alami atau sistem imun non spesifik yang merupakan pertahanan tubuh terdepan dalam menghadapi antigen
<i>Adaptive Immunity</i>	Sistem imun yang didapat yang mempunyai ciri : a. Spesifitas tinggi, b. Mempunyai sistem memori yang mampu mengingat antigen penginfeksi yang pernah terpapar di dalam tubuh
<i>Adhesion</i>	Satu dari kelompok protein seperti <i>fibronectin</i> , <i>kollagen</i> , dan <i>fibrinogen</i> yang berada di <i>extraselluler matrik</i>
<i>Adlibitum</i>	Metode pemberian pakan sampai kenyang
<i>Afinitas</i>	Kemampuan suatu senyawa obat dalam berinteraksi dengan reseptor
<i>Antibodi</i>	Molekul yang terbentuk dalam tubuh hewan dan manusia sebagai tanggapan terhadap adanya <i>antigen</i> .
<i>Antiviral</i>	Anti virus
<i>Attachment</i>	Proses penempelan virus pada sel inang
Antigen	Substansi yang biasanya berupa protein yang mampu menstimulasi organisme untuk memproduksi <i>antibodi</i> dan mampu berkombinasi sehingga diproduksi <i>antibodi</i> .
<i>Assembly virus</i>	Virus menyusun protein strukturalnya
<i>Attachment</i>	Proses penempelan virus pada inang
<i>Axon hillock</i>	Bagian <i>akson</i> yang muncul pada badan sel yang merupakan bagian dari <i>neuron</i>
Badan sel (<i>perikarion</i>)	Bagian dari <i>neuron</i> yang merupakan pusat metabolik dan genetik dari semua sel saraf dan juga peka terhadap rangsangan serta menjadi tempat <i>sintesis</i>

	<i>neurotransmitter</i> ,
Barier	Merupakan penghalang masuknya benda asing ke dalam tubuh, penghalang ini dapat berupa fisika dan kimia seperti sel-sel epitel dan senyawa-senyawa anti mikrobial yang terdapat di permukaan sel epitel pada pertahanan alami
Capsid	1. Selubung protein dari virus. 2. Mantel protein virus yang bergabung bersama-sama. 3. Mantel protein yang membungkus <i>genom</i> asam nukleat.
Coat protein	Protein selubung atau <i>Kapsid</i> pada virus
Cytophatic	Virus merusak sel atau mengganggu perkembangan sel kemudian menghilang dari tubuh
Diferensiasi	Pembelahan sel menjadi beberapa tipe sel baru
Elektroelusi	<i>Elusi</i> bahan atau senyawa, <i>diseparasi</i> oleh <i>elektroporesis</i> pada <i>agarose</i> atau <i>acrylamide gel</i> .
Elektroforesis	Teknik pemisahan molekul selular berdasarkan ukurannya, dengan menggunakan medan listrik yang dialirkan pada medium yang mengandung sample yang akan dipisahkan
Envelope	Sebuah membran lipid yang mengelilingi partikel virus
Epitop	adalah area tertentu pada molekul antigenik, yang mengikat antibodi sel B maupun sel T. Umumnya molekul berukuran besar, seperti protein dan polisakarida dapat menunjukkan sifat antigen (Wikipedia.com).
Fagosit	Suatu sel darah putih yang mampu menelan partikel asing
Fagositosis	Proses penghancuran <i>antigen</i> oleh sel <i>makrofag</i> (sel <i>fagosit</i>) atau penelanan bakteri dan partikel asing lain oleh sel <i>fagosit</i>
Genom	Satu kesatuan gen yang secara alami dimiliki oleh satu sel atau virus, atau satu kesatuan <i>kromosom</i> jasad <i>eukariot</i> dalam fase <i>haploid</i>

<i>Granulosit</i>	Kelompok sel darah putih yang mempunyai granula (butiran atau bulatan kecil) pada sitoplasma
<i>Hermaprodit protogini</i>	Pada perkembangan mencapai dewasa (matang <i>gonad</i>) berjenis kelamin betina dan akan berubah menjadi jantan apabila ikan tersebut tumbuh menjadi lebih besar atau bertambahnya umur
<i>Hospes</i>	Tempat perlekatan antara virus dengan sel inang
<i>Infeksi</i>	Pengenalan agen <i>infeksi</i> seperti virus atau bakteri ke dalam <i>host sel</i> atau <i>organisme</i> .
<i>Infeksious</i>	Organisme yang dapat menyebabkan infeksi
<i>Infeksivitas</i>	Kemampuan agen infeksius untuk masuk dan berkembang biak dalam tubuh.
<i>Imunogenik</i>	Suatu zat yang dapat menyebabkan induksi suatu respon imun oleh tubuh baik secara humoral yang dapat diamati apabila zat tersebut masuk ke dalam tubuh
<i>Imunoglobulin</i>	Serum protein yang dibentuk oleh sel plasma yang berasal dari proliferasi sel B akibat adanya kontak dengan antigen.
<i>Inflamasi</i>	Merupakan rangkaian reaksi yang terjadi pada jaringan yang terinfeksi, biasanya disebut radang. Radang juga diartikan sebagai respon dari sistem imun terhadap serangan bakteri, jamur, maupun virus
<i>Interferon</i>	Protein alami yang disintesis oleh sel-sel imun tubuh sebagai respon terhadap adanya virus, bakteri, parasit atau sel kanker.
<i>Interleukin</i>	Salah satu jenis sitokin yang beraksi diantara leukosit dan tipe sel lainnya yang memiliki bermacam-macam aktifitas stimulator yang mengatur respon imun inflamatory dan haematopoietic
<i>In vitro</i>	Metode pengujian dengan melalui perantara dari organ maupun reseptor dari objek yang akan diamati
<i>In vivo</i>	Metode pengujian dengan langsung ke objek yang akan diamati

<i>Kemotaksis</i>	Gerakan dari sel tubuh akibat terpapar zat kimiawi tertentu dalam lingkungannya, merupakan pergerakan mikroorganisme dari sel-sel imun dalam tubuh
Ligan	Kelompok atom atau molekul yang mengikat ion metal.
Limfosit B	Sel-sel dalam sistem imun yang mengkhususkan diri dalam pembentukan <i>antibodi</i>
Limfosit T	Sel-sel yang berperan pada berbagai fungsi <i>imunologi</i> yang berbeda, yaitu sebagai <i>efektor</i> pada <i>respons imun</i> seluler dan sebagai <i>regulator</i> yang akan mengatur kedua <i>respons imun</i>
Lymphocytes	Sel darah
Lysozime	Enzim anti mikroba
Limfokin	Merupakan bagian dari sitokin yang dihasilkan oleh suatu sel imun yang juga diketahui sebagai limfosit.
Lisis	Pemecahan/penguraian suatu substansi lain dibawah pengaruh zat spesifik
Lobus Olfactorius (<i>olfactory bulb</i>)	Bagian otak ikan yang mengandung sel saraf <i>olfactory</i> dan merupakan pusat rangsangan pembau.
<i>Makrofag</i>	<i>Sel-sel fagosit</i>
Makroglia	<i>Makroglia</i> terdiri atas <i>oligodendrosit</i> dan <i>astrosit</i>
Marker	Protein standar (dalam satuan kDa)
<i>Medulla oblongata</i>	Bagian otak ikan yang berfungsi menghantar impuls yang datang dari <i>medula spinalis</i> menuju ke otak dan mempengaruhi <i>refleks fisiologi</i>
<i>Mikroglia</i>	Bagian dari <i>sel glia</i> yang pada membran selnya dilengkapi dengan berbagai <i>reseptor</i> seperti <i>reseptor complement</i> , TLR, <i>reseptor sitokin/kemokin</i> , <i>immunoglobulin</i>
<i>Monosit</i>	Sel darah putih yang berinti satu (sel fagosit)
Mukus	Lendir
<i>Neutrofil</i>	<i>Sel-sel fagosit</i>

<i>Neurological disorder</i>	Saraf tidak normal
<i>Neuron</i>	Merupakan penyusun sistem saraf pusat (CNS) pada otak ikan. Menurut fungsinya, neuron dapat dibagi menjadi tiga kelompok. Pertama, <i>neuron sensoris</i> , Kedua, <i>neuron motorik</i> , Ketiga <i>interneuron</i> .
<i>Non-cytophatc</i>	Virus yang tidak menyebabkan kerusakan sel
<i>Oligodendrosit</i>	Bagian dari <i>makroglia</i> yang berfungsi menghasilkan selubung <i>mielin</i> yang membentuk penyekat listrik dan <i>neuron</i> pada susunan saraf pusat dan nutrisi untuk <i>neuron</i>
Optik lobe	Bagian otak ikan yang merupakan pusat penglihat, juga berfungsi mengatur <i>refleks</i> mata seperti penyempitan pupil mata, dan juga merupakan pusat pendengaran
Otak besar (<i>cerebellum</i>)	Bagian otak ikan yang merupakan sumber dari semua kegiatan atau gerakan sadar atau sesuai dengan kehendak, walaupun ada juga beberapa gerakan <i>refleks</i> otak
Otak kecil (<i>cerebrum</i>)	Bagian otak ikan yang mempunyai fungsi utama dalam <i>koordinasi</i> gerakan otot yang terjadi secara sadar, keseimbangan, dan posisi tubuh
Patogen	Penyebab penyakit
Partikel Virion	Partikel lengkap virus disebut virion. Virion berfungsi sebagai alat transportasi gen, sedangkan komponen selubung dan kapsid bertanggung jawab dalam mekanisme penginfeksian sel inang
Patofisiologi	Ilmu yang mempelajari gangguan fungsi pada organisme yang sakit meliputi asal penyakit, permulaan perjalanan dan akibat
<i>Pattern Recognition Receptors (PRR)</i>	Reseptor pengenalan dalam sistim imun innate yang dapat membedakan pathogen dan sel dari dalam tubuh sendiri
<i>Presipitasi</i>	Reaksi yang mirip dengan aglutinasi, namun

	perbedaan terletak pada antigen yang digunakan. yaitu berupa larutan molekuler/ suspensi klorida. namun sama-sama antibodi yang bersifat multifalen dan terjadi ikatan silang dengan antigen yang sesuai. kompleks molekuler antigen yang larut dan antibodi menjadi begitu besar sehingga berubah menjadi tidak larut dan membentuk presipitat
<i>Prokariotik</i>	Sel yang mempunyai membran inti
<i>Proliferasi</i>	Pertumbuhan sel
<i>Protein</i>	Merupakan polimer asam-asam amino (<i>polipeptida</i>) yang mempunyai fungsi utama : (1) <i>katalisator</i> reaksi dalam sel. (2) pengangkut molekul kecil dan ion. (3) berperan dalam sistem pergerakan yang terkoordinasi. (4) bagian sistem kekebalan tubuh. (5) sebagai <i>feromon</i> . (6) sebagai pengatur <i>ekspresi genetik</i> . (7) penerus <i>impuls</i> saraf, dan (8) pendukung kekuatan regang.
<i>PRO-STAIN™</i>	<i>Marker</i> yang digunakan sebagai pembanding pita <i>protein</i> yang muncul yang dihitung bobot molekulnya (BM) melalui <i>regresi-korelasi</i>
<i>Replikasi</i>	Proses perbanyakkan bahan genetik
<i>Reseptor</i>	Bagian target pada tingkat <i>molekuler</i> yang mengelilingi substansi sebagai hasil dari <i>interaksi spesifik</i> . Bagian organisme yang merespon terhadap <i>stimuli spesifik</i> seperti <i>chemoreseptor</i> , <i>osmoreseptor</i> atau <i>potoreseptor</i>
Resistensi	Kemampuan mikroorganisme untuk bertahan terhadap antibiotik atau bahan kimia pada dosis tertentu
SDS-PAGE	Teknik <i>elektroporesis</i> yang berguna untuk menentukan (<i>determinasi</i>) berat <i>molekuler</i> rantai <i>polipeptida</i> . Hal ini didasarkan pada pemisahan <i>protein oligomerik</i> dengan <i>sodium dodecyl sulfate</i> pada pH netral dan <i>mercaptoethanol</i> (untuk memutuskan ikatan <i>disulfida protein</i>).
Sel B	Sel-sel dalam sistem imun yang mengkhususkan diri

	dalam pembentukan antibodi
<i>Sel glia</i>	Sel penyokong <i>neuron</i> terdiri dari <i>mikroglia</i> dan <i>makroglia</i> yang secara umum memiliki peran penting dalam sistem saraf
Sel T	Sel-sel yang berperan pada berbagai fungsi imunologi yang berbeda, yaitu sebagai efektor pada respons imun seluler dan sebagai regulator yang akan mengatur kedua respons imun
Sel T Citotoksik (Tc)	Sel T yang berperan dalam menghancurkan sel-sel yang mengekspresikan antigen pada permukaannya yang dimuat oleh molekul MHC kelas I
Sel T helper (Th)	Sel yang berperan dalam menolong sel B memproduksi antibodi
Serum	Komponen darah yang dikumpulkan setelah pembekuan. Antiserum, darah serum dengan antibodi spesifik untuk kekebalan pasif
Sistem imun <i>Adaptive</i>	Adalah sistem imun daptan yang mempunyai ciri ;(1) memiliki <i>spesifitas</i> yang dapat membedakan tiap-tiap molekul dari agen penginfeksi dan (2) memiliki sistem memori yang mampu untuk mengingat agen penginfeksi yang pernah masuk atau terpapar di dalam tubuhnya
Sistem Imun	System pertahanan atau kekebalan tubuh, yang terdiri dari Sistem imun <i>Innate</i> dan Sistem imun <i>Adaptive</i>
Sistem imun <i>Innate</i>	System kekebalan alami atau system imun non spesifik yang merupakan pertahanan tubuh terdepan dalam menghadapi berbagai <i>antigen</i> .
<i>Sitokin</i>	<i>Sitokin</i> merupakan <i>glycoprotein</i> yang dapat larut ketika dilepaskan oleh sel system immune (<i>disekresi</i> terutama dari <i>leukocyte</i>) yang berperan dalam non <i>enzmatically reseptor</i> spesifik untuk <i>meregulasi</i> respon imun.
<i>Sitotoksik</i>	Bahan yang menghambat pertumbuhan sel
<i>Sleeping dead</i>	Ikan berada di dasar seperti mati
<i>Swim bladder</i>	Gelembung renang ikan

<i>Transkripsi</i>	Proses penyalinan urutan <i>nukleotida</i> yang terdapat pada molekul DNA
<i>Translasi</i>	Proses penerjemahan urutan <i>nukleotida</i> yang ada pada molekul <i>mRNA</i> menjadi rangkaian asam-asam amino yang menyusun suatu <i>polipeptida</i> atau <i>protein</i> .
<i>Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-α)</i>	Merupakan sitokin proinflamasi dengan berat molekul 17 kDa dan 26 kDa yang berfungsi dalam respon inflamasi untuk menghambat proliferasi mikroba atau antigen asing
<i>Tumor Necrosis Factor Reseptor (TNFR)</i>	Merupakan reseptor TNF yang ada pada permukaan sel target
<i>Toll Like Receptor (TLR)</i>	<i>Reseptor</i> pada membran sel atau kelompok <i>protein</i> pada membran sel sebagai <i>reseptor</i> yang secara luas mengenal molekul <i>mikroba</i> serta dapat <i>stimulasi respon innate</i> imun bawaan
<i>Uncoating</i>	Pelepasan bungkus dalam <i>replikasi</i> virus
<i>Vaksin</i>	<i>Suspense mikroorganisme</i> yang dapat menimbulkan penyakit tetapi telah dilemahkan sehingga tidak akan menimbulkan penyakit dan dapat merangsang pembentukan <i>antibodi</i> apabila <i>diinokulasikan</i> .
<i>Viral shedding</i>	Penanggalan/pelepasan virus
<i>Virion</i>	Satuan dasar virus atau partikel virus lengkap
<i>Virus</i>	Suatu partikel yang mengandung bahan genetik berupa DNA atau RNA yang diselubungi oleh <i>protein</i> dan pada beberapa virus ada juga komponen lain, misalnya lemak
<i>Whirling</i>	Ikan berenang berputar-putar