

**PEMANFAATAN FRAGMEN PIGMEN PROTEIN MIKROALGA LAUT  
*Nannochloropsis oculata* YANG DIUJI SECARA IN-VIVO PADA IKAN  
KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*)**

**SKRIPSI**

**PROGRAM STUDI MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

Oleh :

**YOVAN ENDIK IRAWANTO**

**NIM. 115080107111005**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2015**

**PEMANFAATAN FRAGMEN PIGMEN PROTEIN MIKROALGA LAUT  
*Nannochloropsis oculata* YANG DIUJI SECARA IN-VIVO PADA IKAN  
KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*)**

**SKRIPSI**

**PROGRAM STUDI MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan  
di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan  
Universitas Brawijaya**

Oleh :

**YOVAN ENDIK IRAWANTO  
NIM. 115080107111005**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2015**

HALAMAN PENGESAHAN

SKRIPSI

PEMANFAATAN FRAGMENT PIGMEN PROTEIN MIKROALGA LAUT  
*Nannochloropsis oculata* YANG DIUJI SECARA IN-VIVO PADA IKAN  
 KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*)

Oleh:

YOVAN ENDIK IRAWANTO  
 NIM. 115080107111005

Telah dipertahankan di depan penguji  
 pada tanggal 12 Agustus 2015  
 dan dinyatakan telah memenuhi syarat

SK Dekan No. : \_\_\_\_\_

Tanggal : \_\_\_\_\_

Dosen Penguji I

Menyetujui,  
 Dosen Pembimbing I

Ir. Herwati Umi S, MS  
 NIP. 19520402 198003 2 001  
 Tanggal: \_\_\_\_\_

Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.Si.  
 NIP. 19730404 200212 2 001  
 Tanggal: \_\_\_\_\_

Dosen Penguji II

Dosen Pembimbing II

Prof. Dr. Ir. Diana Arfiati, MS  
 NIP. 19591230 198503 2 002  
 Tanggal: \_\_\_\_\_

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

Mengetahui,  
 Ketua Jurusan MSP

(Dr. Ir. Arning Wilujeng Ekawati, MS.)  
 NIP. 19620805 198603 2 001  
 Tanggal: \_\_\_\_\_





**LEMBAR KHUSUS**

Penelitian ini dibiayai oleh Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Direktorat Jendral Pembelajaran dan Kemahasiswaan Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi, sesuai dengan Addendum Surat Perjanjian Penugasan Dalam Rangka Pelaksanaan Program Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Nomor : 007/Add/SP2H/PL/DIT.LITABMAS/V/2015, tanggal 12 Mei 2015. dengan Judul “ **Produksi dan Pengembangan Produk Antiviral Berbasis Peridinin Chlorophyl Cell Pigmen Spesies Mikroalga Laut Untuk Komoditas Unggulan Ikan Ekspor** ” yang diketuai oleh Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si,.

Penelitian melibatkan mahasiswa S2 dan S1 :

1. Ach. Khumaidi, S. Pi
2. Leni Sri Wahyuni
3. Luqman Hariono
4. Yovan Endik Irawanto
5. Amira Masitha
6. Dian Novalisa
7. Fariq Maghfiroh Al-habsy

ADAPUN JUDUL SKRIPSI DALAM PENELITIAN INI ADALAH:

**PEMANFAATAN FRAGMENT PIGMEN PROTEIN MIKROALGA LAUT *Nannochloropsis oculata* YANG DIUJI SECARA IN-VIVO PADA IKAN KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*)**

Mengetahui,  
Ketua Peneliti



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

## PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.

Malang, 12 Agustus 2015

Mahasiswa,

YOVAN ENDIK IRAWANTO  
NIM. 115080107111005

## KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan syukur atas kehadiran Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyajikan Laporan Skripsi yang berjudul PEMANFAATAN FRAGMENT PIGMEN PROTEIN MIKROALGA LAUT *Nannochloropsis oculata* YANG DIUJI SECARA IN-VIVO PADA IKAN KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*). Di dalam tulisan ini, diinformasikan kandungan protein yang terdapat pada mikroalga laut (*N. oculata*) serta peran dari Fragment Pigmen Protein yang dapat dijadikan sebagai inducer peningkatan sistem imun kerapu tikus dalam menghadapi VNN.

Sangat disadari bahwa dalam penulisan laporan ini masih banyak kekurangan dikarenakan keterbatasan penulis. Oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun untuk kesempurnaan tulisan ini.

Malang, 12 Agustus 2015

Penulis



## UCAPAN TERIMA KASIH

- Penulis menyampaikan rasa syukur yang tiada terhingga kepada Allah SWT yang berkehendak atas segala kelancaran dalam penyelesaian laporan Skripsi ini.
- Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada kedua orang tua yang telah setia menghantarkan dan mendoakan saya hingga jenjang S1.
- Ucapan terima kasih yang sebesar – besarnya kepada Ibu Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si dan Ir. Kusriani MP selaku dosen pembimbing yang telah bersedia meberikan ilmunnya dengan suka rela serta saran yang membangun hingga laporan ini selesai.
- Ucapan terima kasih yang sebesar – besarnya kepada Ibu Ir. Herwati Umi S, MS. dan Prof. Dr. Ir. Diana Arfiati, MS yang telah bersedia untuk menjadi dosen penguji dari penulis dalam ujian Skripsi.
- Kepada Ach. Khumaidi, Amira Masitha, Hendra Saputra, Dian Novalisa, Fariq Maghfiroh, Nanuk Hidayah, Novia Pradita, Fahmi Abd. Rahman, Arif Bagus, M. Ainul Yaqin, Nur Rohimah Febriati, Azimar Rifqi, Rosalia Waromi, Luffi Yuanda, sebagai pendamping yang selalu setia menemani dan membantu proses Skripsi.
- Kepada orang yang tersayang Nikzha Anis Maharotin yang telah bersedia mendampingi saya dan membantu dalam proses pengerjaan laporan skripsi ini.
- Kepada semua kawan-kawan jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan angkatan 2011 (ARM'11) yang selalu mensupport saya dan memberikan saran atas terselesaikannya Laporan Skripsi ini.

## RINGKASAN

**YOVAN ENDIK IRAWANTO.** Skripsi tentang PEMANFAATAN FRAGMENT PIGMEN PROTEIN MIKROALGA LAUT *Nannochloropsis oculata* YANG DIUJI SECARA IN-VIVO PADA IKAN KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*) di Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang (dibawah bimbingan **Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si dan Ir. Kusriani, MP**)

---

Ikan kerapu merupakan salah satu komoditas unggulan budidaya di Indonesia disamping tiga komoditi lainnya seperti udang, ikan nila dan rumput laut. Penurunan populasi ikan kerapu di alam dan kerusakan habitat karang menyebabkan budidaya kerapu menjadi solusi dalam kontribusi ekspor (Amrullah, 2003).

Kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) merupakan salah satu jenis ikan laut yang cukup berpotensi. Ikan kerapu tikus adalah jenis ikan karang yang hanya hidup dan tumbuh cepat di daerah tropis. Ciri khasnya terletak pada bentuk moncong diujung depan kepala yang menyerupai tikus sehingga disebut kerapu tikus atau kerapu bebek, dan ikan ini mempunyai nilai ekonomi yang tinggi (Akbar dan Sudaryanto, 2001).

Budidaya ikan kerapu tikus sudah mulai berkembang sejak tahun 1998. Kendala yang terdapat pada budidaya ikan kerapu adalah penyakit. Penyakit yang sering menyerang ikan kerapu adalah *Viral Nervous Necrosis* (VNN) yang disebabkan oleh noda virus (Sugama, 2003).

Mikroalga merupakan kelompok tumbuhan berukuran renik yang termasuk dalam kelas alga, diameternya antara 3-30  $\mu\text{m}$ , baik sel tunggal maupun koloni yang hidup di seluruh wilayah perairan tawar maupun laut, yang lazim disebut fitoplankton. *N. oculata* merupakan sel berwarna kehijauan, tidak motil, dan tidak mempunyai flagel. Selnya berbentuk seperti bola berukuran sedang dengan diameter 2-4  $\mu\text{m}$ , tergantung spesiesnya, dengan kloroplas berbentuk cangkir (Hermanto *et al.*, 2011).

*N. oculata* memiliki nutrisi penting seperti *Eicosapentaenoic Acid* (EPA) sebesar 30,5%, Omega 3 HUFAs sebesar 42,7 %, kandungan lipid antara 31-68% berat kering dan kandungan protein sebesar 52,11% (Fulks dan Main, 1991; Kawaroe, 2008; Fachrullah, 2011). Selain itu Mohammady *et al.*, (2005), dalam penelitiannya menjelaskan bahwa mikroalga ini memiliki kandungan asam amino yang lengkap seperti alanin, metionin, dan leusin. Selama pertumbuhannya mikroalga dapat mengalami beberapa fase pertumbuhan diantaranya fase lag, fase logaritmik atau eksponensial, fase penurunan laju pertumbuhan, fase stasioner dan fase kematian.

Aktin merupakan komponen penting pada sitoskeleton. Perannya sangat penting dalam berbagai proses sel termasuk perpindahan sel, pembelahan sel, dan ekspresi gen.  $\beta$ -aktin adalah senyawa kompleks dari dua molekul yang berbeda, yang memperluas antara molekul satu dengan molekul yang lain pada profilin (komponen membran yang dapat merangsang ekspresi gen) (Chik *et al.*, 1996).

Pemanfaatan *N. oculata* bisa dalam bentuk Fragmen Pigmen Protein (FPP). FPP ini digunakan sebagai inducer sistem kekebalan tubuh ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*). Harapannya adalah pengiduksian FPP mampu meningkatkan ekspresi  $\beta$ -aktin sebagai bentuk respon yang baik terhadap serangan VNN.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah deskriptif ekperimental. Pengamatan dilakukan pada perlakuan (A) ikan kontrol (ikan tanpa perlakuan FPP



dan VNN), (B) ikan dengan pemberian FPP, (C) ikan dengan pemberian VNN, dan (D) ikan dengan pemberian FPP dan pada hari ke-14 diinfeksi VNN. Aktifitas FPP diamati pada organ hati ikan uji berdasarkan ekspresi  $\beta$ -aktin sebagai penanda respon antivirus. Metode analisa yang digunakan adalah SDS-PAGE, dan Imunohistokimia (IHK). Gambar dianalisa menggunakan software Immunoratio (IR) dan ImageJ.

Hasil pengamatan pada organ hati ikan kerapu tikus menunjukkan penginduksian FPP memberikan pengaruh terhadap peningkatan ekspresi  $\beta$ -aktin. Hasil tersebut berdasarkan analisa (immunoratio:imageJ). Pada ikan kontrol prosentase kemunculan  $\beta$ -aktin sebesar (27,0%:positif), pada ikan dengan pemberian FPP lebih tinggi yaitu (55,4%:positif), ikan dengan penginfeksi VNN (58,5%:positif), dan ikan dengan penginduksian FPP dan penginfeksi VNN (65,4%:positif).

Berdasarkan pengamatan ini dapat disimpulkan bahwa fragmen pigmen protein (FPP) *crude* mikroalga *N. oculata* yang diinduksikan pada ikan kerapu tikus (*C. altivelis*) dapat meningkatkan  $\beta$ -aktin pada sel. Peningkatan ini menjadi regulator kunci keberhasilan respon imun pada ikan. Hasil ini menjadi indikator semakin baiknya sistem pertahanan ikan uji terhadap serangan VNN.



## DAFTAR ISI

PERNYATAAN ORISINALITAS .....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
UCAPAN TERIMAKASIH .....	v
RINGKASAN .....	vi
DAFTAR ISI .....	viii
DAFTAR TABEL .....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiii
<b>1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Maksud dan Tujuan .....	3
1.4 Manfaat .....	3
1.5 Waktu dan Tempat .....	4
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
2.1 Ikan Kerapu Tikus ( <i>Cromileptes altivelis</i> ) .....	5
2.1.1 Taksonomi .....	5
2.1.2 Morfologi .....	6
2.1.3 Ekologi dan Distribusi .....	6
2.1.4 Reproduksi .....	7
2.1.5 Parameter Kualitas Air Ikan Kerapu Tikus .....	8
2.2 Sistem Pertahanan Tubuh Ikan .....	10
2.2.1 Sistem Pertahanan Nonspesifik .....	10
2.2.2 Sistem Pertahanan Spesifik .....	11
2.3 $\beta$ -aktin .....	12
2.4 <i>Viral Nervous Necrosis</i> (VNN) .....	13
2.5 <i>Fragmen Pigmen Protein</i> (FPP) .....	14
2.6 Mikroalga .....	14
2.6.1 <i>Nannochloropsis oculata</i> .....	15
2.6.2 Morfologi <i>N. oculata</i> .....	15
2.6.3 Sifat dan Ekologi <i>N. oculata</i> .....	17
2.7 Faktor Yang Mempengaruhi Pertumbuhan <i>N. oculata</i> .....	17
2.7.1 Faktor Internal .....	17
2.7.2 Faktor Eksternal .....	19
2.8 Pemanfaatan Mikroalga <i>N. oculata</i> .....	20

3. MATERI DAN METODE .....	22
3.1 Materi Penelitian .....	22
3.2 Alat dan Bahan .....	22
3.3 Metode Penelitian .....	23
3.4 Desain Penelitian .....	25
3.5 Prosedur Penelitian .....	26
3.5.1 Sterilisasi Alat .....	26
3.5.2 Proses Isolasi Protein (FPP) <i>N. oculata</i> .....	27
3.5.3 Elektroforesis Protein dengan Metode SDS_PAGE .....	28
3.5.4 Pengukuran Berat Molekul Protein Sampel .....	32
3.5.5 Syarat Hewan Uji .....	32
3.5.6 Aklimatisasi Ikan Kerapu Tikus .....	33
3.5.7 Parameter Kualitas Air .....	33
3.5.8 Uji In-Vivo Pada Ikan Kerapu Tikus .....	35
3.5.9 Immunohistokimia .....	35
3.6.0 Analisa Data .....	37
4. PEMBAHASAN .....	40
4.1 Kultur Mikroalga <i>N. oculata</i> .....	40
4.1.1 Kultur Murni .....	40
4.1.2 Kultur Semi Massal ( <i>Intermediette</i> ) .....	42
4.1.3 Kultur Massal .....	42
4.2 Kandungan Nutrien Pada Pertumbuhan Mikroalga .....	42
4.3 Isolasi FPP <i>N. oculata</i> .....	43
4.4 Profil FPP <i>N. oculata</i> .....	45
4.5 Hasil Uji In-Vivo FPP Pada Ikan Kerapu Tikus .....	47
4.6 $\beta$ -aktin Hasil Uji In-Vivo Organ Hati <i>C. altivelis</i> .....	49
4.6.1 Organ Hati Ikan Kontrol .....	50
4.6.2 Organ Hati dengan Pemberian FPP .....	52
4.6.3 Organ Hati dengan Pemberian VNN .....	53
4.6.4 Organ Hati dengan Pemberian FPP dan VNN .....	56
4.7 Analisa Data .....	58
4.8 Mekanisme $\beta$ -aktin di dalam sel .....	60
4.9 Hasil Analisa Kualitas Air .....	61
5. KESIMPULAN DAN SARAN .....	65
5.1 Kesimpulan .....	65
5.2 Saran .....	65
DAFTAR PUSTAKA .....	66
LAMPIRAN .....	74



## DAFTAR TABEL

<b>Tabel 1.</b> Kandungan asam amino .....	16
<b>Tabel 2.</b> Denah percobaan penelitian .....	26
<b>Tabel 3.</b> Analisa sidik ragam .....	38
<b>Tabel 4.</b> Analysis of varian .....	38
<b>Tabel 5.</b> Komposisi pupuk walne .....	43
<b>Tabel 6.</b> Perhitungan berat molekul dan persamaan linier marker .....	46
<b>Tabel 7.</b> Perhitungan berat molekul band protein <i>N. oculata</i> .....	46
<b>Tabel 8.</b> Data hasil penelitian .....	59
<b>Tabel 9.</b> Hasil Uji anova DAB $\beta$ -aktin .....	59
<b>Tabel 10.</b> Hasil uji BNT .....	60
<b>Tabel 11.</b> Hasil pengukuran suhu .....	62
<b>Tabel 12.</b> Hasil pengukuran pH .....	62
<b>Tabel 13.</b> Hasil pengukuran salinitas .....	63
<b>Tabel 14.</b> Hasil pengukuran DO .....	64

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 1.</b> Ikan kerapu kikus ( <i>C. altivelis</i> ) .....	6
<b>Gambar 2.</b> Morfologi <i>N. oculata</i> .....	16
<b>Gambar 3.</b> Kurva pertumbuhan mikroalga .....	19
<b>Gambar 4.</b> Tahap inokulasi .....	40
<b>Gambar 5.</b> Kultur murni 1 .....	41
<b>Gambar 6.</b> Kultur murni 2 .....	41
<b>Gambar 7.</b> Kultur semi massal .....	42
<b>Gambar 8.</b> Proses isolasi <i>N. oculata</i> .....	44
<b>Gambar 9.</b> a) Sentrifuge, b) supernatan hasil sentrifuge, c) pengukuran protein dengan spektrofotometer. ....	44
<b>Gambar 10.</b> Hasil SDS-PAGE FPP <i>N. oculata</i> .....	45
<b>Gambar 11.</b> Grafik linier band protein marker .....	46
<b>Gambar 12.</b> (a), (b), dan (c) Hasil immunoratio organ hati ikan kontrol .....	50
<b>Gambar 13.</b> Histogram dan grafik organ hati ikan kontrol .....	51
<b>Gambar 14.</b> (a), (b), dan (c) Hasil immunoratio organ hati dengan pemberian FPP .....	52
<b>Gambar 15.</b> Histogram dan grafik organ hati dengan pemberian FPP .....	53
<b>Gambar 16.</b> (a), (b), dan (c) Hasil immunoratio organ hati dengan pemberian VNN .....	54
<b>Gambar 17.</b> Histogram dan grafik organ hati dengan pemberian VNN .....	55
<b>Gambar 18.</b> (a), (b), dan (c) Hasil immunoratio organ hati dengan pemberian FPP dan VNN.....	56
<b>Gambar 19.</b> Histogram dan grafik organ hati dengan pemberian FPP dan VNN .....	57
<b>Gambar 20.</b> Grafik perubahan ekspresi $\beta$ -aktin .....	58





DAFTAR LAMPIRAN

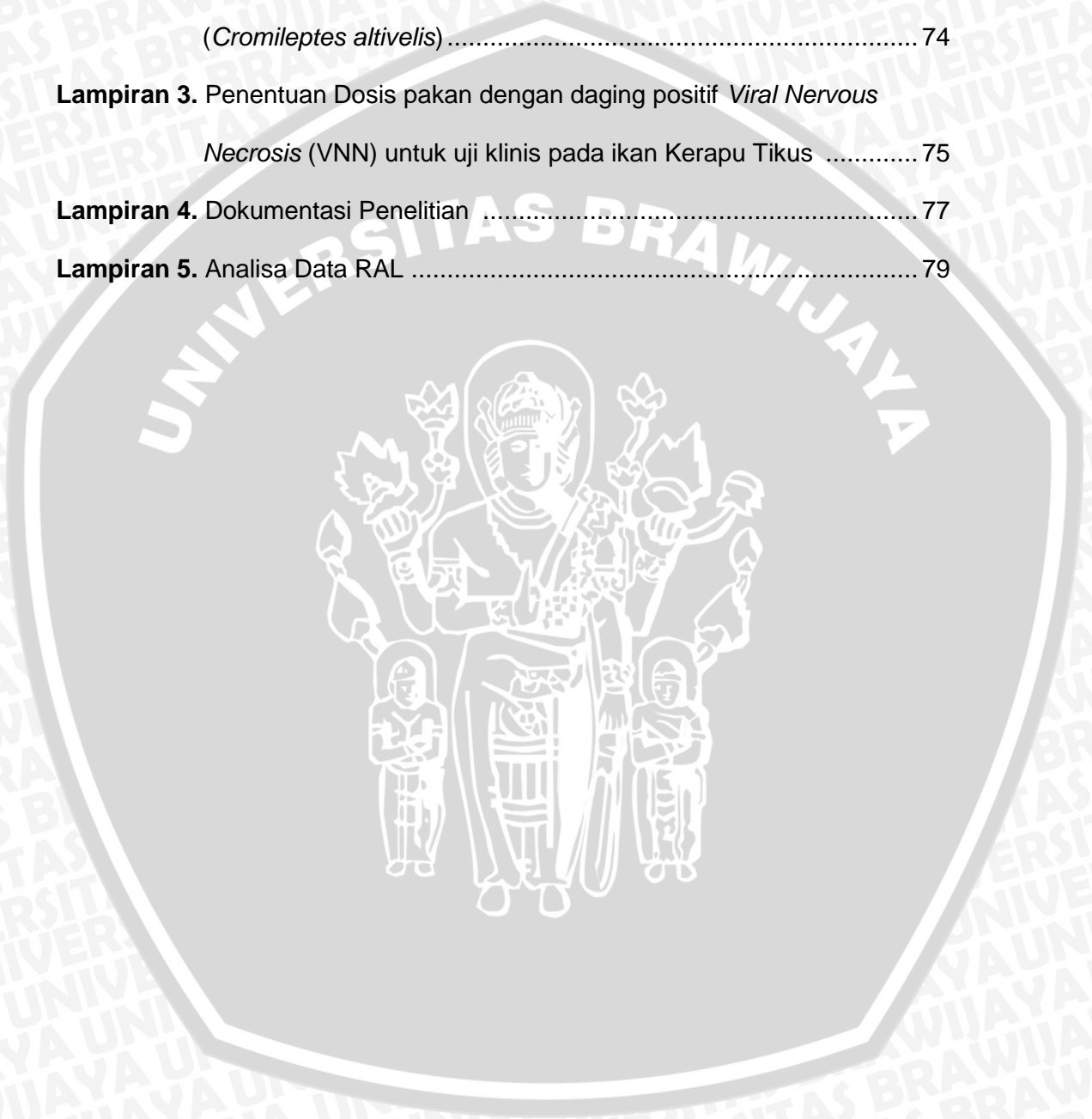
**Lampiran 1.** Data Pertumbuhan Berat Badan Ikan Uji ..... 74

**Lampiran 2.** Penentuan dosis FPP untuk perlakuan pada ikan Kerapu Tikus  
(*Cromileptes altivelis*) ..... 74

**Lampiran 3.** Penentuan Dosis pakan dengan daging positif *Viral Nervous*  
*Necrosis* (VNN) untuk uji klinis pada ikan Kerapu Tikus ..... 75

**Lampiran 4.** Dokumentasi Penelitian ..... 77

**Lampiran 5.** Analisa Data RAL ..... 79



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Pengembangan budidaya laut merupakan usaha untuk meningkatkan produksi sekaligus langkah pelestarian kemampuan lingkungan yang serasi dan seimbang dalam rangka mengimbangi pemanfaatan dengan cara penangkapan (Affan, 2012). Ikan kerapu merupakan salah satu komoditas unggulan budidaya di Indonesia disamping tiga komoditi lainnya seperti udang, ikan nila dan rumput laut. Penurunan populasi ikan kerapu di alam dan kerusakan habitat karang menyebabkan budidaya kerapu menjadi solusi dalam kontribusi ekspor (Amrullah, 2003).

Dari beberapa jenis ikan kerapu, ikan kerapu tikus adalah satu diantara jenis ikan keluarga *Serranidae* yang bernilai ekonomis tinggi, karena banyak diminati oleh konsumen baik sebagai ikan hias maupun sebagai ikan konsumsi. Upaya untuk membudidayakan melalui pembenihan telah dilakukan oleh Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol dan telah berhasil memproduksi benih kerapu bebek dengan kelangsungan hidup yang relatif tinggi (Tridjoko *et al.*, 1999 dan Sugama *et al.*, 2001).

Kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) merupakan salah satu jenis ikan laut yang berprospek cukup cerah. Ikan kerapu tikus adalah jenis ikan karang yang hanya hidup dan tumbuh cepat di daerah tropis. Ciri khasnya terletak pada bentuk moncong diujung depan kepala yang menyerupai tikus sehingga disebut kerapu tikus atau kerapu bebek, dan ikan ini mempunyai nilai ekonomi yang tinggi (Akbar dan Sudaryanto, 2001).

Budidaya ikan kerapu tikus sudah mulai berkembang sejak tahun 1998. Kendala yang terdapat pada budidaya ikan kerapu adalah penyakit. Penyakit yang sering menyerang ikan kerapu adalah *Viral Nervous Necrosis* (VNN) yang

disebabkan oleh nodavirus (Sugama, 2003). VNN adalah penyakit yang sangat berbahaya karena dapat menimbulkan kematian yang tinggi pada kerapu terutama pada stadia larva dan juvenil (Koesharyani *et al.*, 2005). Banyak cara yang dilakukan oleh peneliti dalam mengatasi serangan VNN ini, salah satunya penelitian Prayitno (2012), tentang ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava*) untuk menginaktifkan VNN pada ikan kerapu tikus, namun upaya tersebut masih belum maksimal.

Pemanfaatan berbahan sumberdaya hayati untuk menanggulangi serangan virus sudah banyak dikembangkan, untuk mencari alternatif dalam manajemen kesehatan ikan. *Nannochloropsis oculata* merupakan salah satu mikroalga yang dimanfaatkan sebagai pakan alami pada budidaya ikan kerapu. Pemanfaatan *N. oculata* tidak hanya mampu mendukung pertumbuhan ikan. Beberapa penelitian juga menyebutkan mikroalga *N. oculata* dapat digunakan dalam manajemen kesehatan ikan. Yanuhar (2012), menjelaskan bahwa *N. oculata* dapat digunakan sebagai bahan antiviral dalam mengeliminasi virus RNA VNN sebagai penyebab utama kematian ikan kerapu.

Mikroalga *N. oculata* memiliki kandungan yang lengkap diantaranya *Eicosapentaenoic Acid* (EPA) sebesar 30,5%, Omega 3 HUFAs sebesar 42,7 %, kandungan lipid antara 31-68% berat kering dan kandungan protein sebesar 52,11% (Fulks dan Main, 1991; Kawaroe, 2008; Fachrullah, 2011). Selain itu Mohammady *et al.*, (2005), juga menyatakan *N. oculata* memiliki kandungan asam amino yang lengkap diantaranya lisin 0,67, leusin 1,73, dan alanin 2,32. Disamping itu mikroalga *N. oculata* memiliki kandungan pigmen *chlorophyll a*,  $\beta$ -*carotene*, *violaxanthin* dan *vaucherxan* tapi tidak mempunyai *chlorophyll b* (Cohen, 1999).



Pemanfaatan *N. oculata* bisa dalam bentuk Fragmen Pigmen Protein (FPP). Yanuهار (2015), menyatakan bahwa FPP mikroalga *Nannochloropsis oculata* dapat memberikan efek anti inflamasi pada ikan kerapu tikus yang terinfeksi VNN. Dengan demikian penting untuk dilakukan penelitian pemanfaatan FPP mikroalga *N. oculata* untuk mengetahui sejauh mana potensi FPP sebagai antiviral VNN.

### 1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian latar belakang diatas dapat rumusan masalah yang dapat diambil yakni *N. oculata* merupakan salah satu jenis mikroalga yang banyak dibudidayakan karena mengandung karbohidrat, beta karoten, lipid, klorofil, protein, dan asam amino sebagai penyusunnya. Kandungan sel *N. oculata* berpotensi dikembangkan sebagai sumber pakan, pangan, dan obat-obatan. Oleh karena itu mikroalga ini dipilih untuk meningkatkan sistem imun dalam menghadapi VNN yang sering menyerang pada ikan kerapu tikus.

### 1.3 Tujuan

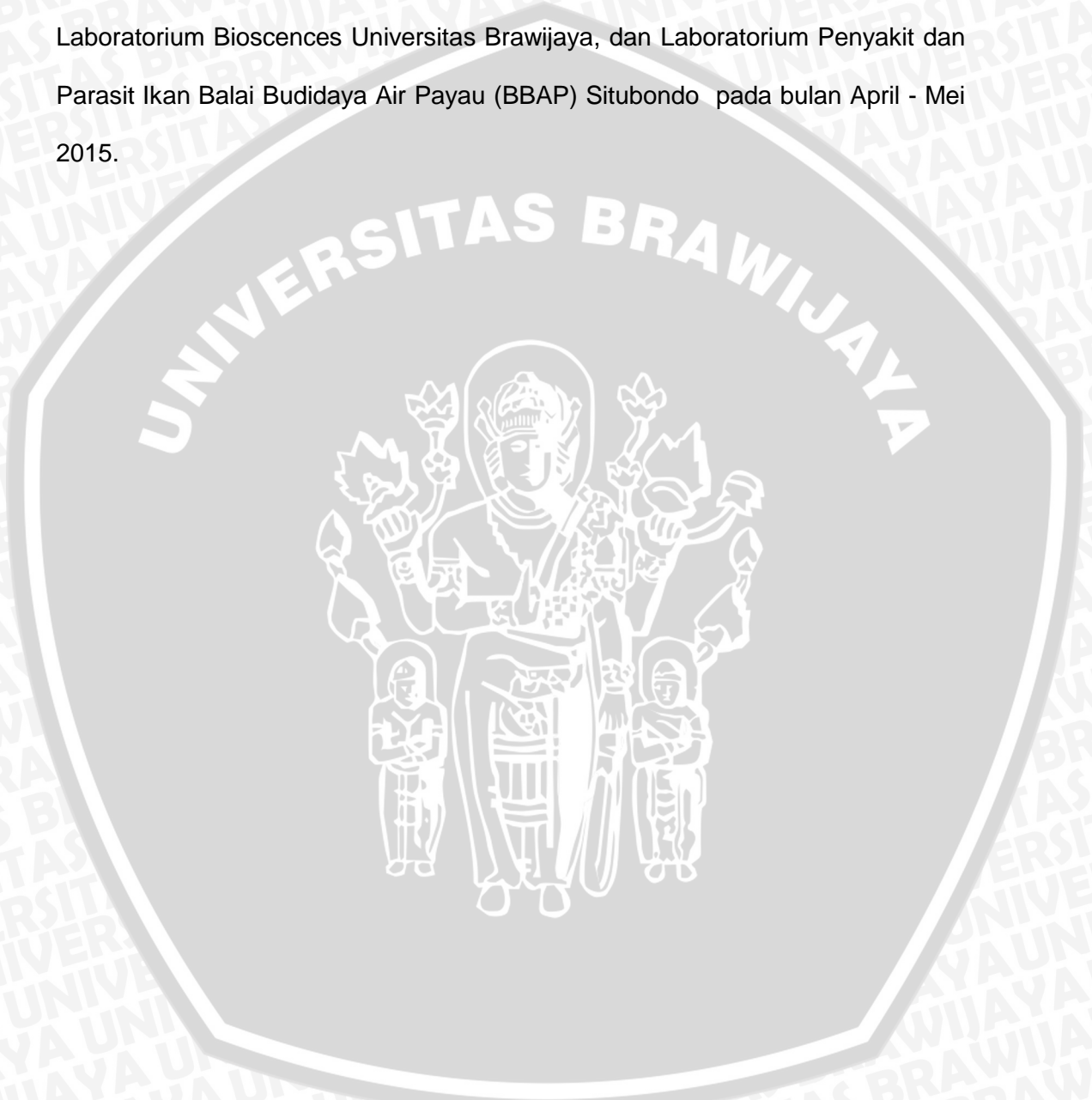
Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pentingnya peran Fragmen Pigmen Protein (FPP) *N. oculata* dalam meningkatkan sistem imun pada ikan kerapu tikus ditinjau dari meningkatnya  $\beta$ -aktin di dalam sel.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini mikroalga *N. oculata* dapat digunakan untuk meningkatkan sistem imun pada ikan kerapu tikus yang berbahan Fragmen Pigmen Protein *N. oculata*. Dapat digunakan sebagai informasi tambahan bagi peneliti lain yang akan melakukan penelitian lebih lanjut dan dapat digunakan sebagai referensi bagi pembudidaya untuk kelangsungan hidup ikan.

### 1.5 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Lingkungan dan Bioteknologi Perairan dan Laboratorium Bioteknologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Laboratorium Patologi dan Anatomi RSSA Malang, Laboratorium Biosciences Universitas Brawijaya, dan Laboratorium Penyakit dan Parasit Ikan Balai Budidaya Air Payau (BBAP) Situbondo pada bulan April - Mei 2015.



## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*)

#### 2.1.1 Taksonomi

Menurut Randall *et al.*, (1993), klasifikasi ikan Kerapu Tikus adalah sebagai berikut :

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

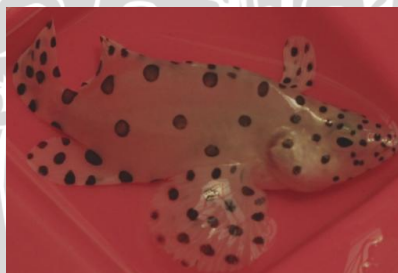
Ikan kerapu tikus merupakan satu di antara jenis ikan laut keluarga *Serranidae* yang hidup di perairan karang mempunyai nilai ekonomis tinggi dan merupakan komoditas ekspor di pasar Asia terutama Hongkong dan Singapura. Ikan kerapu tikus dalam kondisi hidup mempunyai peranan penting. Ikan kerapu tikus bila masih kecil dengan ukuran 2 inci banyak diminati konsumen sebagai ikan hias (Kohno *et al.*, 1990; Heemstra dan Randall, 1993). Bila ukuran bobot mencapai 0,5 kg perekor digunakan sebagai ikan konsumsi (Ahmad *et al.*, 1991) dan merupakan ikan termahal di kawasan Asia Tenggara (Mishima dan Gonzares, 1994). Indonesia merupakan salah satu negara penyumbang terbesar ikan kerapu hidup selain Thailand dan Filipina.



### 2.1.2 Morfologi

Kerapu tikus bertubuh agak pipih dan warna dasar kulit tubuhnya abu-abu dengan bintik-bintik hitam diseluruh permukaan tubuh (Gambar 1). Kepala berukuran kecil dengan moncong agak meruncing. Karena kepala yang kecil mirip bebek, maka jenis ini populer sebagai kerapu tikus. Namun, ada pula yang menyebutnya sebagai kerapu tikus karena bentuk moncongnya yang meruncing menyerupai moncong tikus. Kerapu tikus digolongkan sebagai ikan konsumsi bila bobot tubuhnya telah mencapai 0.5-2 kg/ekor (Kordi, 2001).

Kerapu tikus memiliki bentuk sirip yang membulat. Sirip punggung tersusun dari 10 jari-jari keras dan 19 jari-jari lunak. Pada sirip dubur, terdapat 3 jari-jari keras dan 10 jari-jari lunak. Ikan ini bisa mencapai panjang tubuh 70 cm atau lebih, namun yang dikonsumsi, umumnya berukuran 30-50 cm. kerapu tikus tergolong ikan buas yang memangsa ikan-ikan dan hewan-hewan kecil lainnya. Kerapu tikus merupakan salah satu ikan laut komersial yang telah dibudidayakan baik dengan tujuan pembenihan maupun pembesaran (Hemstra and Randall, 1993).



**Gambar 1.** Ikan kerapu tikus (Hemstra and Randall, 1993)

### 2.1.3 Ekologi dan Distribusi

Daerah penyebaran kerapu tikus meliputi Pasifik Barat meliputi Jepang Selatan, Republik Palau, Pulau Guam, Kaledonia Baru, Queensland Selatan Australia (Lieske dan Robert, 1997). Dijelaskan pula ikan kerapu tikus hidup di kedalaman 2-40 m, yaitu daerah terumbu karang, laguna, dan daerah pasang surut. Amiruddin *et al.*, (2011), juga menyatakan daerah penyebaran ikan kerapu Tikus (*C. altivelis*) dimulai dari Afrika Timur sampai Pasifik Barat Daya . Di wilayah

Indonesia kerapu tikus banyak ditemukan di Pulau Sumatra, Jawa, Sulawesi, Buru dan Maluku. Siklus hidup ikan kerapu tikus muda hidup di perairan karang pantai dengan kedalaman 0,5-3 m.

Kondisi ekologi perairan berkarang antara lain memiliki suhu 24-31°C, salinitas 30-33 ppt, kandungan oksigen terlarut lebih besar dari 3,5 ppm, dan pH air antara 7,8-8 (Nybakken, 1988). Yushimitsu dan Hiramatsu, (1986) juga menyatakan bahwa parameter ekologi yang cocok bagi pertumbuhan ikan kerapu yaitu pada salinitas antara 30-33 ppt, suhu air antara 24-31°C, pH antara 7,8-8, dan kandungan oksigen terlarut lebih dari 3,5 ppm.

#### 2.1.4 Reproduksi

Kerapu tikus memiliki sifat hermaphrodit protogini yaitu perubahan kelamin (*change sex*) dari betina ke jantan dipengaruhi oleh ukuran, umur, dan spesiesnya. Transformasi dari betina ke jantan ini memerlukan waktu yang cukup lama dalam kondisi alami. Pada kerapu tikus, transisi dari betina ke jantan terjadi setelah mencapai umur 2,0-2,5 tahun. Pada umur 1,5-2,5 tahun biasanya ikan masih berkelamin betina. Adapun ikan-ikan yang berumur 2,5 tahun ke atas, berkelamin jantan (Khordi dan Andi Tamsil, 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 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, pada salinitas air antara 28-35 ppt (Cholik, 2006).



### 2.1.5 Parameter Kualitas Air Ikan Kerapu Tikus

#### a) Suhu

Suhu merupakan parameter utama bagi pertumbuhan ikan, karena suhu dapat mempengaruhi kelangsungan hidup ikan. Suhu yang cocok bagi pertumbuhan ikan yaitu antara 24-31°C. Amiruddin *et al.*, (2011), menyatakan suhu air yang sangat cocok untuk pertumbuhan dan kelangsungan hidup ikan kerapu tikus adalah suhu 27-29°C.

Menurut Mahasri (1999), temperatur perairan akan berpengaruh pada metabolisme perairan, dimana :

- Semakin tinggi temperatur maka metabolisme organisme juga tinggi, sehingga konsumsi O<sub>2</sub> akan naik dan antara *demand suplay* tidak seimbang. Hal ini akan mengakibatkan ikan-ikan yang hidup di perairan itu menjadi stres.
- Apabila temperatur tinggi, maka kelarutan oksigen akan menurun (kecil) sehingga ikan akan menjadi stres, 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

Kordi (2007), menjelaskan bahwa salinitas adalah konsentrasi seluruh larutan garam yang diperoleh dalam air laut. Sedangkan menurut Boyd (1982), salinitas adalah kadar seluruh ion-ion yang terlarut dalam air. Komposisi ion-ion pada air laut dapat dikatakan mantap dan didominasi oleh ion-ion tertentu seperti klorida, karbonat, bikarbonat, sulfat, natrium, kalsium dan magnesium.

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 *sodium chloride* (NaCl) yang sering disebut garam dapur. Selain NaCl, di dalam air laut terdapat pula  $MgCl_2$ , 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 (Nontji, 1986).

### c) pH

Derajat keasaman lebih dikenal dengan istilah pH. pH (singkatan dari *puissance negatif de H*), yaitu logaritma dari kepekatan ion-ion H (Hidrogen) yang terlepas dalam suatu cairan. Derajat keasaman atau pH air menunjukkan aktivitas ion hidrogen dalam larutan tersebut dan dinyatakan sebagai konsentrasi ion hidrogen (dalam mol per liter) pada suhu tertentu atau dapat ditulis  $pH = -\log (H)^+$  (Kordi, 2007). Menurut Qodri *et al.*, (1999), parameter-parameter ekologis yang cocok untuk pertumbuhan ikan kerapu yaitu pH antara 6,5-9.

### d) Oksigen Terlarut (*Disolved Oxygen / DO*)

Oksigen merupakan faktor penting bagi kehidupan makro dan mikro organisme perairan karena diperlukan untuk proses pernafasan. Sumber oksigen terlarut dalam perairan berasal dari proses difusi oksigen yang terdapat di atmosfer

kurang lebih 35% dan aktivitas fotosintesis oleh tumbuhan air dan fitoplankton. Fluktuasi oksigen terlarut harian dapat mempengaruhi parameter kimia, terutama pada saat kondisi tanpa oksigen, yang dapat mengakibatkan perubahan sifat kelarutan beberapa unsur kimia di perairan (Apridayanti, 2005). Selain dapat mempengaruhi beberapa unsur kimia dan konsentrasi oksigen dalam air dapat mempengaruhi pertumbuhan dan konversi pakan serta mengurangi daya dukung perairan. Kerapu tikus dapat hidup layak dalam keramba jaring apung dengan konsentrasi oksigen terlarut lebih dari 5 ppm.

## **2.2 Sistem Pertahanan Tubuh Ikan**

Sistem pertahanan tubuh pada ikan dipengaruhi oleh kondisi anatomis, fisiologis, spesies, umur, berat badan, dan lingkungan luar sehingga memungkinkan adanya tingkatan yang berbeda-beda (Schaperclaus, 1992). Sistem pertahanan tubuh ikan terdiri dari dua macam, yaitu sistem pertahanan nonspesifik dan spesifik (Davies, 1997).

### **2.2.1 Sistem Pertahanan Nonspesifik**

Sistem pertahanan nonspesifik berfungsi untuk melawan segala jenis patogen, bersifat permanen, diturunkan kepada anaknya, dan tidak perlu adanya rangsangan (Schaperclaus, 1992). Pada ikan, pertahanan pertama untuk melawan patogen terdapat pada permukaan tubuh. Secara fisik, daerah permukaan tubuh dapat menghambat masuknya patogen ke dalam tubuh ikan (Atlas, 1997) meliputi mukus, kulit, insang, dan saluran gastrointestinal (Ellis, 1989). Sistem pertahanan nonspesifik kimiawi meliputi komponen-komponen dalam serum darah yang berfungsi menghambat pertumbuhan mikrobia. Komponen-komponen tersebut adalah komplemen, C-reaktif protein (CRP), interferon, lisozim, transferin, antiprotease (Ingram, 1980; Ellis, 1988; Ellis, 1989), dan asam (Schaperclaus, 1992 dan Atlas, 1997). Sistem pertahanan nonspesifik menggunakan mekanisme efektor seluler berupa aktivitas fagositosis yang



melibatkan sel-sel organ dan sel motil. Sel-sel organ meliputi sel jaringan penghubung (fibroblast), jaringan *lymphoid* dari saluran pencernaan, sel reticuloendothelial, sel dinding kapiler, dan jaringan monosit. Sel motil terdiri atas makrofag, leukosit nongranular (monosit dan limfosit), dan leukosit granular (neutrofil, eosinofil, dan basofil) (Ingram, 1980 dan Schaperclaus, 1992).

### 2.2.2 Sistem Pertahanan Spesifik

Sistem pertahanan spesifik berfungsi untuk mempertahankan diri terhadap penyakit tertentu dan pembentukannya memerlukan rangsangan terlebih dahulu. Rangsangan dapat terjadi secara alami dan buatan atau dengan vaksinasi (Ellis, 1989). Sistem pertahanan spesifik terdiri atas dua macam, yaitu sistem pertahanan seluler atau *cell mediated immunity* (CMI) dan sistem pertahanan humoral (produksi antibodi) (Ellis, 1988; Noble & Noble, 1989). Sistem pertahanan seluler dihasilkan oleh aktivitas limfosit yang disebut sel-sel T, yang berlangsung dalam kelenjar timus. Bila terjadi kontak dengan antigen spesifik, sel-sel T berdiferensiasi menjadi sel-sel yang mampu mengadakan interaksi langsung dengan sel atau jaringan asing dan kemudian merusaknya. Oleh karena itu, sel-sel T disebut sel pembunuh. Fungsi sel pembunuh ditingkatkan melalui kontak langsung antara sel-sel T efektor dengan membran permukaan sel sasaran, atau melalui pelepasan mediator yang bersifat larut nonspesifik dan nonantibodi yang disebut *lymphokines* (Noble & Noble, 1989).

Pertahanan humoral diprakarsai oleh golongan limfosit yang disebut sel-sel B, yang bila diaktivasi oleh pengenalan suatu benda atau substansi asing berusaha menjadi sel-sel plasma yang memproduksi antibodi (Noble & Noble, 1989), sedangkan pengenalannya dilakukan setelah antigen diproses oleh makrofag. Kemudian makrofag memberikan pesan kepada limfosit (Anderson, 1974). Antibodi ini dihasilkan di hati, ginjal, limpha, dan kelenjar timus (Lagler *et al.*, 1977). Antibodi umumnya dikenal sebagai imunoglobulin, yakni protein yang



imunoglobulin yang ditemukan dalam ikan termasuk dalam kelas IgM (Davies, 1997). Respon imun terhadap suatu antigen tergantung pada dosis dan cara pemasukannya ke dalam tubuh. Pada umumnya, cara pemasukan antigen ke dalam tubuh dapat langsung melalui kulit, organ pernapasan, saluran pencernaan, atau disuntikkan, dan masing-masing cara tersebut dapat menimbulkan respon imun yang berbeda intensitasnya (Subowo, 1993).

### 2.3 $\beta$ -aktin

Aktin merupakan salah satu protein yang terdapat pada sel eukariotik dan merupakan protein intraseluler yang paling banyak ditemukan. Aktin termasuk molekul tunggal yang ketika dipolimerasi dapat membentuk dua jenis filamen di dalam sel, yakni mikro filamen, yang merupakan salah satu dari tiga komponen utama sitoskeleton, yang mana dua lainnya adalah filamen intermediate dan mikrotubulus, serta filamen tipis (Artman *et al.*, 2014).

Aktin merupakan komponen penting pada sitoskeleton. Peranannya sangat penting dalam berbagai proses sel termasuk perpindahan sel, pembelahan sel, dan ekspresi gen. Fungsi tersebut terkait dengan kemampuan aktin dalam pembentukan filamen yang cepat, serta dapat menyusun dan memisahkan sel. Terdapat enam bentuk aktin pada hewan vertebrata (Rubenstein, 1990). Empat dari bentuk tersebut terdapat pada otot lurik yaitu  $\alpha_{sk}$  dan  $\alpha_{ca}$  dan pada otot halus yaitu  $\alpha_{sm}$  and  $\gamma_{sm}$ . Sedangkan bentuk  $\beta$ -aktin dan  $\gamma$ -aktin terdapat pada sitoplasma (Bunnell *et al.*, 2011).

$\beta$ -aktin adalah senyawa kompleks dari dua molekul yang berbeda, yang memperluas antara molekul satu dengan molekul yang lain pada profilin (komponen membran yang dapat merangsang ekspresi gen) (Chik *et al.*, 1996). Gen  $\beta$ -aktin merupakan salah satu gen yang dapat mentranskripsi kode, yang mana digunakan sebagai dasar induksi ekspresi gen (Linzer dan Nathans, 1983).



#### 2.4 Viral Nervous Necrosis (VNN)

Budidaya kerapu tikus tidak lepas dari faktor penyakit yang dapat menyerang dan menggagalkan hasil budidaya. Salah satu penyakit yang telah dilaporkan oleh para peneliti adalah *viral nervous necrosis* (VNN) yang dapat menyebabkan kematian massal pada ikan kerapu, terutama pada stadia larva dan juvenil. Di Indonesia kejadian penyakit VNN ditemukan pertama kali di daerah Banyuwangi pada budidaya kakap putih dan ikan kakap tersebut tampak lesu, berenang berputar dengan perut di permukaan dan sering muncul ke permukaan dengan berenang secara vertikal (Koesharyani *et al.*, 1999).

Gejala kilinis yang tampak pada ikan kakap tersebut memiliki kesamaan dengan gejala klinis ikan yang terinfeksi VNN. Penyakit VNN dapat menyerang otak sehingga menyebabkan ikan berenang berputar, mengambang di permukaan dengan perut menghadap ke atas dan pigmentasi warna yang lebih gelap pada ikan. Yoshikoshi dan Inoue (1990) menjelaskan, bahwa ikan yang terinfeksi virus penyebab VNN akan mengalami perubahan gerakan berenang dan warna tubuh yang menggelap dan berenang berputar di permukaan.

Pada umumnya, 3-5 hari setelah adanya gejala klinis ikan kerapu akan mati (Roza *et al.*, 2003). Infeksi virus penyebab VNN pada ikan yang dilakukan melalui injeksi intra muskular sangat cepat menyebar dan menginfeksi inang melalui saraf perifer yang ada di otot, masuk ke dalam sistem saraf pusat dan mata yang mengakibatkan ikan kehilangan keseimbangan dalam berenang dan disfungsi visual. Larva dan juvenil kerapu peka terserang VNN pada suhu 24,5°C-26°C yang merupakan suhu optimal dalam proses infeksi VNN dan dapat menyebabkan kematian pada umur 7-45 hari karena sistem saraf yang masih sederhana.



## 2.5 Fragmen Pigmen Protein (FPP)

Fragmen Pigmen Protein juga merupakan komponen penyusun *N. oculata*. FPP merupakan protein dan pigmen dalam bentuk RNA atau enzim. *N. oculata* memiliki beberapa jenis pigmen diantaranya *chlorophyll a*,  $\beta$ -*carotene*, *violaxanthin* dan *vaucherxan* tapi tidak mempunyai *chlorophyll b* (Cohen, 1999). Selain itu mikroalga ini juga memiliki kandungan *Violaxanthin Chlorophyll protein* (VCP) (Sukenik *et al.*, 1992 dan Basso *et al.*, 2014) dan *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) (Weis *et al.*, 2002).

Pigmen *violaxanthin* dan  $\beta$ -karoten termasuk jenis karotenoid, dimana secara umum karotenoid termasuk antioksidan yang kuat. Hal tersebut sesuai pendapat Arab *et al.*, (2001) dan Gross (1991), menyatakan beberapa manfaat dari senyawa yang tergolong karotenoid, adalah sebagai precursor vitamin A, antioksidan, peningkatan daya tahan tubuh, dan perubahan metabolisme kanker.

## 2.6 Mikroalga

Mikroalga merupakan kelompok tumbuhan berukuran renik yang termasuk dalam kelas alga, diameternya antara 3-30  $\mu\text{m}$ , baik sel tunggal maupun koloni yang hidup di seluruh wilayah perairan tawar maupun laut, yang lazim disebut fitoplankton. Di dunia mikrobial, mikroalga termasuk eukariotik, umumnya bersifat fotosintetik dengan pigmen fotosintetik hijau (klorofil), coklat (fikosantin), biru kehijauan (fikobilin), dan merah (fikoeritrin). Morfologi mikroalga berbentuk uniseluler atau multiseluler tetapi belum ada pembagian tugas yang jelas pada sel-sel komponennya. Hal itulah yang membedakan mikroalga dari tumbuhan tingkat tinggi (Romimohtarto, 2004). Dalam biomassa mikroalga terkandung bahan-bahan penting yang sangat bermanfaat, misalnya protein, karbohidrat, lemak dan asam



nukleat. Persentase keempat komponen tersebut bervariasi tergantung jenis alga (Becker, 1994).

Mikroalga memiliki berbagai potensi yang dapat dikembangkan sebagai sumber pakan, pangan, dan telah dimanfaatkan untuk berbagai macam keperluan mulai dari bidang perikanan sebagai makanan larva ikan, organisme penyaring, industri farmasi, dan suplemen makanan (Cresswell *et al.*, 1989 dan Renaud *et al.*, 1991).

### 2.6.1 *Nannochloropsis oculata*

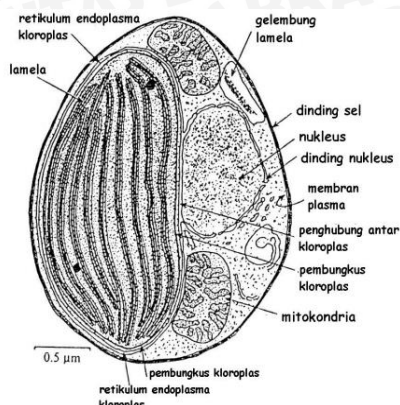
Hibberd (1981), menjelaskan bahwa klasifikasi *N. oculata* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Protista
Divisi	: Chromophyta
Class	: Eustigmathophyceae
Order	: Eustigmatales
Family	: Monodopsidaceae
Genus	: <i>Nannochloropsis</i>
Spesies	: <i>Nannochloropsis oculata</i>

### 2.6.2 Morfologi *N. oculata*

*N. oculata* merupakan sel berwarna kehijauan, tidak motil, dan tidak mempunyai flagel. Selnya berbentuk seperti bola berukuran sedang dengan diameter 2-4  $\mu\text{m}$ , tergantung spesiesnya, dengan kloroplas berbentuk cangkir (Hermanto *et al.*, 2011). Kloroplas dan nukleus *N. oculata* terlapis oleh membrane, kloroplas tersebut memiliki stigma (bintik mata) yang bersifat sensitif terhadap cahaya. Morfologi *N. oculata* ini dapat dilihat pada gambar 2.





**Gambar 2.** Morfologi *N. oculata* (Hoek *et al.*, 1998).

*N. oculata* memiliki nutrisi penting seperti *Eicosapentaenoic Acid* (EPA) sebesar 30,5%, Omega 3 HUFAs sebesar 42,7 %, kandungan lipid antara 31-68% berat kering dan kandungan protein sebesar 52,11% (Fulks dan Main, 1991; Kawaroe, 2008; Fachrullah, 2011). Selain itu Mohammady *et al.*, (2005), dalam penelitiannya menjelaskan bahwa mikroalga ini memiliki kandungan asam amino yang lengkap, terdapat pada tabel 1.

**Tabel 1.** Kandungan asam amino *N. oculata*

Jenis Asam Amino	Hasil
As. Aspartat	0,95
As. Glutamat	1,53
Serin	0,86
Histidin	0,62
Glisin	1,04
Threonin	nd*
Arginin	1,11
Alanin	2,32
Tirosin	0,38
Metionin	0,41
Valin	0,98
Fenilalanin	0,59
I-leusin	1,40
Leusin	1,73
Lisin	0,67
Prolin	3,52

Keterangan : nd\* : tidak terdeteksi



### 2.6.3 Sifat dan Ekologi *N. oculata*

*N. oculata* bersifat kosmopolit yang dapat tumbuh dimana-mana, kecuali pada tempat yang sangat kritis bagi kehidupan. Mikrolga ini tumbuh pada salinitas 0-35 ppt dengan suhu perairan berkisar 25-30 °C merupakan kisaran suhu yang optimal untuk pertumbuhan algae ini. *N. oculata* bereproduksi secara aseksual dengan pembelahan sel, tetapi juga dapat dengan permisahan autospora dari sel induknya (Isnansetyo dan Kurniastuti, 1995).

*N. oculata* dapat dikultur pada berbagai tempat seperti seperti *cool room*, *warm room*, *under the roof* dan yang terkena sinar matahari langsung dan dapat tumbuh secara optimal (Meritasari *et al.*, 2010).

### 2.7 Faktor – Faktor Yang Mempengaruhi Pertumbuhan *N. oculata*

Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan suatu jenis fitoplankton dapat dikelompokkan menjadi faktor internal dan faktor eksternal.

#### 2.7.1 Faktor internal

Faktor internal yang berpengaruh terhadap sifat-sifat pertumbuhan fitoplankton adalah faktor genetik (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995). Pertumbuhan mikroalga dalam media kultur dapat diamati dengan melihat pertambahan besar ukuran sel mikroalga atau dengan mengamati pertambahan jumlah sel dalam satuan tertentu. Cara kedua lebih sering digunakan untuk mengetahui pertumbuhan mikroalga dalam media kultur, yaitu dengan menghitung kelimpahan atau kepadatan sel mikroalga dari waktu ke waktu. Ada dua cara penghitungan kepadatan mikroalga yaitu menggunakan sedgwich rafter dan menggunakan haemocytometer. Penggunaan haemocytometer untuk menghitung kepadatan sel mikroalga lebih sering digunakan dibandingkan sedgwich rafter karena faktor kemudahannya.



Selama pertumbuhannya mikroalga dapat mengalami beberapa fase pertumbuhan (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995), yaitu:

### **1. Fase Lag (istirahat)**

Dimulai setelah penambahan inokulum ke dalam media kultur hingga beberapa saat sesudahnya. Pada fase ini peningkatan paling signifikan terlihat pada ukuran sel karena secara fisiologis mikroalga menjadi sangat aktif. Proses sintesis protein baru juga terjadi dalam fase ini. Metabolisme berjalan tetapi pembelahan sel belum terjadi sehingga kepadatan sel belum meningkat karena mikroalga masih beradaptasi dengan lingkungan barunya.

### **2. Fase Logaritmik (log) atau Eksponensial**

Fase ini dimulai dengan pembelahan sel dengan laju pertumbuhan yang meningkat secara intensif. Bila kondisi kultur optimum maka laju pertumbuhan pada fase ini dapat mencapai nilai maksimal dan pola laju pertumbuhan dapat digambarkan dengan kurva logaritmik. Pada fase ini merupakan fase terbaik untuk memanen mikroalga untuk keperluan pakan ikan atau industri.

### **3. Fase Penurunan Laju Pertumbuhan**

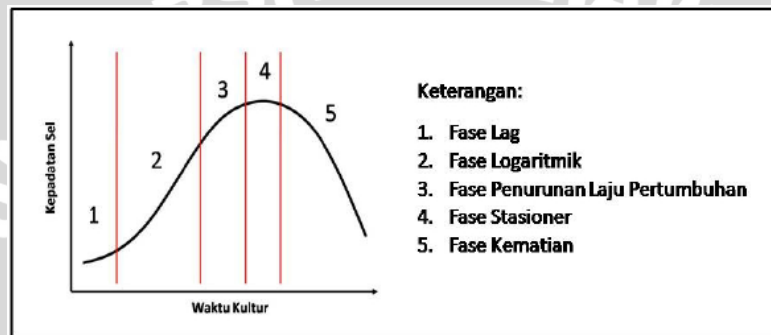
Pembelahan sel tetap terjadi pada fase ini, namun tidak seintensif fase sebelumnya, sehingga laju pertumbuhan juga mengalami penurunan dibandingkan fase sebelumnya.

### **4. Fase Stasioner**

Pada fase ini laju reproduksi dan laju kematian relatif sama. Penambahan dan pengurangan jumlah mikroalga seimbang sehingga kepadatannya relatif tetap (stasioner).

## 5. Fase Kematian

Fase ini ditandai dengan laju kematian yang lebih besar daripada laju reproduksi sehingga jumlah sel mengalami penurunan secara geometrik. Penurunan kepadatan sel fitoplankton ditandai dengan perubahan kondisi optimum yang dipengaruhi oleh temperatur, cahaya, pH medium, ketersediaan hara, dan beberapa faktor lain yang saling terkait satu sama lain. Secara skematis pola pertumbuhan mikroalga dapat dilihat pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Kurva pertumbuhan mikroalga (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995)

### 2.7.2 Faktor eksternal

Faktor eksternal berkaitan dengan ketersediaan unsur hara mikro dan makro serta kondisi lingkungan. Faktor-faktor lingkungan yang berpengaruh terhadap pertumbuhan fitoplankton antara lain cahaya, salinitas, suhu, kandungan  $O_2$ , kandungan  $CO_2$  dalam air, dan pH air (Taw, 1990).

- Suhu

Suhu merupakan parameter fisika yang mempengaruhi kehidupan organisme dan kualitas perairan. Secara tidak langsung, suhu akan mempengaruhi metabolisme, daya larut gas-gas termasuk oksigen serta berbagai reaksi kimia dalam perairan (Ghufran *et al.*, 2007). Secara umum, laju pertumbuhan meningkat sejalan dengan kenaikan suhu, dapat menyebabkan kematian bila peningkatan suhu sampai ekstrim. Tingginya suhu berkaitan dengan besarnya intensitas cahaya yang masuk kedalam perairan, intensitas cahaya yang

masuk menentukan derajat panas. Semakin banyak sinar matahari yang masuk, semakin tinggi suhu perairan. Untuk memenuhi kriteria pertumbuhan *N. oculata*, diperlukan suhu perairan pada kisaran 16-27 °C.

- Salinitas

Salinitas merupakan salah satu faktor yang sangat penting bagi kehidupan di air, terutama dalam mempertahankan keseimbangan osmotik antara protoplasma organisme dengan media air lingkungan. Salinitas optimum untuk pertumbuhan *N. oculata* berkisar antara 12-40 promil.

- Cahaya

Intensitas cahaya merupakan faktor abiotik utama yang sangat berpengaruh bagi pertumbuhan alga. Pertumbuhan fitoplankton sangat tergantung pada intensitas cahaya, panjang gelombang dan lamanya penyinaran. Ruang untuk kultur intensitas cahayanya berkisar antara 1000 sampai dengan 10000 lux.

- pH

*N. oculata* dapat hidup pada pH 7-9. pH yang tidak sesuai dengan habitatnya akan mengganggu pertumbuhan plankton tersebut. pH air mempengaruhi tingkat kesuburan perairan karena dapat mempengaruhi kehidupan jasad renik. pH akan mempengaruhi toksisitas semua senyawa kimia. Variasi pH dapat mempengaruhi metabolisme dan pertumbuhan fitoplankton dalam beberapa hal, antara lain mengubah keseimbangan dari karbonorganik, mengubah ketersediaan nutrisi dan dapat mempengaruhi fisiologi sel. Secara umum kisaran pH yang optimum pada kultur mikroalga antara 7-9 (Effendi, 2003).

## 2.8 Pemanfaatan Mikroalga *N. oculata*

Sebagian besar mikroalga hanya digunakan sebagai pakan alami dalam budidaya ikan. Selain itu, mikroalga juga dapat dimanfaatkan sebagai obat-obatan.



Pemanfaatan berbagai sumberdaya hayati sebagai upaya untuk mengurangi serangan virus juga sudah banyak dikembangkan untuk mencari alternatif dalam manajemen kesehatan ikan.

*N. oculata* merupakan salah satu mikroalga yang dimanfaatkan sebagai pakan alami pada budidaya ikan kerapu. Pemanfaatan *N. oculata* tidak hanya mampu mendukung pertumbuhan ikan, namun beberapa penelitian juga menyebutkan bahwa mikroalga *N. oculata* dapat digunakan dalam manajemen kesehatan ikan. Yanuhar (2012), menyatakan bahwa *N. oculata* dapat digunakan sebagai bahan antiviral yang dapat dibuktikan secara proteomik dan genomik dalam mengeliminasi virus RNA VNN sebagai penyebab kematian utama ikan kerapu.



### 3. MATERI DAN METODE

#### 3.1 Materi Penelitian

Materi yang digunakan dalam Penelitian ini adalah *Nannochloropsis oculata* yang telah dikultur dari Balai Budidaya Air Payau Situbondo. Mikroalga Laut *N. oculata* diisolasi *Fragmen Pigmen Protein (FPP)* yang digunakan untuk meningkatkan sistem imun sebagai pengembangan manajemen kesehatan ikan dengan memanfaatkan fitopharmako laut. Dan parameter pendukung meliputi kandungan protein pada *N. oculata* dan zat pigmen yang ada di dalamnya.

#### 3.2 Alat dan Bahan

##### 3.2.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada Penelitian ini antara lain : autoklaf, inkubator, timbangan analitik, tabung reaksi, cawan petri, magnetik stirrer, dissecting set, jarum ose, pembakar bunsen, pipet tetes, beaker glass, erlenmeyer, pH meter, DO meter, mortar, laminary air flow, sentrifuge suhu ruang, sentrifuge 4°C, eppendorf 1,5 ml, falcon 15 ml dan 50 ml, mikropipet 2, 20, 200, dan 1000, thermocycler, blue tip, yellow tip, white tip, seperangkat elektroforesis vertikal (SDS-PAGE), Deckglass, coverglass, nanodrop spektrofotometer, shaker inkubator, freezer -20 dan -80 °C, tabung nitrogen cair, refrigerator 4°C, mikro plate V-bottom, spuit 1 cc <sup>o</sup>X26G, sarung tangan karet (gloves), masker, aluminium foil, hot stirrer plate, aquarium, heater, seperangkat aerasi, baki/nampan.

##### 3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sebagai berikut; *Tryptic Soy Agar (TSA)*, poliakrilamide, *phosphate Buffer Saline (PBS)*, separating gel 12,5 % dan stacking gel 4%, running buffer, staining (*Commassie Brilliant Blue*) dan destaining (methanol: asam asetat glasial aquades 1:2:7), *Reduction Sample Buffer (RSB)*, *Ethylendiamine tetra-acetate (EDTA)*, nitrocelulosa (membran

selovan) dan larutan PBS, aquades, alkohol 70%, Sukrosa, DTT (*dithiotreitol*), Tris-HCl, aquabidest, es batu, Bradford konsentrat, NaCl 0,9%, ethanol, buffer phospat, buffer ekstrak, PBS Tween, PBS skim, larutan NOG 0,005%, larutan pouncou, Marker (PRO-STAIN™ Prestained).

### 3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif dan eksperimental. Surakhmad (1998) mengatakan bahwa, metode deskriptif adalah sebuah metode yang menggambarkan keadaan atau kejadian disuatu daerah tertentu. Pelaksanaan metode deskriptif tidak terbatas pada pengumpulan dan penyusunan data, tetapi meliputi analisis dan pembahasan tentang data tersebut, sehingga diharapkan dapat memberikan gambaran secara umum, sistematis aktual dan valid mengenai fakta dan sifat-sifat populasi daerah tersebut. Teknik pengambilan atau pengumpulan data dilakukan observasi langsung dengan pengamatan langsung (Natzir, 1998).

#### 3.3.1 Teknik Pengambilan Data

Pengambilan data dalam penelitian ini dilakukan dengan mengambil dua macam data yaitu data primer dan data sekunder.

##### a. Data Primer

Data primer adalah data asli yang dikumpulkan oleh peneliti untuk menjawab masalah penelitiannya secara khusus. Data ini tidak tersedia karena memang belum ada riset sejenis yang pernah dilakukan atau hasil riset yang sejenis kadaluwarsa. Jadi, peneliti perlu melakukan pengumpulan atau pengadaan data sendiri karena tidak bisa mengandalkan data dari sumber lain. Dalam riset pemasaran, data primer diperoleh secara langsung dari narasumbernya, sehingga peneliti merupakan “tangan pertama” yang memperoleh data tersebut (Istijanto, 2005).



- Metode Survey

Informasi diperoleh melalui permintaan keterangan-keterangan kepada pihak yang memberikan keterangan atau jawaban (responden). Metode ini bergantung pada kerja sama dan kecakapan responden sebagai faktor yang dapat mempengaruhi proses survey, sehingga kemungkinan terjadi kesalahan sangat besar. Tetapi sering kali opini yang muncul mungkin sangat penting dalam pemecahan masalah.

- Metode Observasi

Metode observasi dilakukan dengan melakukan pengamatan dan pencatatan secara sistematis terhadap gejala/fenomena yang diselidiki. Catatan yang dikumpulkan lebih teliti, tetapi terbatas pada gejala sejenis. Seringkali metode ini menggunakan bantuan alat-alat pemotret, alat perekam suara, pencatat kecepatan dan sebagainya.

- Metode Eksperimen

Diperlukan untuk menguji kesimpulan-kesimpulan yang diperoleh dari penelitian dengan metode survey dan observasi. Dari hasil kesimpulan sementara atau usul pemecahan masalah, dilakukan percobaan-percobaan apakah memberikan jawaban seperti apa yang dikemukakan pada metode survey. Pada metode ini, peneliti dapat mengatur atau memberikan perlakuan tertentu pada suatu variabel.

### **b. Data Sekunder**

Data sekunder adalah data yang sudah ada. Data tersebut sudah cukup dikumpulkan sebelumnya untuk tujuan-tujuan yang tidak mendesak. Keuntungan dari data sekunder adalah tersedia, ekonomis dan cepat didapat. Kelemahan data sekunder ialah tidak dapat menjawab secara keseluruhan masalah yang sedang diteliti. Kelemahan lainnya yaitu, kurangnya akurasi karena data sekunder dikumpulkan oleh orang lain untuk tujuan tertentu dan



menggunakan metode yang tidak diketahui (Soegoto, 2008). Data sekunder dalam penelitian ini didapatkan dari jurnal, majalah, internet, buku-buku serta instansi pemerintahan yang terkait guna menunjang keberhasilan penelitian.

### 3.4 Desain Penelitian

Untuk melihat pengaruh pemberian Fragmen Pigmen Protein (FPP) pada ikan Kerapu Tikus, pada penelitian ini dilakukan 3 perlakuan dan 1 kontrol:

- Ikan kontrol merupakan ikan kerapu normal yang dipelihara dengan pemberian pakan normal (tidak ada pemberian FPP maupun penginfeksi virus).
- Perlakuan 1 (ikan + FPP) : ikan Kerapu Tikus yang diberi pakan dan diberi perlakuan dengan pemberian FPP dengan dosis yang disesuaikan dengan berat badan (lampiran 2), pemberian FPP dilakukan pada hari ke-1, ke-5, ke-9, ke-14, ke-19, dan ke-24.
- Perlakuan 2 (ikan + VNN) : ikan Kerapu Tikus yang diberi perlakuan dengan penginfeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN) dengan dosis yang disesuaikan dengan berat badan, penginfeksi dilakukan dengan memberikan pakan yang dicampur dengan daging ikan positif VNN.
- Perlakuan 3 (ikan + FPP + VNN) : ikan Kerapu Tikus yang diberi perlakuan dengan FPP pada hari ke-1, ke-5, ke-9, ke-14, ke-19, dan ke-24. Selain itu, dilakukan juga penginfeksi VNN pada hari ke-14, ke-19, dan ke-24.

Denah percobaan penelitian ini digunakan untuk menentukan rancangan penelitian, yang dapat dilihat pada tabel 2.

**Tabel 2.** Denah percobaan penelitian

F2	FV3	F2	V1
FV1	V3	FV2	K1
F1	K2	K3	V2

Keterangan : K = Kontrol  
 F = Perlakuan Pemberia FPP  
 V = Perlakuan Pemberia VNN  
 FV = Perlakuan Pemberia FPP+VNN

### 3.5 Prosedur Penelitian

Sebelum pelaksanaan pengamatan tentang Uji Fragmen Pigmen Protein makroalga laut (*N. oculata*), langkah awal yang perlu dilakukan yaitu sebagai berikut :

#### 3.5.1 Sterilisasi Alat

Sterilisasi dilakukan tidak hanya pada alat tetapi dilakukan juga pada bahan, Alat yang digunakan adalah autoklaf.

Langkah-langkah yang dilakukan pada sterilisasi ini antara lain :

- Alat dan bahan yang akan disterilisasi dibungkus dengan menggunakan kertas perkamen atau kertas koran, kemudian diikat dengan menggunakan benang,
- Air secukupnya dituang ke dalam autoklaf, kemudian alat yang telah dibungkus kertas perkamen dimasukkan ke dalam autoklaf dan ditutup rapat dengan mengencangkan baut secara silang,
- Kompor pemanas dinyalakan, setelah beberapa saat manometer akan menunjukkan angka 1 atm, jika terjadi kelebihan tekanan buka kran udara hingga manometer menunjukkan angka 1 atm kembali,



- Keadaan tekanan uap jenuh dapat terjadi berulang kali sampai suhu 121°C dan manometer menunjukkan 1 atm, keadaan ini dipertahankan  $\pm$  15 menit,
- Kompor dimatikan dan ditunggu beberapa saat sampai termometer dan manometer menunjukkan angka 0 (nol), kemudian buka kran uap lalu buka penutup autoclave dengan cara zig-zag,
- Alat dan bahan yang sudah disterilkan diambil dan disimpan.

### 3.5.2 Proses Isolasi Protein (FPP) *N. oculata*

Cara mendapatkan protein murni yaitu dengan mengeluarkan protein dari bahan alam *N. oculata*. Pada umumnya hal ini juga dilakukan dengan jalan memecahkan sel-sel jaringan secara mekanik, misalnya dengan jalan menghancurkan dan melumatkannya dalam suatu alat tertentu seperti menggunakan mortar dan alu. Apabila telah hancur atau lumat, campuran beberapa jenis protein dapat diperoleh dengan jalan melarutkannya dalam air atau pelarut lain (Poedjiadi, 1994). Isolasi protein dapat dilakukan dalam keadaan dingin hal ini karena pada suhu 40°C protein mudah terdenaturasi maka pemurnian protein sering dilakukan pada suhu rendah yaitu mendekati titik beku pelarut yang digunakan (Poedjiadi, 1994).

Sebelum dilakukan isolasi FPP, mikroalga *N. oculata* disaring menggunakan kertas saring, selanjutnya disentrifuge dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit untuk memisahkan mikroalga dengan air. Metode ini mengacu pada Yanuhar (2013), *N. oculata* yang sudah disaring dalam bentuk pasta sebanyak 20 gr, diletakkan di mortar dan digerus selama 1 jam, kemudian ditambahkan nitrogen cair dan digerus lagi selama 30 menit sampai satu jam. Larutan glisin ditambahkan sampai 8 ml. Hasil penggerusan dimasukan dalam ependof 1,5 ml, kemudian disentrifuse dingin dengan kecepatan 12000 rpm

selama 10 menit pada suhu 4 °C. Supernatan diambil dan diletakkan pada ependorf steril.

Hasil proses isolasi dimurnikan pada tahap dialisa. Molekul terlarut yang lebih kecil dari pori-pori membran tersebut dapat keluar, sedangkan molekul lainnya yang lebih besar akan tertahan di dalam kantung membran. Untuk proses ini digunakan selofan sebagai membran, yang terbuat dari materi selulose.

Kantong selofan distrerilkan dengan cara direbus bersama larutan Tris EDTA selama 10 menit sebelum digunakan. Setelah siap jepit selofan dengan Tube dan dimasukkan sampel kedalam kantong hingga penuh dan ditutup kembali dengan tube secara rapat. Kantong tersebut direndam pada Tris HCl, dengan distirer serta suhu dijaga 4 °C. Proses dialisa dilakukan selama 2 kali 24 jam. Hasil dialisa difilter dengan disposable filter dan dimasukkan dalam botol valcon steril.

### 3.5.3 Elektroforesis Protein dengan Metode SDS-PAGE

Fatchiyah, *et al.* (2011), menyatakan prosedur Elektroforesis protein dengan SDS-Page adalah sebagai berikut:

#### A. Menyiapkan sampel

- Tambahkan sampel bufer ke dalam sampel protein (perbandingan 1 : 1) dalam tabung Eppendorf.
- Panaskan sampel pada suhu 100°C selama 5 menit.
- Setelah dingin, simpan pada suhu 20°C bila sampel tidak langsung dipakai.

#### B. Pembuatan Media/gel elektroforesis SDS-PAGE

Adapun langkah-langkah dalam pembuatan media/gel untuk elektroforesis SDS adalah sebagai berikut:

Susun plate pembentuk gel.

- Buat separating gel 12,5%. Dengan cara:
  1. Siapkan tabung polipropilen 50ml.



2. Masukkan 3,125 ml stok akrilamida dalam tabung.
3. Masukkan 2,75 ml 1M Tris pH 8,8. Tabung di tutup, lalu tabung digoyang secara perlahan.
4. Masukkan aquabides 1,505 ml. Tabung ditutup, lalu tabung digoyang secara perlahan.
5. Masukkan 75  $\mu$ l SDS 10%. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan.
6. Masukkan 75  $\mu$ l APS 10%. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan.
7. Masukkan 6,25  $\mu$ l TEMED. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan.

- Segera tuang larutan kedalam plate pembentuk gel menggunakan mikropipet 1 ml (jaga jangan sampai terbentuk gelembung udara) sampai batas yang terdapat pada plate.
- Secara perlahan, tambahkan aquades di atas larutan gel dalam plate agar permukaan gel tidak bergelombang.
- Biarkan gel memadat selama kurang lebih 30 menit (ditandai dengan terbentuknya garis transparan diantara batas air dan gel yang terbentuk). Setelah itu buang air yang menutup separating gel.
- Sesudah separating gel memadat, siapkan stacking gel 3%. Dengan cara:

1. Siapkan tabung polipropilen 50ml.
2. Masukkan 0,45 ml stok akrilamida dalam tabung.
3. Masukkan 0,38 ml 1M Tris pH 6,8. Tabung ditutup, lalu digoyang-goyang secara perlahan
4. Masukkan aquabides 2,11 ml. Tabung ditutup, lalu digoyang-goyang secara perlahan



5. Masukkan 30  $\mu$ l SDS 10%. Tabung ditutup, lalu digoyang-goyang secara perlahan
6. Masukkan 5  $\mu$ l TEMED. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan.

### C. Running Elektroforesis Sodium Dodesil Poliakrilamid (SDS-PAGE)

Tahapan proses SDS-PAGE ini, diantaranya:

- Masukkan plate yang sudah berisi gel ke dalam chamber elektroforesis.
- Tuang running buffer sampai bagian atas dan bawah gel terendam.
- Bila terbentuk gelembung udara pada dasar gel atau diantara sumur sampel, maka gelembung tersebut harus dihilangkan.
- Masukkan sampel sebanyak 10-20  $\mu$ l (yang kandungan proteinnya minimal 0,1 g dan maksimal 20-40 g) secara hati-hati ke dalam dasar sumur gel menggunakan Syringe Hamilton.
- Bilas syringe sampai 3x dengan air atau dengan running buffer sebelum dipakai untuk memasukkan sampel yang berbeda pada sumur gel berikutnya.

### D. Running Sampel

- Tahap awal untuk memulai running, hubungkan perangkat elektroforesis dengan sumber listrik.
- Lakukan running pada arus konstan 20 mA selama kurang lebih 40-50 menit atau sampai tracking dye mencapai jarak 0,5 cm dari dasar gel.
- Setelah selesai, tuang running buffer dan ambil gel dari plate.

### E. Pewarnaan (Staining) Media/Gel Hasil *Elektroforesis Sodium Dodesil Poliakrilamid (SDS-PAGE)*

#### 1. Pewarnaan Commasie Brilliant Blue

- Tahap ini diperlukan larutan staining untuk mewarnai protein pada gel dan larutan destaining untuk menghilangkan warna pada gel dan memperjelas pita protein yang terbentuk.

Larutan staining 1 liter terdiri dari:

- Coomassie Blue R-250 : 1,0 g
- Metanol : 450 ml
- Aquades : 450 ml
- Asam asetat glasial : 100 ml

Larutan destaining 1 liter terdiri dari:

- Metanol : 100 ml
  - Asam asetat glasial : 100 ml
- Rendam gel dalam 20 ml staining solution sambil digoyang selama kurang lebih 15 menit. Setelah itu, tuang kembali larutan staining pada wadahnya.
  - Cuci dengan air beberapa kali. Setelah itu, rendam gel dalam larutan 50 ml destaining solution sambil digoyang selama kurang lebih 30 menit atau sampai pita protein terlihat jelas.

## 2. Pewarnaan Perak Nitrat (Silver Stain)

Prosedur untuk melakukan pewarnaan perak nitrat (silver stain) adalah :

- Rendam gel dalam larutan fiksasi selama 30 menit.
- Larutan fiksasi di tuang dan gel kemudian direndam dalam larutan sensitizing selama 30 menit.
- Selanjutnya gel di cuci dengan cara direndam dalam aquades selama 5 menit dan dilakukan sebanyak tiga kali.
- Gel direndam dalam pereaksi perak.
- Gel dicuci dengan cara direndam dalam aquades selama 2 menit dan dilakukan sebanyak satu kali.

- Selanjutnya gel direndam dalam larutan developing selama 30 detik sampai 5 menit. Perendaman harus segera dihentikan bila gel sudah mulai menjadi berwarna gelap.
- Reaksi yang berlangsung pada tahap 7 dihentikan dengan cara merendam gel dalam larutan stopping selama 10 menit.
- Gel dicuci dengan cara direndam dalam aquades selama 5 menit dan dilakukan sebanyak tiga kali.
- Gel direndam dalam larutan pengawet selama 30 menit dan dilakukan sebanyak 2 kali dan gel siap diamati.

#### 3.5.4 Pengukuran Berat Molekul Protein sampel

- Mengambil setiap sampel protein dan amati terlebih dahulu berapa jumlah pita protein yang terlihat, kemudian tentukan nilai  $R_f$  masing-masing pita protein dari setiap sampel
- Dari setiap nilai  $R_f$  yang diperoleh, hitung berat molekulnya dengan bantuan persamaan garis linear dari kurva standar berat molekul.
- Catat hasil yang di peroleh dalam tabel.

#### 3.5.5 Syarat Hewan Uji

Menurut Sulaksono *et al* (1986), dalam penggunaan hewan percobaan di samping mutu harus baik, juga pengadaannya harus mudah dan siap setiap saat saat diperlukan, dengan demikian tidak terjadi kendala dalam merencanakan suatu percobaan. Sedangkan Pikturalistik (2013) menjelaskan bahwa salah satu organisme akuatik yang dapat digunakan sebagai bioindikator adalah ikan, perubahan anatomis dan fisiologis yang dialami dapat mengindikasikan adanya penyakit karena rentan terhadap penyakit sehingga direkomendasikan sebagai hewan uji. hal ini disebabkan ikan tersebut memenuhi persyaratan yaitu penyebarannya yang cukup luas, memiliki nilai ekonomis yang tinggi dan mudah dipelihara di laboratorium.



### 3.5.6 Aklimatisasi Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*)

Ikan uji yang digunakan yaitu ikan kerapu tikus. Ikan kerapu tikus yang digunakan berukuran antara 13-15 cm. Sumber data Laporan Penelitian Unggulan PT-BOPTN Yanuhar (2013), mengatakan bahwa benih ikan kerapu tikus yang baru datang tidak langsung diberikan pakan, karena memerlukan adaptasi terhadap media pemeliharaannya yang baru. Lalu ikan dipuasakan terlebih dahulu agar nafsu makannya terjaga. Pakan diberikan setelah ikan terlihat sehat dan agresif. Pakan yang digunakan berupa ikan kembung segar yang dicacah hingga ukurannya kecil disesuaikan dengan bukaan mulut ikan. Pemberian pakan dilakukan 2-3 hari setelah ikan pertama kali di masukkan di aquarium. Pakan diberikan secara *adlibitum* yaitu pemberian pakan sedikit demi sedikit sampai ikan kenyang.

Tujuan dari pemberian pakan secara *adlibitum* untuk menghindari adanya pengendapan sisa pakan yang tidak dimakan pada dasar aquarium sehingga mengakibatkan aquarium akan mengalami penurunan kualitas air utamanya oksigen terlarut. Pemberian pakan dilakukan pada jam 08.00 dan 15.00 WIB.

### 3.5.7 Parameter Kualitas Air

#### a. Parameter fisika air

Parameter fisika air yang diukur dalam penelitian ini antara lain :

##### 1. Suhu

Rahayu, (2009), menjelaskan alat yang digunakan dalam pengukuran suhu air adalah termometer standar. Langkah dalam pengukuran suhu adalah:

- Catat suhu udara sebelum mengukur suhu di dalam air.
- Masukkan termometer ke dalam air selama 1-2 menit.
- Baca suhu saat termometer masih di dalam air atau secepatnya setelah dikeluarkan dari dalam air.

## 2. Salinitas

Kordi (2005), menjelaskan pengukuran salinitas dilakukan dengan menggunakan alat refraktometer, adapun cara pengukuran salinitas adalah:

- Mengangkat penutup kaca prisma
- Meletakkan 1-2 tetes air yang akan diukur
- Menutup kembali dengan hati-hati agar jangan sampai terjadi gelembung udara dipermukaan kaca prisma
- Melihat kaca pengintai dan akan terlihat pada lensa nilai atau salinitas dari air yang sedang diukur
- Membersihkan permukaan prisma setelah selesai digunakan
- Melihat nilai salinitasnya dari air yang diukur melalui kaca pengintai.

### b. Parameter Kimia Air

Parameter kimia air yang diukur dalam penelitian ini antara lain :

#### 1. Derajat Keasaman (pH)

Jeffries dan Mills dalam Hartanti, (2008) menjelaskan pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan alat pH meter, adapun cara pengukuran pH adalah:

- Menstandarkan alat ukur (pH meter)
- Membilas elektroda (sensor) dengan aquades lalu mengeringkannya dengan menggunakan *tissue*
- Memasukkan ujung elektroda ke dalam perairan
- Mencatat nilai yang tertera pada alat

#### 2. *Disolved Oxygen* (DO) / Oksigen Terlarut

Salmin, (2005), menjelaskan cara penentuan oksigen terlarut dengan metode elektrokimia adalah langsung untuk menentukan oksigen terlarut dengan alat DO meter prinsip kerjanya adalah:



- Menggunakan probe oksigen yang terdiri dari katoda dan anoda yang direndam dalam larutan elektrolit. Pada alat DO meter, probe ini biasanya menggunakan katode perak (Ag) dan anoda timbal (Pb) secara keseluruhan, elektroda ini dilapisi dengan membran plastik yang bersifat semi permeabel terhadap oksigen
- Probe yang menggunakan katoda perak (Ag) dan anoda timbal (Pb) dimasukkan kedalam sampel air
- Ditunggu hasil yang ditunjukkan pada DO meter beserta nilai suhu yang ada.

### 3.5.8 Uji In-vivo FPP Pada Ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*)

Dalam penelitian ini dilakukan perlakuan in-vivo FPP dari mikroalga laut *N. oculata* pada ikan Kerapu Tikus. Proses pengujian dilakukan secara oral (metode sonde) mengacu pada Yanuhar (2009) sebanyak 6 kali yang berfungsi sebagai imunostimulator pada sistem imun ikan. Isolat FPP yang didapatkan melalui proses isolasi selanjutnya diujikan pada ikan Kerapu Tikus masing-masing pada hari pertama pemberian pakan (hari ke-0) sebesar 306  $\mu$ l, pada hari ke-6 sebesar 315  $\mu$ l, pada hari ke-9 sebesar 322  $\mu$ l, hari ke-14 sebesar 326  $\mu$ l, hari ke-19 sebesar 345  $\mu$ l dan pada hari ke-24 sebesar 351  $\mu$ l.

### 3.5.9 Imunohistochemistry (IHC)

Prosedur IHC mengacu pada metode Yanuhar (2011), yaitu :

- Dilakukan preparasi jaringan organ yang dipapar imunogenik
- Dilakukan deparafinasi preparat dengan xilol 20  $\mu$ m selama  $\pm$  5 menit
- Dilakukan dehidrasi dengan alkohol absolut sebanyak 2 kali ulangan pada konsentrasi 90%, 80% dan 70% masing-masing selama 5 menit
- Dibilas preparasi dengan dionize water 20  $\mu$ m sebanyak 3 kali ulangan, masing-masing 5 menit
- Disimpan preparasi dalam refrigerator (overnight)



- Dibilas preparat dengan PBS pH 7,4 20  $\mu$ msebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit
- Diinkubasi preparat dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% selama 10 menit
- Blocking unspesifik protein dan inkubasi dalam 5% PBS dengan 1-2% BSA
- Disiapkan antibodi primer, yaitu anti MHC I yang dilarutkan dalam larutan blotto dengan perbandingan 1:1000
- Dicuci dengan antibodi primer anti MHC I (1:1000) overnight 4°C
- Preparat ditetesi dengan antibodi anti MHC I dan diinkubasi overnight 4°C
- Preparat kemudian dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing 5menit
- Dikeringkan kembali sisa-sisa PBS yang masih menempel dan siapkan antibodi sekunder, yaitu anti MHC I anti grouper yang dilarutkan dalam larutan blotto dengan perbandingan 1 : 200
- Preparat ditetesi dengan larutan antibodi sekunder anti MHC I anti grouper dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang
- Preparat kembali dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, selama 5 menit
- Dikeringkan kembali sisa-sisa PBS yang masih menempel
- Diinkubasi dalam SA-HRP dengan perbandingan 1 : 500 selama 40 menit
- Preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit
- Menggunakan kromagen DAB selama 20 menit
- Preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit



- Diberikan counterstain dengan majer *hemotoxilenselama* 10 menit
- Dibilas preparat dengan DH<sub>2</sub>O sebanyak 3 kali ulangan masing-masing selama 5 menit
- Dikeringkan preparat dengan cara diangin-anginkan
- Diamati preparat hasil pewarnaan IHC dibawah mikroskop okuler dengan perbesaran 40x
- Diambil gambar hasil IHC dengan menggunakan *olympusdigital camera*
- Hasil

### 3.6.0. Analisis Data

Analisa data pada penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 3 kali pengulangan. Langkah awal adalah menghitung prosentase DAB  $\beta$ -aktin pada setiap perlakuan. Selanjutnya data dianalisa dengan menggunakan cara statistik yaitu analisa keragaman (ANOVA), dengan tujuan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan pemberian perlakuan. Apabila dari analisa keragaman (sidik ragam) diketahui bahwa perlakuan menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata atau sangat berbeda nyata, maka untuk membandingkan nilai dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT), untuk mengetahui perlakuan yang mana yang berbeda. Model persamaan RAL adalah sebagai berikut:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{(ij)k}$$

Keterangan :  $Y_{ijk}$  = respon perlakuan ke-I serta ulangan ke-j

I = perlakuan

J = Ulangan

$\mu$  = nilai rata-rata umum

$\tau_i$  = Pengaruh dari perlakuan ke-i

$\varepsilon_{(ij)k}$  = galat atau kesalahan percobaan untuk perlakuan ke-i

Langkah selanjutnya, data yang diperoleh dari penelitian diuji menggunakan analisa sidik ragam. Tabel analisa sidik ragam untuk desain eksperimen tersarang disajikan pada tabel 3 sebagai berikut :

**Tabel 3. Analisa sidik ragam**

Perlakuan	Ulangan			total	Rata-rata
	1	2	3		
Penambahan FPP	F1	F2	F3	TF	TF/3
Penambahan VNN	V1	V2	V3	TV	TV/3
Penambahan FPP+VNN	FV1	FV2	FV3	TFV	TFV/3
kontrol	K1	K2	K3	TK	TK/3
Total				T	

Keterangan = 1,2,dan 3 adalah ulangan (r)

K, F, V, dan FV adalah perlakuan (t)

Dari data diatas maka dapat dihitung nilai dari :

$$\text{Faktor Koreksi} = Y_{ij}^2/r.t$$

$$\text{Jk Total} = \sum(y_{ij})^2 - \text{FK}$$

$$\text{JK Perlakuan} = (\sum (\sum y_{ij})^2)/r - \text{FK}$$

$$\text{JK Galat} = \text{JK Total} - \text{JK Perlakuan}$$

Berdasarkan perhitungan diatas, selanjutnya dapat dilakukan analisa keragaman untuk mengetahui pengaruh perlakuan. Adapun uraian analisa keragaman dapat dilihat pada tabel 4 sebagai berikut:

**Tabel 4. Analysis of varian (ANOVA)**

SK	DB	JK	KT	Fhit	Ftabel
					5% tabel
Perlakuan	t-1	JKP	JKP/DBP	KTP/KTG	
Galat	t (r-1)	JKG	JKG/DBG		
Total	$\sum n-1$	JKT			

- Jika F hit > F tabel 5% maka perlakuan berbeda nyata
- Jika F hit < F tabel 5% maka tidak berbeda nyata





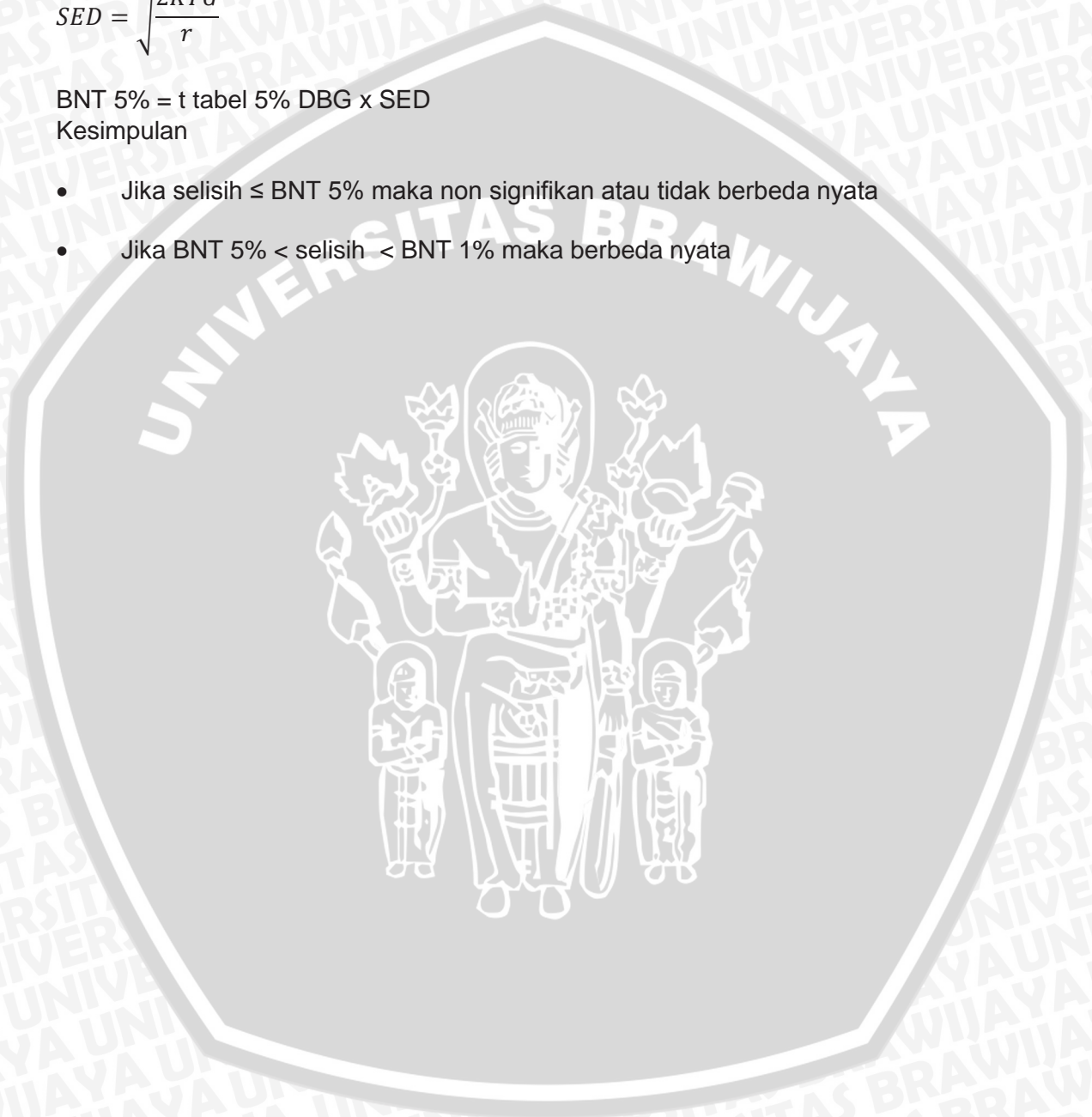
Apabila sidik ragam diperoleh hasil berbeda nyata atau berbeda sangat nyata, maka harus dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dari masing-masing perlakuan. Rumus perhitungan uji BNT sebagai berikut :

$$SED = \sqrt{\frac{2KTG}{r}}$$

BNT 5% = t tabel 5% DBG x SED

Kesimpulan

- Jika selisih  $\leq$  BNT 5% maka non signifikan atau tidak berbeda nyata
- Jika BNT 5% < selisih < BNT 1% maka berbeda nyata



## 4. PEMBAHASAN

### 4.1 Kultur Mikroalga *Nannochloropsis oculata*

Kultur mikroalga ini dilakukan di BBAP Situbondo Jawa Timur. Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah fitoplankton jenis *N. oculata*. Medium air laut disaring menggunakan *catridge filter* dan *pure filter* kemudian dialirkan menggunakan pipa besar yang bermuara pada tandon air yang diberi blower.

Terdapat beberapa tahapan dalam proses kultur mikroalga, diantaranya tahap inokulasi dan kultur murni. Kultur murni dibagi menjadi dua yaitu kultur murni 1 dan kultur murni 2. Selanjutnya kultur intermediette atau semi massal, dan yang terakhir kultur massal.

#### 4.1.1 Kultur Murni

##### a. Inokulasi/Media Agar

Inokulasi merupakan tahap awal pada kultur mikroalga. Pada tahapan ini dilakukan pembuatan media agar yang dilengkapi dengan larutan nutrien, larutan trace element, dan vitamin. Media nutrien tersebut mengandung bahan-bahan kimia yang digunakan untuk sintesis protoplasma pada proses kulturnya. Setelah pembuatan inokulasi, selanjutnya dilakukan perhitungan kepadatan pada hari kedua sampai hari ketujuh.



**Gambar 4.** Tahap inokulasi (Dokumentasi Pribadi, 2015).

### b. Kultur Murni 1

Kultur murni 1 merupakan lanjutan dari tahap awal atau inokulasi. Pada kultur murni 1 harus menyiapkan media steril, selanjutnya memindahkan hasil inokulasi ke dalam erlenmeyer atau toples yang berisi media yang sudah ada aerasinya.



**Gambar 5.** Kultur murni 1 (Dokumentasi Pribadi, 2015).

### c. Kultur Murni 2

Kultur murni 2 adalah lanjutan dari kultur murni 1. Pada tahap kultur murni 2 ini pertama dilakukan pengecekan air atau media (netral atau tidak) menggunakan clorin test, setelah itu pemberian pupuk walne dan vitamin. Selanjutnya memindahkan hasil kultur pada erlenmeyer ke dalam toples 10 liter yang sudah tersedia pupuk dan vitaminnya.



**Gambar 6.** Kultur murni 2 pada toples 10 L (Dokumentasi Pribadi 2015).

Rostini, (2007) menyatakan bahwa dalam kultur fitoplankton ada dua tujuan, ialah monokultur dan kultur murni. Bila hendak mengkultur fitoplankton sebagai makanan zooplankter cukuplah membuat monokultur, misalnya sebagai makanan untuk *Brachionusplicatilis*, yang hidup di air payau. Tetapi bila mengkultur fitoplankter untuk keperluan genetika, fisiologi atau siklus hidup harus



mengkultur fitoplankter yang bersangkutan secara murni, artinya tanpa adanya bakteri.

#### 4.1.2 Kultur Semi Massal (intermedietete)

Proses kultur semi masal ini termasuk dalam skala sedang antara 0.5-1 ton. Kultur semi masal dilakukan pada ruang semi terbuka, yakni terdapat atap namun cahaya matahari masih bisa menembus kedalam ruangan. Pada tempat ini suhu ruangan berkisar antara 30-31°C.



**Gambar 7.** Kultur semi massal (Dokumentasi Pribadi, 2015).

#### 4.1.3 Kultur Massal

Setelah kultur murni dan semi massal dilakukan, tahapan selanjutnya yaitu kultur massal. Pada kultur massal ini masuk dalam skala besar yaitu lebih dari 2 ton. Kultur ini terletak pada tempat terbuka. Bibit yang diperlukan pada kultur massal ini 20% dari volume total.

#### 4.2 Kandungan Nutrien Pada Pertumbuhan Mikroalga

Mikroalga akan tumbuh jika kandungan nutriennya tercukupi, karena nutrien ini merupakan faktor utama penentu pertumbuhannya. Pada mikroalga *N. oculata*, dalam pertumbuhannya selain membutuhkan cahaya matahari untuk fotosintesis, alga ini juga membutuhkan pupuk. Pupuk yang secara umum digunakan untuk pertumbuhan mikroalga yakni pupuk walne karena komposisinya lengkap. Isnasetyo dan kurniastuti (1995), menambahkan komposisi pupuk walne yaitu terdapat pada tabel 5.

**Tabel 5.** Komposisi pupuk walne

Komposisi	Ukuran
NaNO <sub>3</sub>	100 gr
Na <sub>2</sub> EDTA	45 gr
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	33,60 gr
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	20,00 gr
FeCl <sub>3</sub> .6 H <sub>2</sub> O	1,30 gr
MnCl <sub>2</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	0,36 gr
Stok Larutan Vitamin	100 ml
Stok Larutan Logam Mikro	1,00 ml
Aquades	1000 ml
Penggunaan	1,00 ml/l

Selain pupuk sebagai komponen utama dalam pertumbuhan, mikroalga *N. oculata* juga memerlukan vitamin untuk pertumbuhannya. Vitamin yang biasa digunakan untuk pertumbuhan alga adalah vitamin B. Jadi pupuk dan vitamin harus tersedia untuk pertumbuhan dan pembentukan protein.

#### 4.3 Isolasi FPP *N. oculata*

Proses isolasi FPP *N. oculata* diperoleh dari 2 ton hasil kultur semi massal. Hasil kultur 2 ton berat basah tersebut disaring menggunakan kertas saring untuk menghilangkan kadar airnya, selanjutnya dilakukan sentrifuge 3500 rpm selama 10 menit dengan tujuan untuk mendapatkan berat padat. Hasil berat padat dari 2 ton saringan dan sentrifuge ialah 20 falcon dengan isi 50 ml setiap falconnya. Setelah itu isolasi mikroalga *N. oculata*, proses isolasi ini mengacu pada Laporan Penelitian Unggulan PT-BOPTN Yanuhar (2013) dan mengacu pada metode Yanuhar (2015). Sebelum perlakuan isolasi tahapan awal yaitu menimbang 20 gr *N. oculata*. Mikroalga yang sudah ditimbang dimasukkan mortar untuk diberi nitrogen cair dan dilakukan pemecahan sel dengan penggerusan.

Selama penggerusan ditambahkan larutan glisin 9 ml secara bertahap, tujuannya untuk membantu pemecahan sel. Penggerusan ini dilakukan selama ± 2 jam. Dalam proses ini harus dikerjakan secara maksimal, tujuannya untuk mempercepat pemecahan sel. Pemecahan sel tersebut dapat ditandai dengan



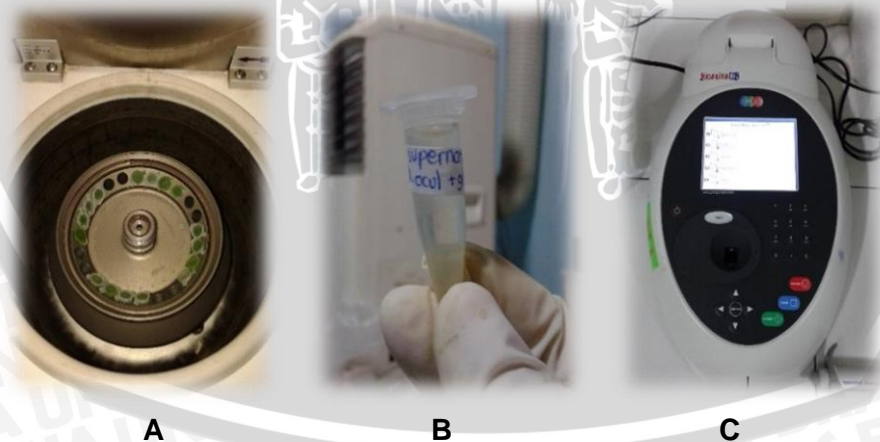
repository.ub.ac.id

hasil gerusan yang berbau seperti pandan, dan hasil supernatannya berwarna kekuningan bila di sentrifuge.



**Gambar 8.** Proses isolasi *N. oculata*. (Dokumentasi Pribadi, 2015).

Apabila penggerusan selesai, tahapan selanjutnya ialah memasukkan hasil gerusan ke eppendof dan dilakukan sentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm, suhu 4°C, selama 10 menit, setelah itu didapatkan supernatan dari mikroalga *N. oculata*. Proses selanjutnya ialah spektrofotometer dengan panjang gelombang 260-280 nm untuk mengetahui kadar proteinnya. Dari hasil spektrofotometer tersebut diperoleh berat protein mikroalga *N. oculata* sebesar 1, 651 mg/ml.

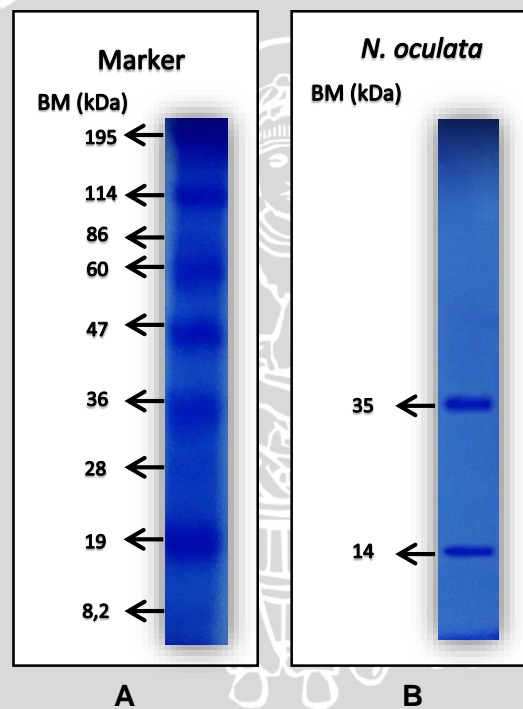


**Gambar 9.** (A) Sentrifuge, (B) Supernatan hasil sentrifuge, dan (C) Pengukuran protein dengan spektrofotometer (Dokumentasi Pribadi, 2015).



#### 4.4 Profil FPP *N. oculata*

Metode yang digunakan dalam melihat profil Fragmen Pigmen Protein mikroalga *N. oculata* yaitu SDS-PAGE. Banyak penelitian yang menggunakan metode SDS-PAGE ini untuk mengetahui ada atau tidaknya protein. Pemisahan protein dengan metode SDS-PAGE bertujuan untuk memisahkan protein dalam sampel berdasarkan berat molekul. Prinsip dasar SDS-PAGE ini adalah denaturasi protein oleh sodium dodesil sulfat yang dilanjutkan dengan pemisahan molekul berdasarkan berat molekulnya dengan metode elektroforesis yang menggunakan gel, dalam hal ini yang digunakan adalah poliakrilamid (Janson *et al.*, 1998).

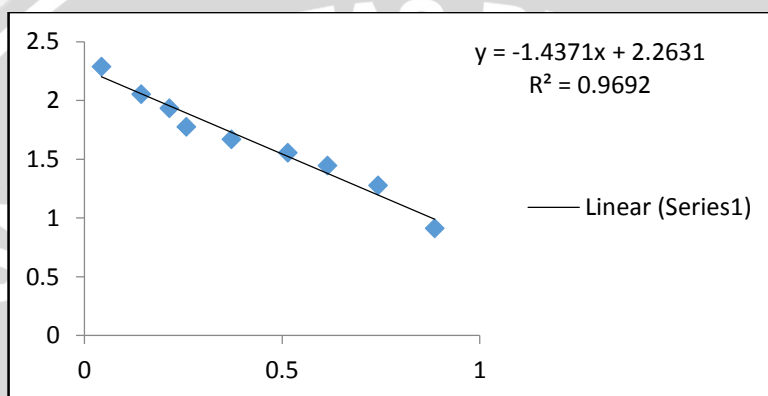


**Gambar 10.** Hasil SDS-PAGE Fragmen Pigmen Protein *N. oculata*

Hasil analisa paga gambar 10 menunjukkan adanya band protein, hal tersebut dapat dilihat dari pita protein yang terbentuk. Berat molekul dari band protein tersebut dapat dilihat melalui perhitungan. Pertama perhitungan band protein marker untuk mencari rumus linear yang digunakan. Hasilnya terdapat pada tabel 6 dan grafiknya pada gambar 11.

**Tabel 6.** Perhitungan berat molekul dan persamaan linear marker.

BM(kDa)	Log BM (y)	A (cm)	B (cm)	Rf (x)
195	2.290034611	3	70	0.042857143
114	2.056904851	10	70	0.142857143
86	1.934498451	15	70	0.214285714
60	1.77815125	18	70	0.257142857
47	1.672097858	26	70	0.371428571
36	1.556302501	36	70	0.514285714
28	1.447158031	43	70	0.614285714
19	1.278753601	52	70	0.742857143
8.2	0.913813852	62	70	0.885714286



**Gambar 11.** Grafik linear band protein marker.

Dari perhitungan pada tabel 3 dan gambar 11, dihasilkan persamaan dengan rumus  $y = -1.4371x + 2.2631$ . Setelah mendapatkan rumus tersebut selanjutnya dilakukan perhitungan berat molekul band protein *N. oculata*. Hasil perhitungan tersebut terdapat pada tabel 7.

**Tabel 7.** Perhitungan berat molekul band protein *N. Oculata*

A(mm)	B(mm)	Rf (x)	$y = -1,4371x + 2,2631$	BM Sampel
35	70	0.5	1.54455	35.0388626
54	70	0.771429	1.15448	14.27184104

Dari hasil SDS-PAGE FPP *N. oculata*, pada marker terdapat 9 pita protein, dengan berat molekul antara 8,2-195 kDa, dengan masing-masing (BM) yakni 8,2 kDa, 19 kDa, 28 kDa, 36 kDa, 47 kDa, 60 kDa, 86 kDa, 114 kDa, dan 195 kDa. Sedangkan pada hasil SDS-PAGE *N. oculata* menunjukkan adanya band protein yang terdeteksi, yakni pada berat molekul 14 kDa dan 35 kDa.

Berdasarkan hasil perhitungan berat molekul pada tabel 4, FPP mikroalga *N. oculata* terdapat didalamnya, hal ini dapat dilihat pada pita protein yang terbentuk dan dapat diindikasikan bahwa mikroalga *N. oculata* memiliki kandungan *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP). Hal tersebut sesuai pendapat Weis *et al.*, (2002) tentang PCP yakni PCP terjadi dalam dua bentuk, yakni sebagai homodimer (bentuk pendek) dengan massa molekul (berat molekul) antara 14-16 kDa dan yang lainnya sebagai bentuk monomer (bentuk panjang) dengan berat molekul antara 30-35 kDa. Tetapi, pada sebagian jenis algae hanya mempunyai protein satu bentuk saja. Protein mempunyai fungsi fisiologis sebagai zat antioksidan, dimana protein merupakan senyawa yang melindungi sel dari efek berbahaya radikal bebas. Sedangkan Sukenik *et al.*, (1992) dan Basso *et al.*, (2014) menyatakan pada berat molekul 22 kDa merupakan kandungan *Violaxanthin Chlorophyll protein* (VCP), dimana hal tersebut sesuai pada beberapa penelitian protein mikroalga.

#### **4.5 Hasil Uji In-Vivo FPP Pada Ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*)**

Pengujian in-vivo FPP pada ikan kerapu tikus dilakukan selama 27 hari. Ikan uji yang digunakan dalam penelitian ini memiliki panjang rata-rata 15 cm, dan berat tubuh rata-rata 46 gr. FPP pada ikan kerapu tikus diberikan dengan metode sonde, dan dosis yang digunakan disesuaikan dengan berat badan ikan (Yanuhar, 2011). Pemberian FPP selama pemeliharaan dilakukan 6 kali, yaitu pada hari ke-0 dengan dosis hari ke-0 (306 µl), ke-6 (315 µl), ke-9 (322 µl), ke-14 (326 µl), ke-19 (345 µl) dan ke-24 (351 µl). Pemberian dosis menyesuaikan berat badan ikan, dan perhitungan dosis terdapat pada lampiran 2.

Berdasarkan pengamatan, pada penelitian ini terdapat perbedaan respon yang diberikan pada ikan kontrol, ikan dengan pemberian FPP, ikan dengan pemberian VNN, dan ikan dengan pemberian FPP sama VNN. Secara



makroskopis dapat dilihat dari respon terhadap gerakan dan pakan, warna tubuh dan tingkat kematian.

a) Ikan kontrol

Pada ikan kontrol ikan aktif berenang, warna tubuhnya cerah, merespon terhadap pergerakan pakan, dan pertumbuhannya bertambah (Penambahan berat total 20,8 gr, sedangkan perhari 0,78 gr).

b) Ikan dengan pemberian FPP

Pada ikan dengan pemberian FPP ikan aktif berenang, warna tubuhnya cenderung cerah dan agak putih keabu-abuan, responsif terhadap gerakan pakan, dan pertumbuhan bertambah (Penambahan berat total 8 gr, sedangkan perhari 0,29 gr).

c) Ikan dengan pemberian VNN

Pada ikan dengan pemberian VNN ikan berenang di dasar aquarium dan sering bergerombol di aerasi, warna tubuhnya cenderung gelap, coklat tua dan agak kehitaman, pada saat pemberian pakan ikan kurang merespon, dan ikan mati pada minggu ke-2.

d) Ikan dengan pemberian FPP dan VNN

Pada ikan dengan pemberian FPP dan VNN ikan aktif berenang, warna kulitnya putih keabu-abuan, tetapi kurang responsif pada gerakan namun respon pada pakan normal, dan pertumbuhan bertambah (penambahan berat total 5,7 gr, sedangkan perhari 0,21 gr).

Dari keterangan diatas menyatakan bahwa terdapat perbedaan respon ikan pada setiap perlakuan. Pada ikan kontrol termasuk dalam kondisi normal karena dilihat dari aktivitas berenang, warna tubuhnya cerah dan responsif terhadap pemberian pakan. Pada ikan dengan pemberian FPP tidak terjadi perbedaan aktivitas pada ikan, hanya saja warnanya sedikit berubah ,dan pertumbuhannya sedikit dibawah ikan kontrol. Hal tersebut diindikasikan bahwa

pemberian FPP dengan metode sonde membuat ikan sedikit lebih stress. Rachmawati *et al.*, (2010) menjelaskan bahwa Stres merupakan respon bertahan pada hewan terhadap penyebab stres (*stressor*). Berbagai sumber stres baik berupa factor lingkungan (suhu, cahaya, pemeliharaan, penangkapan dan transport) maupun faktor biotik seperti infeksi mikroorganisme akan mempunyai dampak negatif terhadap perubahan fisiologis tubuh hewan. Perubahan tersebut meliputi , gangguan pertumbuhan, produktivitas dan semua aktivitas yang merupakan akibat dari mekanisme homeostasis dalam tubuh yang terganggu.

Pada ikan dengan pemberian VNN terlihat adanya perubahan pada aktivitas berenang ikan, yakni sering berenang di dasar, dengan warna tubuh agak gelap dan kurang responsif terhadap pakan, selain itu ikan mati pada minggu ke-2. Yuasa *et al.*, (2001) menjelaskan bahwa ikan yang terinfeksi VNN akan menampilkan tingkah laku berenang yang tidak normal dan umumnya ikan berdiam di dasar. Sugama *et al.*, (2013) juga menjelaskan Gejala VNN yang paling jelas adalah disorientasi ikan, yang berenang dalam pola 'spiral'. Hal ini sering disertai dengan perubahan warna kulit, ikan biasanya menjadi lebih gelap. Wabah VNN dapat menyebabkan kematian substansial hanya dalam beberapa hari, dan dalam kasus terburuk akan menghabiskan jalannya seluruh produksi. Sedangkan pada ikan dengan pemberian FPP dan VNN, keadaan ikan bisa dikatakan masih normal. Hal ini dilihat dari keadaan ikan saat berenang, warna tubuhnya yang putih keabu-abuan, pertumbuhannya bertambah walaupun ikan kurang responsif terhadap pemberian pakan.

#### 4.6 Ekspresi in-vivo $\beta$ -aktin Organ Hati *C. altivelis*

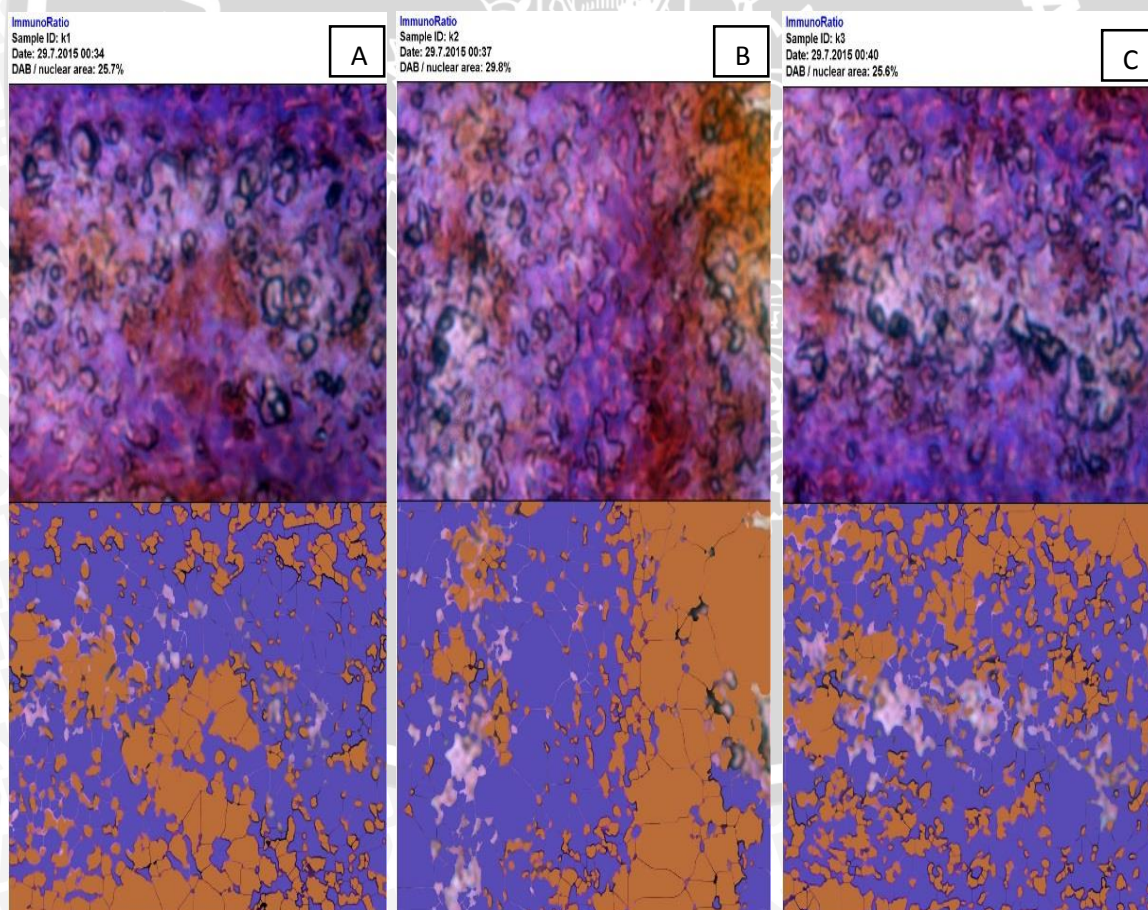
Profil  $\beta$ -aktin dapat diketahui menggunakan metode Imunohistokimia (IHK). Metode imunohistokimia banyak digunakan dalam penelitian dan praktek klinis.



IHK mampu menggambarkan komponen sel, seperti protein atau makromolekul lainnya pada sampel jaringan.

#### 4.6.1 Organ Hati Ikan kontrol

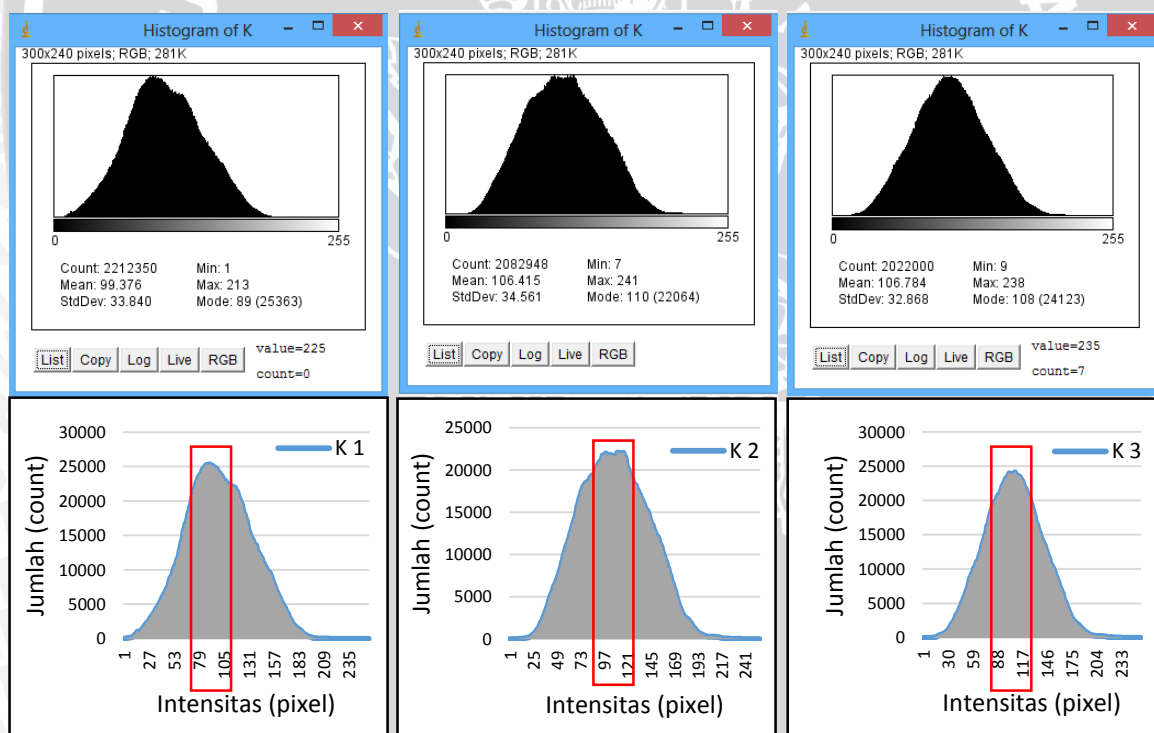
Ikan kontrol adalah ikan tanpa perlakuan. Pengamatan ini dilakukan untuk melihat profil  $\beta$ -aktin pada ikan normal. Metode IHK dalam penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk melihat profil  $\beta$ -aktin pada organ hati berdasarkan ikatan antigen dan antibodi. Fatchiyah (2006), menyatakan bahwa imunohistokimia merupakan suatu teknik untuk menentukan keberadaan suatu antigen atau protein target dalam jaringan atau sel dengan menggunakan reaksi antigen-antibodi. Teknik ini diawali dengan prosedur histoteknik, yaitu suatu prosedur pembuatan irisan jaringan yang kemudian diamati di bawah mikroskop.



Gambar 12. (A), (B), dan (C), Hasil immunoratio organ hati ikan kontrol



Pada organ hati ikan kontrol terlihat normal, sel-sel pada jaringan tersebut dalam kondisi normal. Teknik analisa yang biasa digunakan dalam IHK adalah software *Immunoratio* (IR) (Tuominen *et al.*, 2010). Hasil analisa IR pada kontrol pertama terlihat nilai DAB adalah 25,7%, pada ulangan kedua nilai DAB sebesar 29,8%, dan pada ulangan ketiga nilai DAB sebesar 25,6%. Sedangkan nilai rata-rata pada ikan kontrol sebesar 27,0%. Nilai prosentase DAB tersebut menjelaskan bahwa keberadaan gen target ( $\beta$ -aktin) pada ikan kontrol ditunjukkan dengan warna orange, yang berarti adanya ikatan antara antigen dengan antibodi. Dari hasil analisa immunoratio, selanjutnya dilakukan analisa menggunakan imageJ untuk mengetahui keterikatan antara antigen dengan antibodi yang disajikan dalam bentuk histogram dan grafik.



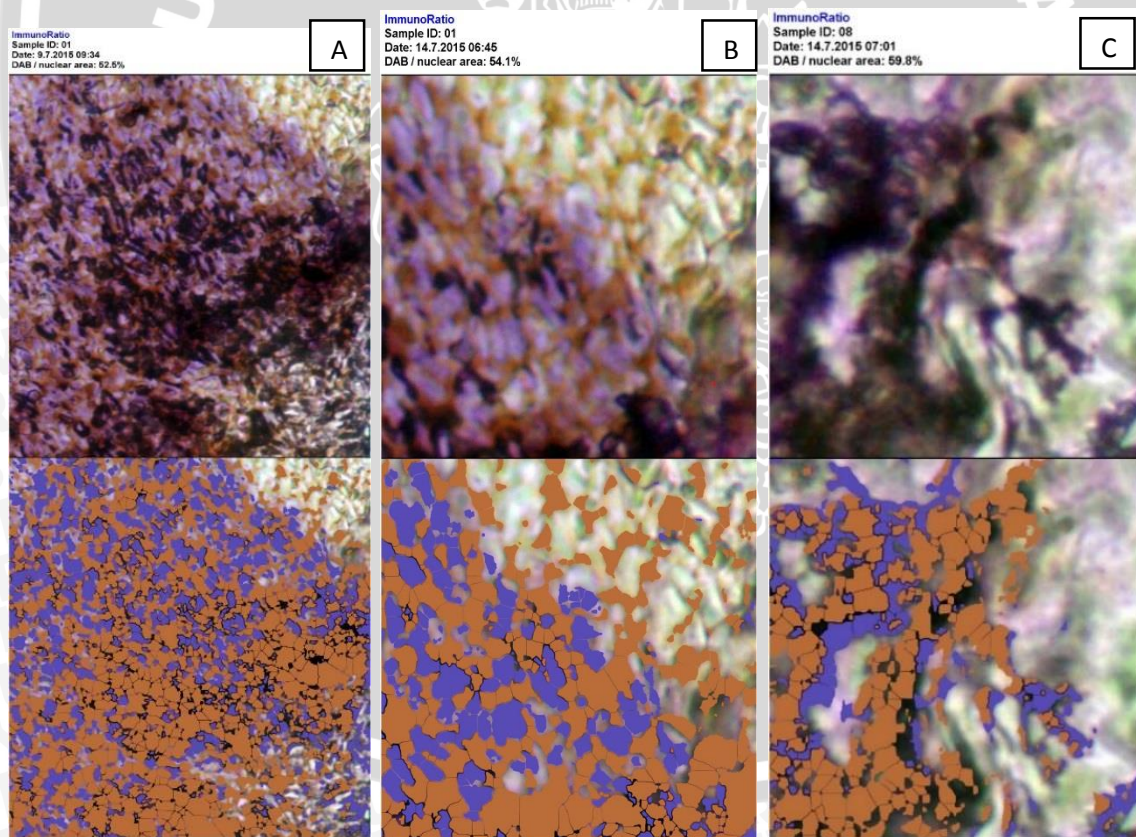
**Gambar 13.** Histogram dan grafik organ hati ikan kontrol

Hasil analisa menggunakan imageJ pada organ hati dengan ikan tanpa perlakuan nilai modenya 89, pada ikan kontrol K kedua 110, dan pada ikan kontrol ketiga 108. Dari hasil tersebut nilai modenya berkisar antara 89-110. Dengan demikian ikatan antara antigen dengan antibodi termasuk dalam kategori positif.

Dari analisa tersebut, dinyatakan bahwa pada ikan normal juga terdapat ekspresi  $\beta$ -aktin. Varghese *et al.*, (2014), menyatakan analisa IHK juga bisa dilakukan dengan pencitraan gambar ImageJ untuk melihat kerapatan pixelnya, yang berarti semakin kecil angka maka semakin pekat. Penilaian histogram ini didasarkan pada intensitas pixel, angka 0 mewakili angka paling gelap/pekat, sedangkan 255 menunjukkan angka rendah. Dari angka 0 sampai 255 terbagi dalam 4 zona, yaitu 0-60 positif kuat, 61-120 positif, 121-180 positif lemah, dan 181-255 negatif.

#### 4.6.2 Organ Hati Dengan Pemberian FPP

Organ hati ikan yang diberi FPP, hasilnya berbeda dengan organ hati ikan kontrol. Pada gambar 14 terlihat jelas adanya warna kuning kecoklatan yang menandakan adanya ikatan antara antigen dan antibodi.

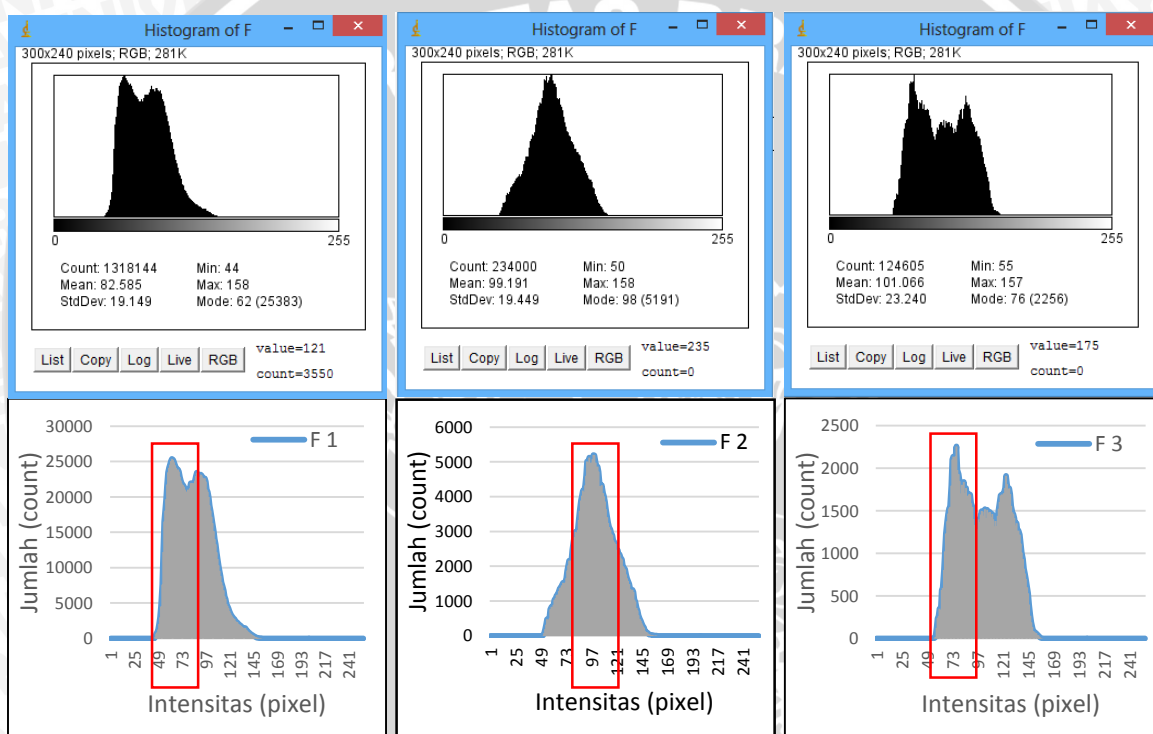


**Gambar 14.** (A), (B), dan (C), Hasil immunoratio organ hati ikan dengan pemberian FPP

Hasil analisa immunoratio pada organ hati dengan pemberian FPP nilai DAB sebesar 52,5% (gambar 14a), pada organ hati dengan pemberian FPP kedua



nilai DAB sebesar 54,1% (gambar 14b), dan pada organ hati dengan pemberian FPP ketiga nilai DAB sebesar 59,8% (gambar 14c) . Sedangkan rata-rata ekspresi  $\beta$ -aktin pada ikan dengan pemberian FPP nilai DAB sebesar 55,4%. Dengan demikian FPP dinyatakan mampu menjadi inducer yang baik dalam peningkatan ekspresi  $\beta$ -aktin. Dari hasil analisa immunoratio, selanjutnya dilakukan analisa menggunakan imageJ untuk mengetahui keterikatan antara antigen dengan antibodi yang disajikan dalam bentuk histogram dan grafik.



**Gambar 15.** Histogram dan grafik organ hati ikan dengan pemberian FPP

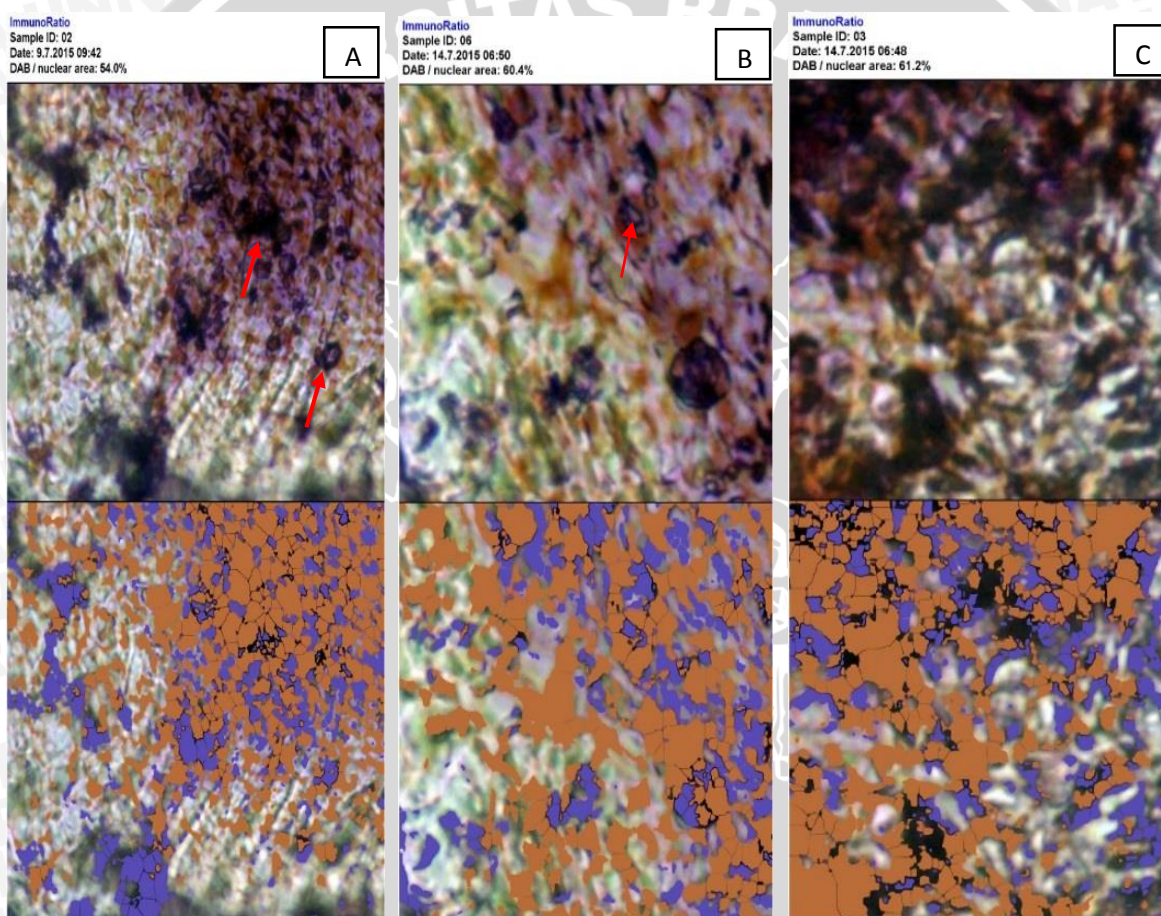
Hasil analisa menggunakan imageJ pada organ hati ikan dengan pemberian FPP pertama nilai modusnya sebesar 62, pada ikan dengan pemberian FPP kedua 98, dan pada ikan dengan pemberian FPP ketiga 76. Dari hasil tersebut nilai modusnya berkisar antara 62-98. Dengan demikian ikatan antara antigen dengan antibodi termasuk dalam kategori positif.

#### 4.6.3 Organ Hati Dengan Pemberian VNN

VNN merupakan virus yang menjadi masalah serius pada budidaya ikan kerapu tikus. Yoshikoshi dan Inoue (1990), menjelaskan bahwa ikan yang



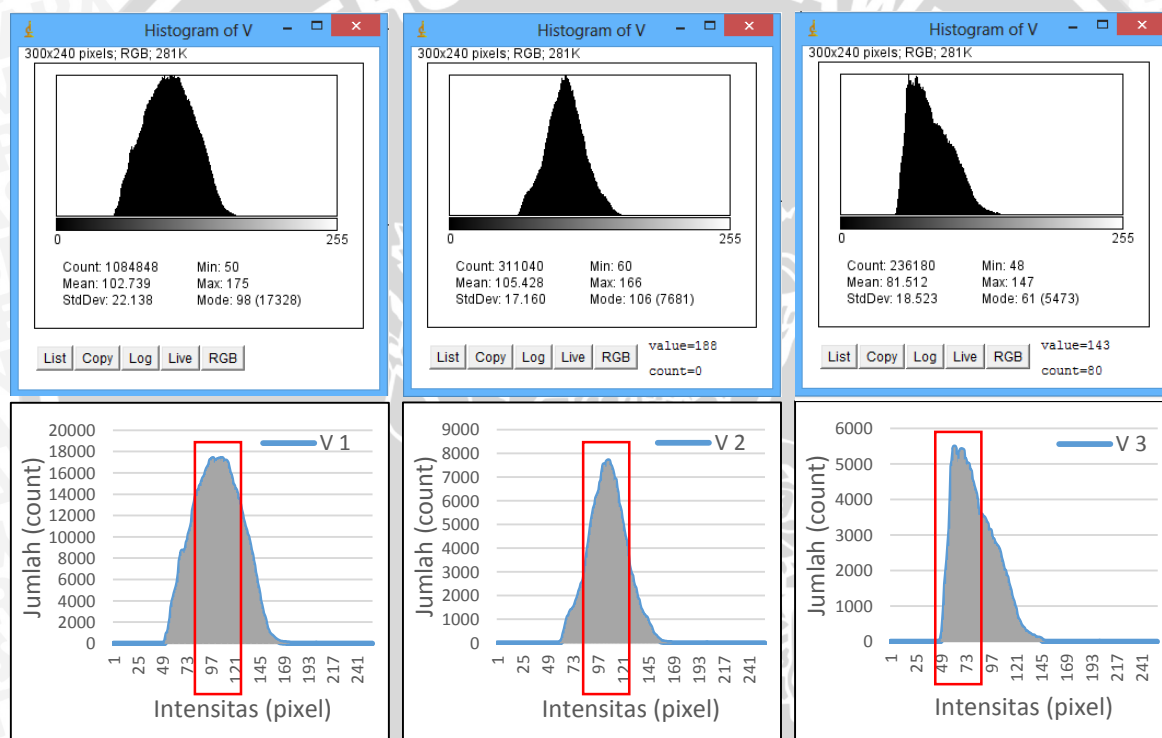
terinfeksi virus VNN akan mengalami perubahan gerakan berenang dan warna tubuh yang gelap. Menurut beberapa literatur serangan virus ini dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan sel pada inang. Pada penelitian ini Pengamatan menggunakan metode imunohistokimia juga menunjukkan hasil bahwa serangan VNN pada ikan kerapu tikus dapat menimbulkan kerusakan sel dan jaringan. Hal ini terlihat pada organ ikan uji yang diinfeksi VNN yang terdapat pada gambar 16.



**Gambar 16.** (A), (B), dan (C), Hasil immunoratio organ hati ikan dengan pemberian VNN

Pada organ hati yang diberi VNN tampak adanya kerusakan sel dan jaringan. Kerusakan tersebut meliputi vakuolisasi dan necrosis pada gambar 16a dan 16b (panah merah). Hasil analisa menggunakan immunoratio menunjukkan prosentasi  $\beta$ -aktin sebesar 54,0% (gambar 16a), pada ulangan kedua ekspresi  $\beta$ -

aktin sebesar 60,4% (gambar 16b) dan pada ulangan ketiga nilai DAB sebesar 61,2% (gambar 16c). Pada organ hati dengan pemberian VNN didapatkan rata-rata ekspresi  $\beta$ -aktin sebesar 58,5%. Hal tersebut menunjukkan bahwa, tubuh ikan merespon adanya VNN dengan meningkatkan ekspresi  $\beta$ -aktin. Peningkatan tersebut ditujukan untuk mengorganisir dan meningkatkan sistem imun pada tubuh ikan. Dari hasil analisa immunoratio, selanjutnya dilakukan analisa menggunakan imageJ untuk mengetahui keterikatan antara antigen dengan antibodi yang disajikan dalam bentuk histogram dan grafik.



**Gambar 17.** Histogram dan grafik organ hati ikan dengan pemberian VNN

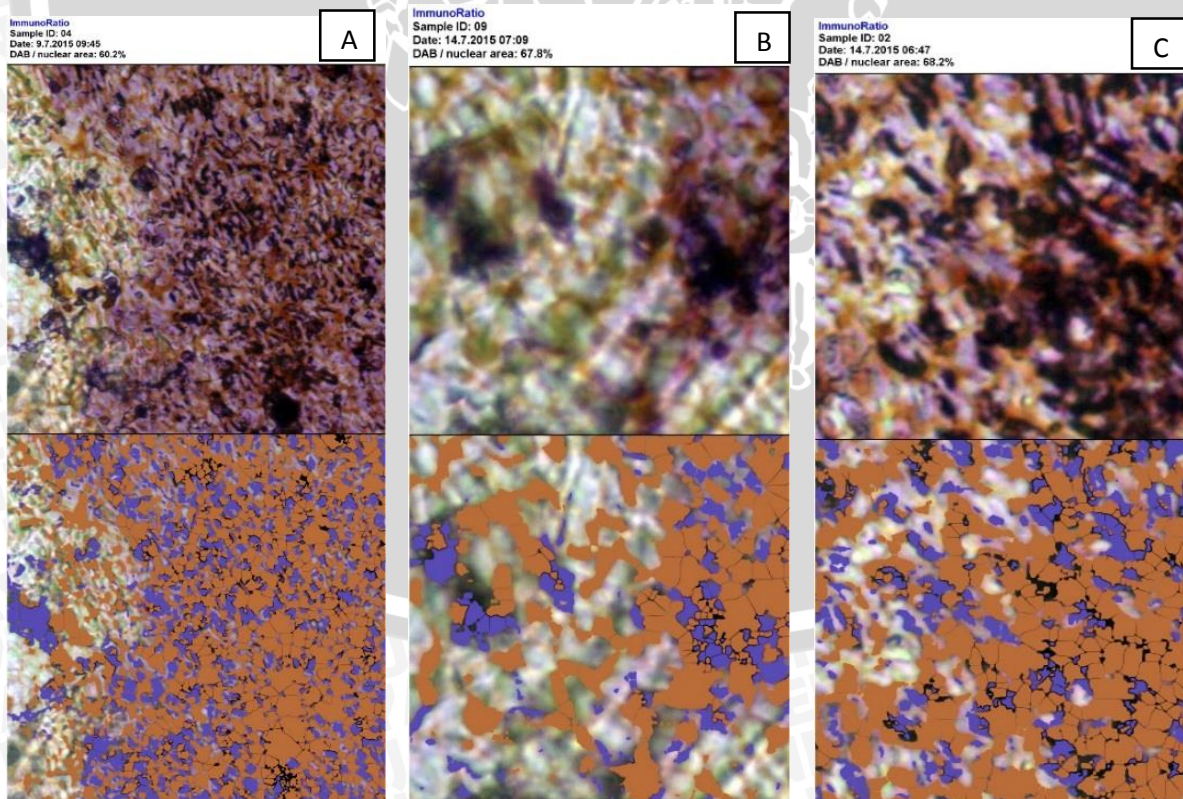
Hasil analisa menggunakan imageJ pada organ hati ikan dengan pemberian VNN pertama nilai modenyanya sebesar 98, pada ikan dengan pemberian VNN kedua 106, dan pada ikan dengan pemberian VNN ketiga 61. Dari hasil tersebut nilai modenyanya berkisar antara 61-106. Dengan demikian ikatan antara antigen dengan antibodi termasuk dalam kategori positif.



#### 4.6.4 Organ Hati Dengan Pemberian FPP dan VNN

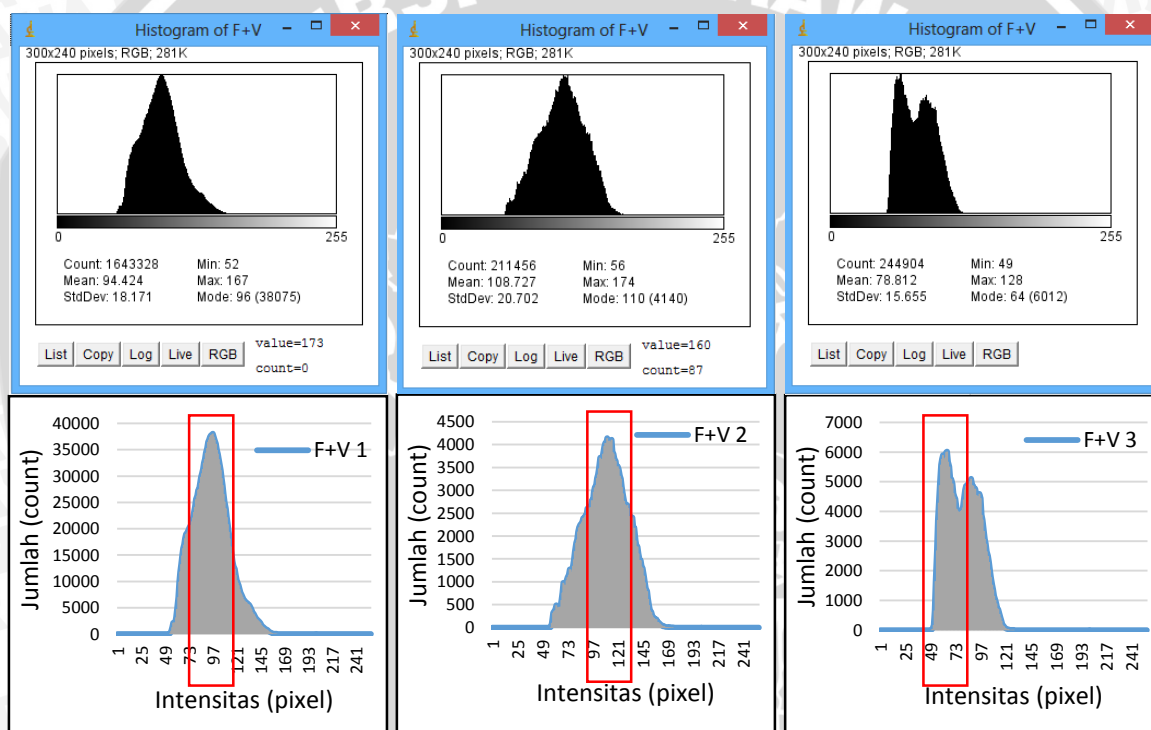
Pada penelitian organ hati yang diinduksi FPP dan VNN ini, FPP diberikan pada hari pertama pemeliharaan, sedangkan infeksi VNN dilakukan pada hari ke-14. Tujuannya adalah untuk melihat aktivitas FPP dalam membentuk sistem imun pada tubuh ikan, dan diharapkan pada saat penginfeksi ikan uji dengan VNN sistem imun dalam tubuh ikan sudah siap untuk menghadapi serangan virus.

Berbeda halnya pada perlakuan ikan yang hanya diinfeksi virus, dimana ikan uji mati pada minggu ke-2. Pada perlakuan dengan pemberian FPP dan sebelum diinfeksi VNN ikan mampu bertahan sampai akhir masa pemeliharaan. Hal ini menunjukkan bahwa pertahanan ikan cukup kuat dalam menghadapi serangan virus. Selain itu dapat dikatakan juga bahwa pembentukan sistem imun dengan pemberian FPP berhasil. Kinerja FPP sebagai biokatalisator pada pembentukan sistem imun berjalan dengan baik.



**Gambar 18.** (A), (B), dan (C), Hasil immunoratio organ hati ikan dengan pemberian FPP dan VNN

Hasil analisa immunoratio pada organ hati dengan pemberian FPP dan VNN nilai DAB sebesar 60,2% (gambar 18a), pada organ hati ulangan kedua nilai DAB sebesar 67,8% (gambar 18b), dan pada organ hati ulangan ketiga nilai DAB sebesar 68,2% (gambar 18c) . Sedangkan rata-rata ekspresi  $\beta$ -aktin pada ikan dengan pemberian FPP dan VNN ini sebesar 65,4%. Peningkatan tersebut menjelaskan baiknya respon imun ikan uji. Dari hasil analisa immunoratio, selanjutnya dilakukan analisa menggunakan imageJ untuk mengetahui keterikatan antara antigen dengan antibodi yang disajikan dalam bentuk histogram dan grafik.

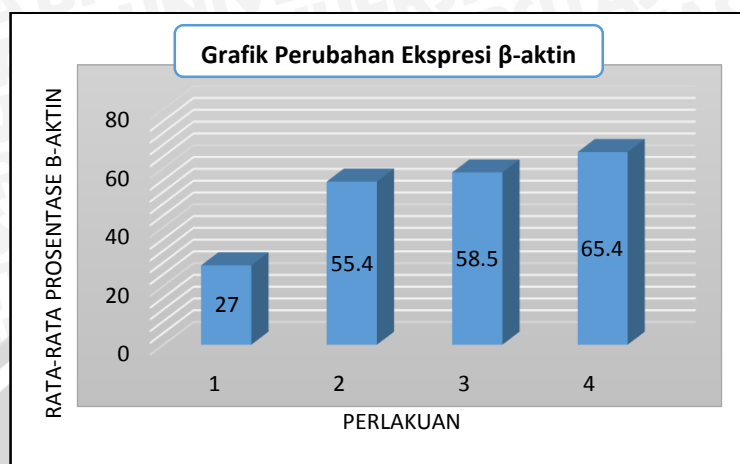


**Gambar 19.** Histogram dan grafik organ hati ikan dengan pemberian FPP dan VNN

Hasil analisa menggunakan imageJ pada organ hati ikan dengan pemberian VNN pertama nilai modenyanya sebesar 96, pada ikan dengan pemberian VNN kedua 110, dan pada ikan dengan pemberian VNN ketiga 64. Dari hasil tersebut nilai modenyanya berkisar antara 64-110. Dengan demikian ikatan antara antigen dengan antibodi termasuk dalam kategori positif.



Dari hasil analisa immunoratio pada gambar diatas didapatkan grafik perubahan prosentase DAB tiap perlakuan yang dapat dilihat pada gambar 20.



**Gambar 20.** Grafik perubahan ekspresi  $\beta$ -aktin (Keterangan: 1=K, 2=FPP, 3=VNN, dan 4=FPP dan VNN)

Dari hasil grafik diatas terlihat bahwa prosentase rata-rata DAB tertinggi terdapat pada pemberian FPP dan VNN dengan nilai rata-rata DAB 65,4%. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian FPP mampu meningkatkan respon imun pada ikan ketika VNN menyerang ikan kerapu tikus yang dapat dilihat dari ekspresi  $\beta$ -aktin yang semakin meningkat. Dengan demikian FPP mikroalga *N. oculata* yang berupa PCP mampu menjadi inducer dalam peningkatan sistem pertahanan tubuh ikan.

#### 4.7 Analisa Data

Analisa data pada penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 3 kali pengulangan. Data yang digunakan dalam penelitian ini adalah data prosentasi DAB  $\beta$ -aktin pada setiap perlakuan. Setelah didapatkan data tersebut, selanjutnya data dianalisa dengan menggunakan cara statistik yaitu analisa keragaman (ANOVA), dengan tujuan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan pemberian perlakuan. Data hasil penelitian dapat dilihat pada tabel 8.

**Tabel 8.** Data hasil penelitian

Ulangan	Perlakuan				TOTAL
	Kontol	FPP	VNN	FPP+VNN	
1	25,7	52,5	54,0	60,2	192,4
2	29,8	54,1	60,4	67,8	212,1
3	25,6	59,8	61,2	68,2	214,8
Total	81,1	166,4	175,6	196,2	619,3
Rata-rata	27,0	55,4	58,5	65,4	

Dari data hasil penelitian diatas, selanjutnya dilakukan analisa sidik ragam prosentase DAB  $\beta$ -aktin pada setiap perlakuan. Hasil analisa sidik ragam (ANOVA) dapat dilihat pada tabel 9, sedangkan perhitungannya dapat dilihat pada lampiran.

**Tabel 9.** Hasil uji ANOVA DAB  $\beta$ -aktin

SK	DB	JK	KT	FHIT	F tabel 5%
A	3	2570,95	856,98	60,82*	4,07
Galat	8	112,72	14,09		
Total	11	2683,67			

Keterangan : A = perlakuan  
 \* = berbeda nyata  
 \*\* = tidak berbeda nyata

Berdasarkan hasil anova diperoleh pada perlakuan  $F_{hitung} (A) > F_{tabel}$ . Hal itu menunjukkan bahwa hasil pemberian perlakuan yang berbeda yaitu pemberian FPP, pemberian VNN, dan pemberian FPP dan VNN berpengaruh berbeda nyata terhadap ekspresi  $\beta$ -aktin, dilihat pada taraf uji 5%.

Setelah diketahui hasil uji anova menunjukkan adanya pengaruh, maka dapat dilakukan uji lanjutan berupa uji Beda Nyata Terkecil (BNT). Uji BNT perlu dilakukan untuk mengetahui bagaimana pengaruh dari perlakuan yang berbeda terhadap ekspresi  $\beta$ -aktin. Berikut ini hasil uji BNT yang tersaji pada tabel 10. Perhitungan uji BNT dapat dilihat pada lampiran.





**Tabel 10.** Hasil uji BNT

Rata-rata Prosentase $\beta$ -aktin	K=	F=	V=	FV=	notasi	BNT 5%
K = 27,03					a	3,06
F = 55,47	28,43*				b	
V = 58,53	31,50*	3,07*			c	
FV= 65,40	38,37*	9,93*	6,87*		d	

Keterangan : K = Kontrol  
 F = Perlakuan Pemberia FPP  
 V = Perlakuan Pemberia VNN  
 FV = Perlakuan Pemberia FPP+VNN  
 T<sub>n</sub> = Tidak Nyata  
 \* = Berbeda Nyata

Berdasarkan hasil uji BNT diperoleh bahwa perlakuan yang berbeda yaitu pemberian FPP, pemberian VNN dan pemberian FPP dan VNN berbeda nyata. Hal tersebut ditunjukkan oleh selisih nilai prosentase DAB > BNT 5%. Jika dilihat pada tabel diatas pemberian FPP dan VNN merupakan pemberian yang paling baik karena memiliki notasi d, grafik notasi dapat dilihat pada gambar 21.



**Gambar 21.** Grafik notasi  $\beta$ -aktin

#### 4.8 Mekanisme $\beta$ -aktin di dalam sel

$\beta$ -aktin merupakan salah satu gen yang sudah ada di dalam sel.  $\beta$ -aktin ini mempunyai peranan penting dalam sistem pertahanan tubuh terhadap serangan antigen berbahaya seperti bakteri dan virus. Bentuk peran  $\beta$ -aktin didalam sel

yakni mempercepat respon fisiologis, motilitas sel, dan trafficking intraseluler (Jönsson *et al.* 2012).

*N. oculata* merupakan mikroalga yang berpotensi untuk dikembangkan karena memiliki kandungan lengkap. Salah satu komponen penting dalam mikroalga ini yaitu FPP yang didapatkan berupa *Peridinin Chlorophyll Protein* dengan BM 14 kDa dan 35 kDa. FPP tersebut merupakan pigmen protein dalam bentuk RNA atau enzim. Pemberian protein dalam bentuk enzim pada tubuh ikan akan menjadi biokatalisator dalam pembentukan respon fisiologis (Messina dan Weinstock, 1992).

Pada saat FPP diinduksikan ke ikan FPP tersebut akan dikenali oleh *Toll-like Receptor* (TLR). TLR tersebut merupakan reseptor di dalam sel yang akan mengenali berbagai macam ligan yang masuk, salah satunya protein (Ehrentraut, 2011). Dengan demikian pemberian FPP ini digunakan sebagai inducer untuk meningkatkan ekspresi  $\beta$ -aktin. Dengan meningkatnya ekspresi  $\beta$ -aktin tersebut maka akan berdampak pula terhadap respon fisiologis seperti fungsi reseptor, penyerapan sinyal, dan transport vesikel antibodi.

#### 4.9 Hasil Analisa Kualitas Air

Kualitas air merupakan faktor penting dalam pemeliharaan ikan. Kualitas air ini menentukan kelangsungan hidup dari suatu organisme. Dalam penelitian ini kualitas air ikan kerapu tikus yang dianalisis yaitu suhu, pH, salinitas, dan DO, dengan hasil :

- Suhu

Suhu adalah parameter fisika yang dapat mempengaruhi pertumbuhan organisme. Suhu perairan merupakan parameter yang penting bagi kehidupan berbagai organisme laut karena dapat mempengaruhi metabolisme maupun perkembangbiakan organisme tersebut, juga sebagai indikator fenomena



perubahan iklim (Hutabarat dan Evans, 1986). Hasil pengukuran suhu pada aquarium ikan kerapu tikus terdapat pada tabel 11.

**Tabel 11.** Hasil pengukuran suhu (°C)

Penyondean per hari	Aquarium			
	1	2	3	4
0	30	31	31	30
6	29	30	30	30
9	28	28	30	29
14	30	30	28	31
19	31	31	31	30
24	30	29	29	31

\*Keterangan : 1 = aquarium ikan kontrol  
 2 = aquariuk ikan pemberian FPP  
 3 = aquarium ikan pemberian VNN  
 4 = aquarium ikan pemberian FPP dan VNN

Pada tabel 9 hasil pengukuran suhu yang diperoleh berkisar antara 28°C-31°C. Suhu tersebut termasuk dalam kategori normal, karena pada suhu tersebut ikan dapat tumbuh secara optimal. Amiruddin *et al.*, (2011) menyatakan suhu yang optimum untuk pertumbuhan ikan kerapu tikus berkisar antara 27-29°C.

- Derajat Keasaman / pH

pH merupakan nilai yang menunjukkan aktivitas ion hidrogen dalam air. Sutrisno *et al.*, (2002), menyatakan istilah yang digunakan untuk menyatakan intensitas keadaan asam atau basa sesuatu larutan. pH merupakan salah satu faktor lingkungan yang dapat mempengaruhi kehidupan mikroorganisme dalam air. Hasil pengukuran pH pada aquarium ikan kerapu tikus terdapat pada tabel 12.

**Tabel 12.** Hasil pengukuran pH

Penyondean per hari	Aquarium			
	1	2	3	4
0	7,9	7,8	7,9	7,9
6	7,7	7,7	7,9	7,8
9	7,7	7,7	7,8	7,9
14	7,9	7,7	7,9	7,7
19	7,8	7,9	7,7	7,7
24	7,8	7,7	7,9	7,8

- \*Keterangan : 1 = aquarium ikan kontrol  
 2 = aquariuk ikan pemberian FPP  
 3 = aquarium ikan pemberian VNN  
 4 = aquarium ikan pemberian FPP dan VNN

Hasil pengukuran pH pada aquarium ikan kerapu tikus berkisar antara 7,7–7,9. pH yang optimum untuk pertumbuhan ikan kerapu tikus antara 7,0-7,8 (Amiruddin *et al.*, 2011).

- Salinitas

Merupakan jumlah gram garam yang terlarut dalam satu kilogram air laut ( Millero dan Sons, 1991). Hasil pengukuran salinitas pada penelitian ini terdapat pada tabel 13.

**Tabel 13.** Hasil pengukuran salinitas

Penyondean per hari	Aquarium			
	1	2	3	4
0	30	30	31	30
6	31	30	29	29
9	31	29	31	30
14	30	31	31	31
19	29	31	31	30
24	31	30	29	29

- \*Keterangan : 1 = aquarium ikan kontrol  
 2 = aquariuk ikan pemberian FPP  
 3 = aquarium ikan pemberian VNN  
 4 = aquarium ikan pemberian FPP dan VNN

Hasil pengukuran salinitas pada tabel 9 berkisar antara 29-31‰. Amiruddin *et al.*, (2011) menyatakan salinitas yang cocok untuk ikan kerapu tikus berkisar antara 30-33 ppt.

- *Dissolved Oxygen (DO)*

Oksigen terlarut (DO) merupakan salah satu parameter kimia air yang berperan pada kehidupan biota perairan. Penurunan oksigen terlarut dapat mengurangi efisiensi pengambilan oksigen bagi biota perairan sehingga



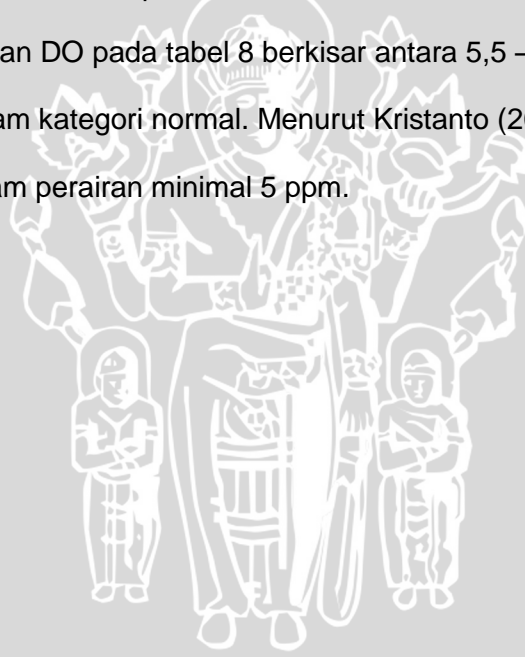
menurunkan kemampuannya untuk hidup normal. Hasil pengukuran DO pada penelitian ini terdapat pada tabel 14.

**Tabel 14.** Hasil pengukuran oksigen terlarut

Penyondean per hari	Aquarium			
	1	2	3	4
0	6,1	5,9	5,6	6,2
6	5,5	5,8	5,8	6,1
9	5,7	6,2	6,2	6,1
14	6,1	5,5	5,9	5,9
19	6,1	5,7	6,2	6,2
24	5,9	6,0	5,9	5,6

\*Keterangan : 1 = aquarium ikan kontrol  
2 = aquarium ikan pemberian FPP  
3 = aquarium ikan pemberian VNN  
4 = aquarium ikan pemberian FPP dan VNN

Hasil pengukuran DO pada tabel 8 berkisar antara 5,5 – 6,2 mg/l. Hasil tersebut termasuk dalam kategori normal. Menurut Kristanto (2002), kandungan oksigen terlarut di dalam perairan minimal 5 ppm.



## 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Fragmen pigmen protein (FPP) *crude* mikroalga *N. oculata* yang diinduksikan pada ikan kerapu tikus (*C. altivelis*) dapat meningkatkan  $\beta$ -aktin pada sel hepatosit. Terlihat pada nilai rata-rata ikan kontrol  $\beta$ -aktinnya 27,0%, pada ikan yang diberikan FPP rata-rata  $\beta$ -aktinnya 55,4%, pada ikan yang diberikan VNN rata-rata nilai  $\beta$ -aktinnya 58,5%, dan pada ikan yang diberi FPP dan VNN nilai rata-rata  $\beta$ -aktinnya 65,4%. Berdasarkan analisa sidik ragam, pemberian FPP berpengaruh nyata terhadap  $\beta$ -aktin, yang berarti FPP dapat digunakan sebagai inducer dalam meningkatkan respon imun pada ikan kerapu tikus.

### 5.2 Saran

Perlu adanya pemurnian FPP untuk mendapatkan senyawa dan perlu penelitian lebih lanjut untuk pemanfaatan FPP sebagai sumberdaya hayati dalam menejemen lingkungan dan kesehatan ikan khususnya untuk menanggulangi serangan virus VNN pada ikan kerapu tikus (*C. altivelis*).



## DAFTAR PUSTAKA

- Affan, Junaidi M. 2012. *Identifikasi lokasi untuk pengembangan budidaya keramba jaring apung (KJA) berdasarkan faktor lingkungan dan kualitas air di perairan pantai timur Bangka Tengah*. Depik, ISSN 2089-7790. 1(1):78-85.
- Ahmad, T., Imanto, P.T., Muchari, Basyari, A., Sunyoto, P., Slamet, B., Mayunar, Purba, R., Diani, S., Redjeki, S., Pranowo, A., & Murtiningsih, S. 1991. *Pedoman teknis operasional pembesaran ikan kerapu dalam karamba jaring apung*. Balai Penelitian Perikanan Budidaya Pantai, Maros, 59 hlm.
- Akbar, S. dan Sudaryanto. 2001. *Pembenihan dan Pembesaran Kerapu Bebek*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Amiruddin, Hamsah, R. K. Dongoran, R. Nurhadi dan L. Darto. 2011. *Manajemen Induk Ikan Kerapu Tikus (Cromileptes Altivelis) sebagai Upaya Optimalisasi Produksi Telur Berkualitas*. Balai Budidaya Laut Ambon. 23 hal.
- Amrullah, M.H. 2003. *Prospek dan Dukungan Teknologi dalam Pengembangan Budidaya Kerapu di Balerang*. Pelatihan Teknologi Budidaya, Pembuatan Pakan dan Pasca Panen Kerapu di Batam 20-22 Oktober 2003. BPPT. Jakarta.
- Anderson, D.P. 1974. *Fish Immunology*, dalam *Diseases of Fishes*, buku ke-4, Snieszko, S.F. & Axelrod, H.R. (ed.). T.F.H. Publications, Ltd. 239 p.
- Apridayanti, Eka. 2005. *Evaluasi Pengelolaan Lingkungan Perairan Waduk Lahor Kabupaten Malang, Jawa Timur*. Tesis. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Arab, L., S. Steck-Scott and P. Bowen. 2001. Partisipation of Lycopene and Betacarotene in Carcinogenesis: Defenders, Aggresors, or Passive Bystanders? *Epidemiologic Reviews*, Vol 23. No 2, p.221-229
- Artman Lise., Virginie Dormoy-Raclet., Christopher von Roretz. 2014. *Planning your every move: The role of-actin and its post-transcriptional regulation in cell motility*. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 34 (2014) 33–43
- Atlas, R. M. 1997. *Principles of Microbiology*, second edition. Wm. C. Brown Publishers. Sydney.1298 p.
- Basso, S., Simionato, D., Gerotto, C., Segalla, A., Giacometti, G. M., Morosinotto, T. 2014. *Characterization of the photosynthetic apparatus of the Eustigmatophycean Nannochloropsis gaditana: evidence of convergent evolution in the supramolecular organization of photosystem I*. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, 1837 (2014), pp. 306–314

- Becker, E. W. (1994), *Microalgae Biotechnology and Microbiology*, Cambridge: Cambridge University Press.
- Boyd, C. E. 1982. *Water Quality Management for Pond Fish Culture*. Amsterdam : Elsevier Scientific Publishing Company.
- Bunnell Tina M., Brandon J. Burbach., Yoji Shimizu., and James M. Ervasti. 2011.  *$\beta$ -Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool*. *Molecular Biology of the Cell* (22).
- Cholik, F., Jagatraya, A.G., Poernomo, dan Jauzi, A., 2005. *Akuakultur tumpuan harapan masa depan bangsa*. Masyarakat Perikanan Nusantara dengan Taman Akuarium Air Tawar. Jakarta.
- Cohen, Z., 1999. *Chemicals from Microalgae*. Taylor & Francis, London, UK.
- Cresswell RC, Rees TAV, and Shah N. 1989. *Alga and Cyanobacterial Biotechnology*. Mc Graw Hill, London
- Davies, H. 1997. *Introductory Immunobiology*. Chapman and Hall. London. 394 p.
- Effendi, Hefni. 2003. *Telaah Kualitas Air bagi Pengelolaan Sumber Daya dan Lingkungan Perairan*. Kanisius.Yogyakarta.
- Ehrentraut H, Meyer R, Schwederski M, Ehrentraut S, Velten M, Grohe C. 2011. *Systemically administered ligands of Toll-like receptor 2, -4, and -9 induce distinct inflammatory responses in the Murine Lung*. *Mediators of inflammation* :1-11.
- Ellis, A.E. 1988. "Optimizing Factors For Fish Vaccination" dalam *Fish Vaccination*, A.E. Ellis (ed). Academic Press Ltd. London. 32-46 pp.
- Ellis, A.E. 1989. "The Immunology of Teleost" dalam *Fish Pathology*, R.J. Roberts (ed.). Bailliere Tindall. London. 135-152 pp.
- Evalawati., M. Meiyana dan Aditya. 2001. *Biologi Kerapu, Pembesaran Kerapu bebek dan Kerapu Macan di Keramba Jaring Apung*. Ditjenkan. Jakarta.
- Fachrullah, MR, 2011, 'Laju Pertumbuhan Mikroalga Penghasil Biofuel Jenis *Chlorella* sp. Dan *Nannochloropsis* sp. yang Dikultivasi Menggunakan Air Limbah Hasil Penambangan Timah di Pulau Bangka', Skripsi, Institut Pertanian Bogor, Bogor
- Fatchiyah. 2006. *Imunohistokimia*. [Kuliah] Universitas Brawijaya, 24 November.
- Fatchiyah., Estri L. Arumingtyas., Sri Widyarti dan Sri Rahayu. 2011. *Biologi Molekular*. Erlangga: Jakarta
- Fulks, W., & Main, K.I., 1991, *Rotifer & Microalgae Culture Systems*. Proceeding of U.S. Asia Workshop, The Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii



- Ghufron, M., H. Kordi. 2005. *Budidaya Ikan Laut di Keramba Jaring Apung*. Rineka Cipta. Jakarta.
- Ghufron, M, H. Kordi, A. B. Tanjung. 2007. *Pengelolaan Kualitas Air dalam Budidaya Perairan*. Rineka Cipta. Jakarta.
- Gross, Jeana. 1991. *Pigments In Vegetables (Chlorophylls and Carotenoids)*. Van Nostrand Reinhold. New York. 7. 75.
- Hartanti, N. 2008. *Pencemaran Organik Limbah Tahu di Sungai Desa Kalisari Kecamatan Ajibarang Kabupaten Banyumas*. CERMIN. Edisi 042. Hlm 4.
- Hemmstra, P.H. & Randall, J.E. 1993. *FAO Species Catalogue*, Vol.16, Groupers of the world. FAO, Rome 382 P.pl.XXXI.
- Hermanto Mochamad Bagus., Sumardi., La Choviya Hawa., dan Siti Masithah Fiqtinovri. 2011. *Perancangan Bioreaktor Untuk Pembudidayaan Mikroalga*. Jurnal Teknologi Pertanian Vol. 12 No. 3 [Desember 2011] 153-162
- Hibberd, D.J. (1981). Notes on the Taxonomy and Nomenclature of the Alga Classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae). *Journal of the Linnean Society of London, Botany*.
- Hoek, C.V.D., D.G. Mann, H.M. Jahns. 1998. *Algae: An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press. UK.
- Hutabarat, S. dan S. M. Evans. 1986. *Pengantar Oseanografi*. Cetakan ke-3. UI Press. Jakarta. Ilahude, A. G. 1997. *Sebaran Suhu, Salinitas, Sigma-T, dan Zat Hara Perairan Laut Cina Selatan*. Hal 25-90. In Suyarso (ed.), *Atlas Oseanologi Laut Cina Selatan*. P30-LIPI. Jakarta.
- Ingram, G.A. 1980. *Substances Involved in The Natural Resistance of Fish to Infection-A Review*. *J.Fish. Bio.*, 16:23-60.
- Irianto, A. 2005. *Patologi Ikan Teleostei. Cetakan Pertama*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Isnansetyo, A dan Kurniastuty. 1995. *Teknik Kultur Phytoplankton dan Zooplankton*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Istijanto, M.M.,M.Com. 2005. *Riset Sumber Daya Manusia*, PT.Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Janson, J.C and Ryden, L. (1998). *Protein Purification: Principles, High Resolution Methodes, and Applications, 2nd edition*. A john willey & Sons Inc. Pub., Hal: 464-484.
- Jönsson, F., Gurniak, C. B., Fleischer, B., Kirfel, G., Witke, W. 2012. *Immunological Responses and Actin Dynamics in Macrophages Are Controlled by N-Cofilin but Are Independent from ADF*. PLoS ONE 7(4): e36034. doi:10.1371/journal.pone.0036034

Johny, Fris *et al.*, 2010. *Aplikasi Imunostimulan Untuk Meningkatkan Imunitas non-Spesifik Ikan Kerapu Macan, Epinephelus fuscoguttatus Terhadap Penyakit Infeksi Di Hatcheri*. Prosiding Forum Inovasi Teknologi. Balai riset Perikanan Budidaya Laut Gondol.

Kawaroe, M, 2008, *Mikroalga Sebagai Bahan Baku Biofuel*. Surfactant dan Bioenergy Research Centre, Lembaga Pengabdian Pada Masyarakat, Institut Pertanian Bogor. Bogor

Koesharyani I., Zafran and Yuasa, I. 1999. *Deteksi Viral Nervous Necrosis (Vnn) Menggunakan Polymerase Chain Reaction (Pcr) Pada Ikan Kerapu Bebek*. Pros.Sem.Nas.Pen. Dis. Tek. Budidaya Laut dan Pantai : 237-240.

Koesharyani, I., D. Roza, K. Mahardika, F. Johnny, Zafran and K. Yuasa. 2005. *Manual for Fish Diseases Diagnosis II. Marine Fish and Crustacean Diseases in Indonesia*. Gondol Research Institute for Mariculture and Japan International Cooperation Agency. p. 5-15.

Kohno, H., Imanto, P.T., Diani, S., Slamet, B., & Sunyoto, P. 1990. *Reproductive performance and early life history of the grouper (Epinephelus fuscoguttatus)*. Bull. Pen. Perikanan, spec. edi No.1:27-35.

Kordi, M. 2001. *Usaha Pembesaran Ikan Kerapu di Tambak*. Kanisius. Yogyakarta.

Kordi K., M.G.H. 2010. *Pembenihan Ikan Laut Ekonomis Secara Buatan*. Penerbit Lily Publisher, Yogyakarta. 188 halaman.

Kristianto, P. 2002. *Ekologi Industri*. Penerbit ANDI. Yogyakarta.

Lagler, K.F., J.E. Bardach, R.R. Miller, & D.R.M. Passino. 1977. *Ichthyology*. John Wiley & Sons. New York. 506 p.

Lieske, E. and Robert. 1997. Reef Fishes of the World. *Pcriplus Eddition (HIC) Ltd*. Hongkong. 400 pp.

Linzer, D.I., and Nathans, D. 1983. *Growth-related changes in specific mRNAs of cultured mouse cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4271–4275.

Mahasri G. 1999. *Manajemen Kualitas Air*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. 113 Hal

Meritasari, D., R. Jannah, D. Irshalina dan S. Innayah. 2010. *Eksplorasi Bahan Aktif Mikroalga Laut Nannochloropsis oculata Sebagai Antibakteri (Penghambat) Vibrio algalolyticus*. Program Kreatifitas Mahasiswa Universitas Airlangga. Surabaya.

Messina J. L dan Weinstock R.S. 1992. *Regulation of Beta-actin Gene Transcription by Insulin and Phorbol Esters*. Exp Cell Res (2):532-5.

Millero, F.J. dan Sohn, M.L., 1991. *Chemical Oceanography*. CRC Press. London.



- Mishima, H. & Gonzales, B. 1994. *Some biological and ecological aspects on C. altivelis around Palawan Island, Philippines*. Suizanzoshoku, 42(2): 345-349.
- Mohammady, N.G., Y.C.Chen, A. El-Mahdy, R.F.Mohammad. 2005. Physiological Responses of the Eustigmatophycean *Nannochloropsis salina* to Aqueous Diesel Fuel Pollution. *Oceanologia*. 47 (1) : 75-92
- Nagasawa, K. And E. Cruz-Lacierda. 2004. *Diseases of Cultured Groupers*. Government of Japan Trust Fund.
- Natzir, M.1998. *Metode Penelitian*. Ghalia Indonesia. Jakarta.212 hal.
- Noble, E.R. & G.A. Noble. 1989. *Parasitologi, Biologi Parasit Hewan* (terjemahan oleh Wardiarto, editor Noerhajati Soeripto). Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Nontji, Anugerah. 1986. *Laut Nusantara*. Jakarta : Djambatan.
- Nybakken, J.W. 1988. *Biologi Laut, suatu Pendekatan Ekologi*. Gramedia. Jakarta. 443 hal.
- Pikturalistiik, P. P. 2013. Toksisitas Effluent Di Balai Ipal Pup-Esdm D.I.Y Terhadap Struktur Mikroanatomihepar Ikan Mas (*Cyprinus Carpio.L*) Ditinjau Dari Kadar Pb Dan Cr. Skripsi. Fakultas Sains Dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Sunan Kalijaga. Yogyakarta.
- Poedjiadi, Anna. 1994. *Dasar-dasar Biokimia*. Universitas Indonesia Press. 212 hal.
- Prayitno Slamet B dan Nita Amelia. 2012. *Pengaruh Ekstrak Daun Jambu Biji (Psidium guajava) Untuk Menginaktifkan Viral Nervous Necrosis (VNN) Pada Ikan Kerapu Bebek (Epinephelus fuscoguttatus)*. Journal Of Aquaculture Management and Technology Volume 1, Nomor 1. Halaman 264-278
- Qodri, A. H A., Sudjihamo dan Anindiasuti. ] 999. *Pemilihan lokasi, haL 10-17. Dalam Pembenihan Ikan Kerapu Tikus (Cromileptes altivelis)*. Departemen Pertanian; Direktorat Jenderal Perikanan; Balai Budidaya Laut Lampung.
- Rachmawati, F. N., Untung Susilo dan Yulia Sistina. 2010. *Respon Fisiologi Ikan Nila (Oreochromis niloticus) Yang Distimulasi Dengan Daur Pemuasaan Dan Pemberian Pakan Kembali*. Seminar Nasional Biologi. Fakultas Biologi UGM, Yogyakarta 24-25 September 2010.
- Rahayu. 2009. *Monitoring Air di Daerah Aliran Sungai*. World Argoforestry Centre. Hlm 38.
- 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.

- Renaud S, Parry D, Thinh L-V, Kuo C, Padovan A, and Sammy N. 1991. Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. *Journal of Applied Phycology* 3(1):43-53
- Romimohtarto, K. 2004. *Meroplankton Laut*. Penerbit Djambatan, Jakarta.
- Rostini, I. 2007. "Kultur Fitoplankton (*Chlorella* sp. dan *Tetraselmis chuii*) Pada skala Laboratorium". Karya Ilmiah. Universitas Padjajaran Fakultas Perikanan dan Ilmu kelautan. Jatinagor
- Roza, D., Johnny and Yuasa K. 2003. *Viral diseases of grouper in Indonesia. Makalah pada Training on Grouper Hatchery Seed Production*. Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol – NACA Bangkok. Gondol 1 – 21 Mei 2003.
- Rubenstein PA (1990). *The functional importance of multiple actin isoforms*. *Bioessays* 12, 309–315.
- Salmin. 2005. *Oksigen Terlarut (DO) dan Kebutuhan Oksigen Biologi (BOD) Sebagai Salah Satu Indikator untuk Menentukan Kualitas Perairan*. ISSN Vol. 30. No. 30.
- Schaperclaus, W. 1992. *Fish Disease*. Vol 1. Ed. W. Schaperclaus, H. Kulow, K. Schreckenbach, a.A. balkema. Rotterdam. 596 p.
- Soegoto, Edi S. 2008. *Marketing Research*. Elex Media Komputindo, Jakarta.
- Subowo. 1993. *Imunobiologi*. Penerbit Angkasa. Bandung. 233 hal.
- Sugama, K., Tridjoko, B. Slamet, S. Ismi, E. Setadi, dan S. Kawahara. 2001. *Petunjuk teknis produksi benih ikan kerapu bebek, Cromileptes altivelis*. BBRPBL, Pusris., DKP dan JICA. 40p
- Sugama, K. 2003. *Manual for humpback grouper culture (Cromileptes altivelis) in floating net cages*. Gondol Research Institute for mariculture and Japan International Cooperation Agency. P. 1-3.
- Sugama Ketut., Michael A. Rimmer., Suko Ismi., Isti Koesharyani., Ketut Suwiry., N.A. Giri., dan Veronica R. Alava. 2013. *Pengelolaan Pembenihan Kerapu Macan (Epinephelus fuscoguttatus): suatu panduan praktik terbaik*. Monograf ACIAR No. 149a. Australian Centre for International Agricultural Research: Canberra. 66 hal.
- Sugianti, Budi. 2005. *Pemanfaatan Tumbuhan Obat Tradisional dalam Pengendalian Penyakit Ikan*. Makalah falsafah Sains IPB. Bogor.
- Sukenik, A., Livne, A., Neori, A., Yacobi, Y. Z., Katcoff, D. 1992. *Purification and characterization of A light-harvesting chlorophyll–protein complex from the marine eustigmatophyte Nannochloropsis sp.* *Plant Cell Physiol.*, 33, pp. 1041–1048.



- Sulaksono, E. M., Pudjoprajitno, S. S. Yuwono., dan K. Patra. Keadaan dan Masalah Hewan Percobaan di Indonesia. Buletin Penelitian Kesehatan. 14(3) : 35-46
- Suratmi, Sri Dan Ni Luh Tati Aryani. 2008. *Kasus Infeksi Penyakit Viral Nervous Necrosis (VNN) Pada Ikan Kerapu Di Pulau Bali*. Buletin Teknik Literatur Akuakultur. Vol.7. (1).
- Surakhmad, W. 1998. *Pengantar Penelitian Ilmiah Dasar Metoda Teknik*.Torsito Press.Bandung. 139 hal.
- Sutrisno, C. T dan E. suciastuti. 2002. *Teknologi Penyediaan Air Bersih*. Rineka Cipta: Jakarta 32, 73.
- Taw. 1990. *Petunjuk Kultur Murni dan Massal Mikroalga*. UNDP. FAO.
- Tridjoko, B. Slamet., T. Aslianti, Wardoyo, S. Ismi, J.H. Hutapea, K.M. Setiawati, I. Rusdi, D. Makatutu, A. Prijoni, T. Setiadharna, H. Matsuda, and S. Kumagai. 1999. *The seed production technique of humback grouper, Cromileptes altivelis*. Japan International Cooperation Agency (JICA) and Gondol Research Station For Coastal Fisheries (GRSCF). 56p.
- Tuominen, VJ., Ruotoistenmaki, S., Viitanen, A., Jumppanen, M., Isola, J. 2010. *ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67*. Breast Cancer Res 12: R56. doi: 10.1186/bcr2615
- Varghese, F., Bukhari, A. B., Malhotra, R., De, A. 2014. *IHC profiler: An open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples*. PLoS ONE, 9 (5) , art. no. e96801
- Weis, Virginia M., E. Alan Verde., Wendy S and Reynold. 2002. *Characterization of A Short Form Peridinin-Chlorophyll Protein (PCP) cDNA and Protein From the Symbiotic Dinoflagellate Symbiodium muscatinei (Dinophyceae) From the sea Anemone Anthopleura elegantissima (Cnidaria)*. J. Phycol 38: 157-163.
- Yanuhar, U. 2012. *Eksplorasi Karakter Molekul Peridinin Chlorophyl Cell Pigmen (PCP) Alga Nannochloropsis oculata dan Halimeda sp: Upaya Pengembangan Pengendalian Penyakit Virus Pada Ikan Berbasis Bahan Hayati*. Laporan Akhir Hasil Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Hibah Pascasarjana(Tahun ke-1) Tahun Anggaran 2012.
- Yanuhar, U. 2013. *Program Penelitian Unggulan Dikti Dengan Program Unggulan Hibah Pasca Sarjana Tahun 2012*. Dengan Surat Perjanjian No.0636/023-04.2.16/15/2012 Dan Program Penelitian Unggulan BOPTN Tahun 2013 Dengan Surat Perjanjian No.528/Un 10.21/Ku/2013 Tanggal 16 Mei 2013
- Yanuhar, U. 2015. *Effects of Pigment-Protein Fraction from Nannochloropsis oculata on TNF $\alpha$  and IL-6 which Act as an Anti-Inflammatory Against Viral Nervous Necrosis (VNN) Infection*. Procedia Chemistry 14 ( 2015 ) 437 –

443. Faculty of Fisheries and Marine Science, University of Brawijaya. Malang.

Yoshikoshi, K. and Inoue, K. 1990. *Viral Nervous Necrosis in hatchery larvae and juvenils of Japanese parrotfish, Oplegnathus fasciatus (Temminck & Schelgel)*. *J. Fish Dis.* 13: 69-77.

Yuasa K., Koesharyani, I., D. Roza., K. Mahardika, F. Jhonny, dan Zafran. 2001. *Penuntun Diagnosa Penyakit Ikan II. Penyakit Ikan Laut dan Krustacea di Indonesia*. Balai Penelitian Perikanan Laut Gondol-Singaraja. 49 pp.

Yukio M., Leobert d. De la pena and Erlinda R. Cruz-lacierda. 2007. *Susceptibility of Fish Species Cultured in Mangrove*. Southeast Asian Fisheries Development Center (SEAFDEC). Tiqbauan 5021, Iloilo, Philippines.

Yushimitsu, T.,H.Eda, and K.Hiramatsu, 1986. *Groupers Final Report Marineculture Research and Development in Indonesia*. ATA-192, JICA pp 103 – 129.

Zafran, K.I., F. Johnny., K. Yuasa., T. Harada. dan K. Hatai. 2000. *Viral Nervous Necrosis in Humpback Grouper *Cromileptes altivelis* Larvae and Juveniles In Indonesia*. *Fish Pat hol.* 35: 95 - 96.





LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Pertumbuhan Berat Badan Ikan Kerapu Tikus

Perlakuan	Hari Ke- (gr)						Pertumbuhan Total	Rata-rata Per-hari
	0	6	9	14	19	24		
Ikan Kontrol	46	48,6	50,2	52	56,7	66,8	20,8	0,78
Ikan + FPP	46	48	50	51	52	54	8	0,29
Ikan + VNN	47	48	50	50	-	-	-	-
Ikan + FPP + VNN	47	47,9	49	50	51,8	52,7	5,7	0,21

Lampiran 2. Penentuan dosis FPP untuk perlakuan pada ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*)

- Konsentrasi FPP hasil isolasi dari mikroalga *N. oculata* adalah 0,067 mg/ml (67µg/ml)
- Dosis pemberian pada perlakuan 33,3 µg/ml per 150 g ikan
- Pengenceran FPP untuk mendapatkan konsentrasi 33,3 µg/ml dalam 1 ml, dilakukan pengenceran dengan Tris HCL 0,5 N dengan pH 8,6

$$\begin{aligned}
 V1 \times N1 &= V2 \times N2 \\
 10 \text{ ml} \times 1651 \text{ µg/ml} &= V2 \times 33,3 \text{ µg/ml} \\
 16510 &= V2 \times 33,3 \text{ µg/ml} \\
 16510 / 33,3 &= V2 \\
 495,7 &= V2
 \end{aligned}$$

Untuk mendapatkan konsentrasi 33,3 µg/ml, dilakukan dengan penambahan Tris HCL 0,5 N dengan pH 8,6 sebanyak 495,7 ml.

- Dosis yang diberikan pada setiap penyondean :

**Penyondean ke-1**

$$\begin{aligned}
 1000 \text{ µl} / 150 \text{ gr} &= V2 / 47 \\
 6,666666667 &= V2 / 47 \\
 6,66 \times 47 &= V2 \\
 313 &= V2
 \end{aligned}$$

**Penyondean ke-2**

$$1000 \text{ µl} / 150 \text{ gr} = V2 / 47,9$$



$$\begin{aligned}
 6,666666667 &= V2 / 47,9 \\
 6,66 \times 47,9 &= V2 \\
 319 &= V2
 \end{aligned}$$

**Penyondean ke-3**

$$\begin{aligned}
 1000 \mu\text{l} / 150 \text{ gr} &= V2 / 49 \\
 6,666666667 &= V2 / 49 \\
 6,66 \times 49 &= V2 \\
 326 &= V2
 \end{aligned}$$

**Penyondean ke-4**

$$\begin{aligned}
 1000 \mu\text{l} / 150 \text{ gr} &= V2 / 50 \\
 6,666666667 &= V2 / 50 \\
 6,66 \times 50 &= V2 \\
 333 &= V2
 \end{aligned}$$

**Penyondean ke-5**

$$\begin{aligned}
 1000 \mu\text{l} / 150 \text{ gr} &= V2 / 51,8 \\
 6,666666667 &= V2 / 51,8 \\
 6,66 \times 51,8 &= V2 \\
 345 &= V2
 \end{aligned}$$

**Penyondean ke-6**

$$\begin{aligned}
 1000 \mu\text{l} / 150 \text{ gr} &= V2 / 52,7 \\
 6,666666667 &= V2 / 52,7 \\
 6,66 \times 52,7 &= V2 \\
 351 &= V2
 \end{aligned}$$

**Lampiran 3.** Penentuan Dosis pakan dengan daging positif *Viral Nervous Necrosis* (VNN) untuk uji klinis pada ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*)

- Konsentrasi protein VNN adalah 0,320 mg/ml = 320 µg/ml
- Tiap 1 gram daging ikan mengandung protein VNN = 320 / 2 (1 ml/500 µl) = 160 µg/ml
- Dosis uji klinis pada ikan adalah 0,51 mg/ml (510 µg/ml tiap 150 g ikan) (Yanuhar, 2012)
- Dosis pemberian pakan uji dengan VNN adalah sebagai berikut:

**Hari ke-14** Berat badan ikan 50 g.

$$\begin{aligned}
 &= 510 / (150 / 50) \\
 &= 170 \\
 &= 170 / \text{konsentrasi perotein dalam 1 g (160 } \mu\text{g/ml)} \\
 &= 1,06 \text{ gr}
 \end{aligned}$$

Jadi, pada hari ke-14 pemberian pakannya sebanyak **1,06 gr**.





**Hari ke-19** Berat badan ikan 51,8 g.

$$= 510 / (150 / 51,8)$$

$$= 176,12$$

$$= 176 / 160 \mu\text{g/ml}$$

$$= 1,1 \text{ g.}$$

Pada hari ke-19 pemberian pakannya sebanyak **1,10 gr.**

**Hari ke-24** Berat badan ikan 51,8 g.

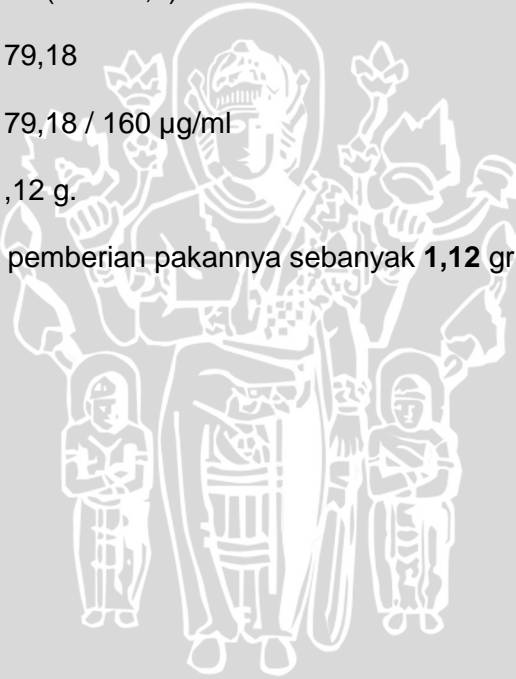
$$= 510 / (150 / 52,7)$$

$$= 179,18$$





$$= 179,18 / 160 \mu\text{g/ml}$$

$$= 1,12 \text{ g.}$$


Pada hari ke-24 pemberian pakannya sebanyak **1,12 gr.**



Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian

Kegiatan	Keterangan
	Proses pemanenan
	Proses penyaringan
	Proses penimbangan
	Proses penggerusan



	<p>Penambahan nitrogen cair</p>
	<p>Proses sentrifuge</p>
	<p>Proses spektrofotometri</p>
	<p>Proses penyondean</p>

Lampiran 5. Analisa data RAL

Tabel analisa sidik ragam

Ulangan	Perlakuan				TOTAL
	Kontol	FPP	VNN	FPP+VNN	
1	25,7	52,5	54,0	60,2	192,4
2	29,8	54,1	60,4	67,8	212,1
3	25,6	59,8	61,2	68,2	214,8
Total	81,1	166,4	175,6	196,2	619,3
Rata-rata	27,0	55,4	58,5	65,4	

a = 4

n = 3

an = 12

kuadrat = 2

\*db

dbt =  $\Sigma n - 1$

= 12 - 1

= 11

dbp = t - 1

= 4 - 1

= 3

dbg = t (r - 1)

= 4(3 - 1)

= 8

a)  $FK = Y_{ij}^2 / r \cdot t$

=  $(619,3)^2 / 3 \cdot 4$

=  $383532,49 / 12$

= 31961,04

b)  $JKT = \Sigma (y_{ij})^2 - FK$

=  $34644,71 - 31961,04$

= 2683,67

c)  $JKP = (\Sigma (\Sigma y_{ij})^2 / r) - FK$

=  $(103595,97 / 3) - 31961,04$

=  $34531,99 - 31961,04$

= 2570,95

d)  $JKG = JKT - JKP$

=  $2683,67 - 2570,95$

= 112,72

e)  $KT$  (Kuadrat Tengah)

$KTP = JKP / dbp = 2570,95 / 3$

= 856,98

$KTG = JKG / dbg = 112,72 / 8$

= 14,09

f)  $F \text{ hit} = KTP / KTG$

=  $856,98 / 14,09$

= 60,82

Tabel anova

SK	DB	JK	KT	FHIT	F tabel 5%
A	3	2570,95	856,98	60,82	4,07
Galat	8	112,72	14,09		
Total	11	2683,67			

Perhitungan Nilai BNT Perlakuan :



$$\begin{aligned}
 \text{SED} &= \frac{\sqrt{2 \text{KTG}}}{n \text{ (perlakuan)}} \\
 &= \frac{\sqrt{2 \times 14,09}}{4} \\
 &= 1,327
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{BNT } 5\% &= T \text{ Tabel } 5\% \cdot \text{SED} \\
 &= 2,31 \cdot 1,327 \\
 &= 3,065
 \end{aligned}$$

**Tabel BNT**

Rata-rata B Aktin	27,03	55,47	58,53	65,40	notasi	BNT
27,03					a	3,06
55,47	28,43				b	
58,53	31,50	3,07			c	
65,40	38,37	9,93	6,87		d	

