

repository.ub.ac.id

**PEMANFAATAN FRAGMEN PIGMEN PROTEIN (FPP) MIKROALGA *Chlorella vulgaris* TERHADAP EKSPRESI  $\alpha$ -AKTIN PADA IKAN KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*)**

**SKRIPSI**

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

Oleh :

**FARIQ MAGHFIROH WALL HABSHI  
NIM. 115080101111088**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2016**



repository.ub.ac.id

**PEMANFAATAN FRAGMEN PIGMEN PROTEIN (FPP) MIKROALGA *Chlorella vulgaris* TERHADAP EKSPRESI  $\alpha$ -AKTIN 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 :

**FARIQ MAGHFIROH WALL HABSHI  
NIM. 115080101111088**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2016**

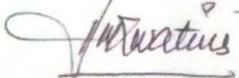


SKRIPSI  
PEMANFAATAN FRAGMENT PIGMEN PROTEIN (FPP) MIKROALGA *Chlorella vulgaris* TERHADAP EKSPRESI  $\alpha$ -AKTIN PADA IKAN KERAPU TIKUS  
(*Cromileptes altivelis*)

Oleh :  
FARIQ MAGHFIROH WALL HABSHI  
NIM. 115080101111088

telah dipertahankan didepan penguji  
pada tanggal 2016  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat  
SK Dekan No. :  
Tanggal :

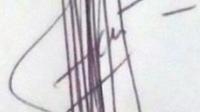
Dosen penguji I



Ir. Herwati Umi Subarijanti, MS  
NIP. 19520402 198003 2 001

Tanggal : 13 JAN 2016

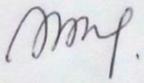
Menyetujui,  
Dosen Pembimbing I



Ir. Kusrini, MP  
NIP. 19560417 198403 2 001

Tanggal : 13 JAN 2016

Dosen Pembimbing II



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

Tanggal :

13 JAN 2016

Mengetahui,  
Ketua Jurusan



Dr. Ir. Arning Wilujeng Ekawati, MS  
NIP. 19620805 198603 2 001

Tanggal :

13 JAN 2016



## 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, 5 Januari 2016

Mahasiswa,



FARIQ MAGHFIROH W. H.  
NIM. 115080101111088

## 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 kepada sepasang bidadari (ibundaku tercinta dan kakakku terkasih) yang telah setia menghantarkan dan mendoakan saya hingga jenjang S1.
- Ucapan terima kasih yang sebesar – besarnya kepada Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si dan Ir. Kusriani MP selaku dosen pembimbing yang telah bersedia memberikan ilmunya dengan suka rela serta saran yang membangun hingga laporan ini selesai.
- Ucapan terima kasih yang sebesar – besarnya kepada Ir. Herawati Umi S. MS dan Dr. Ir. Mohammad Mahmudi, MS yang telah bersedia untuk menjadi dosen penguji dari penulis dalam ujian Skripsi.
- Ucapan terimakasih kepada FOKSI, HUMANERA dan teman-teman kontrakan yang menginspirasi.
- Ucapan terimakasih kepada (Tim Algae) Ach. Khumaidi, Amira Masitha, Hendra Saputra, Dian Novalisa, Yovan Endik, M. Ainul Yaqin sebagai pendamping yang selalu setia menemani dan membantu proses Skripsi.
- Untuk Sahabat 5 Menara (Eko Hardianto, Agus Fani, Indah Izza, Lia Faiqotul) atas doa, dukungan, hiburan dan semangat, sampai jumpa di menara masing-masing.
- Untuk kawan-kawan kontrakan yang senantiasa memberi doa, semangat, hiburan dan ilmu-ilmu baru “tetap semangat, rendah hati and keep smile”.
- Kepada semua kawan-kawan jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan angkatan 2011 yang tak henti memberikan saran atas terselesainya laporan Skripsi ini.
- Ucapan terimakasih untuk kalian yang pernah bertemu dengan saya karena kalian telah memberikan pengetahuan, inspirasi dan pengalaman yang luar biasa kepada saya. Tidak ada yang namanya kebetulan di duniaini.

## RINGKASAN

**FARIQ MAGHFIROH WALL HABSHI.** Skripsi tentang PEMANFAATAN FRAGMEN PIGMEN PROTEIN MIKROALGA *Chlorella vulgaris* TERHADAP EKSPRESI  $\alpha$ -AKTIN PADA IKAN KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*) (dibawah bimbingan Ir. Kusriani, MP dan Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si)

---

Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) merupakan salah satu ikan laut yang berprospek sangat baik, namun tingkat permintaannya berbanding terbalik dengan tingkat ketersediaan. Munculnya hambatan tersebut dikarenakan terjadinya serangan penyakit yang berujung pada kematian massal, hal tersebut diduga sistem imun atau kekebalan tubuh *C. altivelis* pada usia larva masih lemah dan belum mampu untuk melawan benda asing yang masuk kedalam tubuh. *Chlorella* adalah genus gangga hijau bersel tunggal yang hidup diartawar, laut dan tempat basah. Banyak nutrisi yang terkandung didalam *C. vulgaris*, seperti *Fragmen Pigmen Protein* (FPP). Cara untuk memperoleh FPP dari dalam sel yaitu dengan mengisolasi protein menggunakan teknik manual maupun menggunakan teknologi seperti pemisahan molekul dengan sentrifuge. FPP sebagai agen hayati memiliki fungsi sebagai imunostimulan yang mampu merespon kekebalan fisik pada organisme vertebrata.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian FPP dari mikroalga *C. vulgaris* yang diujikan secara in vivo pada ikan kerapu tikus dengan melihat ekspresi  $\alpha$ -aktin. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen dengan teknik pengambilan data primer dan data sekunder. Data primer dalam penelitian ini dari hasil observasi dan partisipasi aktif. Data primer yaitu Hasil analisa FPP mikroalga *C. vulgaris*. Data sekunder diperoleh dari jurnal, internet serta kepustakaan penunjang lain. Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah FPP mikroalga laut *C. vulgaris* yang diujikan secara klinis pada ikan Kerapu Tikus. Hal ini dilakukan untuk mengetahui efek dari pemberian materi nabati untuk meningkatkan sistem imun yang dilihat dari munculnya alfa actin. FPP didapatkan dari isolasi protein mikroalga laut *C. vulgaris* menggunakan metode pelarutan FPP dengan aseton dan dibuktikan dengan Profil FPP dengan metode SDS-PAGE. Ikan Kerapu Tikus yang digunakan sebagai hewan uji adalah berukuran  $\pm$  13-15 cm yang berasal dari BBAP Situbondo.

Hasil yang didapatkan dari uji kandungan essential pada mikroalga ini adalah klorofil-a sebesar 4,27 mg/l, klorofil-b sebesar 4,32 mg/l serta  $\beta$ - karoten sebesar 3,50 mg/l. Berdasarkan hasil berat molekul yang tampak, dapat diindikasikan bahwa FPP dari mikroalga *C. vulgaris* berupa *Piridin Chlorophyl Protein* (PCP), yang memiliki dua *piridin* yaitu bentuk monomer (bentuk panjang) dengan berat molekul 33 kDa dan bentuk homodimer (bentuk pendek) dengan massa molekul (berat molekul) 14 kDa. Pengamatan ekspresi  $\beta$ -aktin pada organ hati ikan Kerapu Tikus dilakukan dengan menggunakan *immunoratio*. Pada organ hati ikan kontrol tampak warna kuning kecoklatan yang menandakan adanya ekspresi  $\alpha$ -aktin. Pada ikan kontrol DAB rata-rata ekspresi  $\alpha$ -aktin sebesar 27,3%, pada ikan dengan pemberian FPP nilai rata-rata DAB sebesar 40,83%, dan ikan dengan penginfeksi VNN nilai DAB rata-ratanya sebesar 43,86%, serta terlihat adanya beberapa kerusakan yang terjadi seperti kerusakan vakuolis (ruang kosong) dan necrosis(pembengkakan). Sedangkan setelah diberikan perlakuan penginduksian FPP dan pemberian VNN terjadi peningkatan ekspresi  $\alpha$ -aktin yang cukup tinggi yaitu sebesar 63,13 %. Hasil

pengukuran kualitas air yaitu, suhu perairan berkisar antara 28-31°C, salinitas berkisar antara 29-30‰, pH memiliki nilai 7,6-7,9 sedangkan hasil pengukuran oksigen terlarut (DO) memiliki kisaran antara 5,3-6,2 mg/l .

Kesimpulan dari penelitian ini adalah bahwa FPP yang ditemukan dalam *C. vulgaris* berupa PCP, yang memiliki dua *piridinin* yaitu bentuk monomer (bentuk panjang) dengan berat molekul 33 kDa dan bentuk homodimer (bentuk-pendek) dengan berat molekul 15 kDa. Pemberian Fragmen pigmen protein (FPP) mikroalga *C. vulgaris* mampu meningkatkan ekspresi aktin. Pada ikan kontrol DAB rata-rata ekspresi  $\alpha$ -aktin sebesar 27,3%, pada ikan dengan pemberian FPP nilai rata-rata DAB sebesar 40,83% ikan dengan penginfeksian VNN nilai DAB rata-ratanya sebesar 43,86%, dan ikan dengan penginduksian FPP dan penginfeksian VNN nilai DAB rata-ratanya sebesar 63,13%. *Peridinin chlorophyll protein* (PCP) yang terkandung dalam *C. vulgaris* mampu menjadi biokatalisator terekpresinya  $\alpha$ -aktin. Peningkatan ekspresi  $\alpha$ -aktin dalam penelitian ini menjadi indikator peningkatan respon imun pada ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*).

Saran yang dapat diberikan pada penelitian ini adalah Perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mengeksplorasi pemanfaatan sumberdaya hayati laut dalam menanggulangi serangan penyakit dan virus yang menyerang ikan kerapu tikus.



## KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan syukur kehadiran Allah SWT karena atas berkat limpahan rahmat, taufik dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan laporan skripsi yang berjudul PEMANFAATAN FRAGMENT PROTEIN MIKROALGA *Chlorella vulgaris* TERHADAP EKSPRESI  $\alpha$ -AKTIN PADA IKAN KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*). Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat meraih gelar sarjana Perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

Sangat disadari bahwa dengan kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis, walaupun telah dikerahkan segala kemampuan untuk lebih teliti, tetapi masih dirasakan banyak kekurangtepatan, oleh karena itu penulis mengharapkan saran yang membangun agar tulisan ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, 5 Januari 2016

Penulis

DAFTAR ISI

1.	<u>PENDAHULUAN</u> .....	1
1.1	<u>Latar Belakang</u> .....	1
1.2	<u>Rumusan Masalah</u> .....	4
1.3	<u>Tujuan</u> .....	4
1.4	<u>Manfaat</u> .....	5
1.4.1	<u>Manfaat Teoritis</u> .....	5
1.4.2	<u>Manfaat Praktis</u> .....	5
1.5	<u>Tempat dan Waktu</u> .....	5
2.	<u>TINJAUAN PUSTAKA</u> .....	6
2.1	<u>Mikroalga <i>Chlorella vulgaris</i></u> .....	6
2.1.1	<u>Klasifikasi <i>Chlorella vulgaris</i></u> .....	7
2.1.2	<u>Morfologi</u> .....	7
2.1.3	<u>Biologi dan Habitat</u> .....	8
2.1.4	<u>Fase Pertumbuhan <i>Chlorella vulgaris</i></u> .....	10
2.1.5	<u>Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan <i>Chlorella vulgaris</i></u> .....	12
2.1.6	<u>Pemanfaatan <i>Chlorella vulgaris</i></u> .....	14
2.2	<u>Klorofil</u> .....	16
2.2.1	<u>Pengertian Klorofil</u> .....	16
2.2.2	<u>Struktur Klorofil</u> .....	17
2.2.3	<u>Peran dan Fungsi Klorofil</u> .....	17
2.3	<u>Kerapu Tikus</u> .....	18
2.3.1	<u>Klasifikasi</u> .....	18
2.3.2	<u>Morfologi</u> .....	19
2.3.3	<u>Habitat dan Penyebaran</u> .....	20
2.3.4	<u>Reproduksi</u> .....	20
2.3.5	<u>Kebiasaan makan</u> .....	21
2.4	<u>Sistem Pertahanan Tubuh Ikan</u> .....	22
2.4.1	<u>Sistem Imun Non Spesifik</u> .....	23
2.4.2	<u>Sistem Imun Spesifik</u> .....	24
2.4.3	<u>Sel B (<i>BCR/B-Cell Receptor</i>)</u> .....	25
2.4.4	<u>Sel T (<i>TCR/ T-Cell Receptor</i>)</u> .....	26
2.5	<u>Peran <math>\alpha</math>-aktin dalam Sistem Imun</u> .....	27
3.	<u>METODE PENELITIAN</u> .....	29



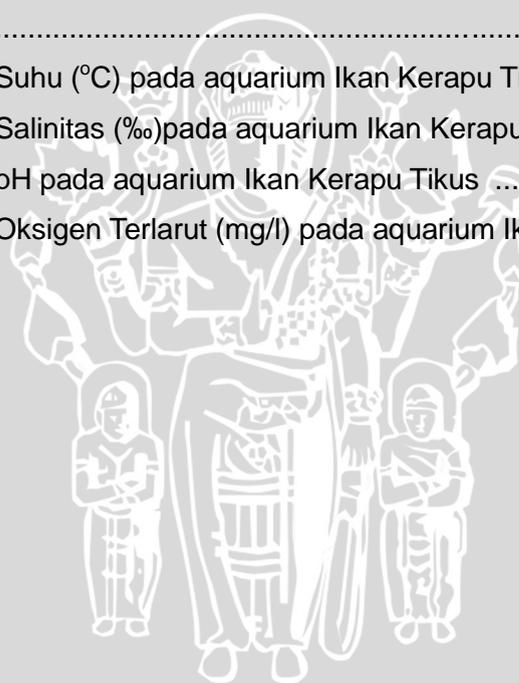
3.1	<u>Materi Penelitian</u> .....	29
3.2	<u>Alat dan Bahan</u> .....	29
3.3	<u>Metode Penelitian</u> .....	30
3.4	<u>Teknik Pengambilan Sampel</u> .....	30
3.4.1	<u>Data Primer</u> .....	31
3.4.2	<u>Data Sekunder</u> .....	32
3.5	<u>Prosedur Penelitian</u> .....	32
3.5.1	<u>Sterilisasi Alat</u> .....	32
3.5.2	<u>Kultur Mikroalga</u> .....	33
3.5.3	<u>Proses Ekstraksi Klorofil Mikroalga</u> .....	35
3.5.4	<u>Pengukuran Klorofil</u> .....	36
3.5.5	<u>Elektroforesis Protein SDS-PAGE (<i>Sodium deodecyl poliakrilamide gel electrophoresis</i>)</u> .....	37
3.5.6	<u>Pengukuran Berat Molekul Protein Sampel</u> .....	41
3.5.7	<u>Uji Invivo Pada Ikan</u> .....	41
3.5.8	<u>Isolasi Protein Organ Ikan</u> .....	43
3.5.9	<u>IMUNOHISTOKIMIA (IHK)</u> .....	43
4.	<u>PEMBAHASAN</u> .....	45
4.1	<u>Kultur Mikroalga <i>Chlorella vulgaris</i></u> .....	45
4.2	<u>Isolasi Protein <i>C. vulgaris</i></u> .....	48
4.2.1	<u>Isolasi Fragmen Pigmen Protein (FPP) <i>C. vulgaris</i></u> .....	49
4.2.2	<u>Isolasi Klorofil dan Karotenoid <i>C. vulgaris</i></u> .....	50
4.3	<u>Analisis Fragmen Pigmen Protein (FPP) <i>C. vulgaris</i></u> .....	51
4.3.1	<u>Analisis Kualitatif</u> .....	51
4.3.2	<u>Analisis Kuantitatif</u> .....	54
4.4	<u>Uji in Vivo pada Ikan Kerapu Tikus</u> .....	55
4.5	<u>Hasil Uji Immunohistokimia <math>\alpha</math>-aktin Pada Organ Hati Ikan Kerapu Tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>)</u> .....	58
4.5.1	<u>Organ Hati Ikan Kontrol</u> .....	59
4.5.2	<u>Organ Hati Ikan dengan Pemberian Fragmen Pigmen Protein (FPP)</u> 61	
4.5.3	<u>Organ Hati Ikan Perlakuan VNN</u> .....	63
4.5.4	<u>Organ Hati Ikan Perlakuan FPP dan VNN</u> .....	65
4.6	<u>Profil Aktin Pada Organ Hati Ikan Kerapu Tikus (<i>C. altivelis</i>)</u> .....	67
4.7	<u>Analisis Data</u> .....	69
4.8	<u>Kualitas Perairan Pemeliharaan Ikan Kerapu Tikus</u> .....	72
4.8.1	<u>Suhu</u> .....	72

4.8.2	<u>Salinitas</u> .....	73
4.8.3	<u>Derajat Keasaman</u> .....	74
4.8.4	<u>Oksigen Terlarut</u> .....	75
5.	<u>PENUTUP</u> .....	77
5.1	<u>Kesimpulan</u> .....	77
5.2	<u>Saran</u> .....	77
	<u>DAFTAR PUSTAKA</u> .....	78



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Perbedaan Imunitas Spesifik Humoral dan Selular .....	27
2. Perhitungan Berat Molekul Band Pita Marker.....	52
3. Perhitungan Berat Molekul Band Protein <i>C. vulgaris</i> .....	53
4. Kandungan esensial <i>C. vulgaris</i> .....	54
5. Peforma atau Respon Ikan Selama Pemeliharaan .....	58
6. Data Hasil Penelitian.....	70
7. Analisa Keragaman (ANOVA) DAB $\beta$ -aktin setiap perlakuan.....	70
8. Hasil Uji BNT .....	71
9. Hasil Pengukuran Suhu ( $^{\circ}$ C) pada aquarium Ikan Kerapu Tikus .....	72
10. Hasil Pengukuran Salinitas (‰)pada aquarium Ikan Kerapu Tikus .....	73
11. Hasil Pengukuran pH pada aquarium Ikan Kerapu Tikus .....	74
12. Hasil Pengukuran Oksigen Terlarut (mg/l) pada aquarium Ikan Kerapu Tikus .	75



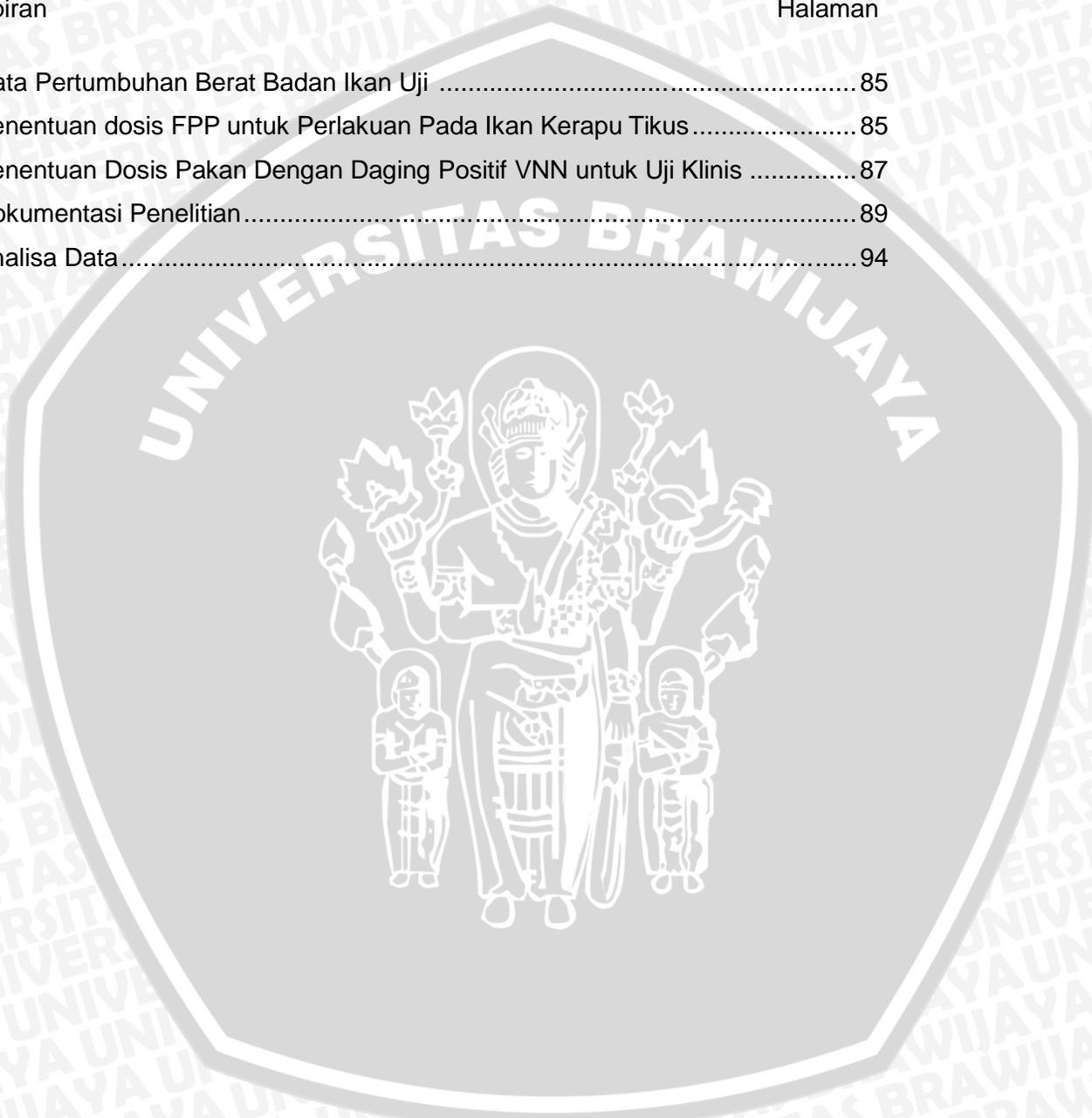
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Chlrella vulgaris</i> .....	7
2. Struktur Sel <i>C. vulgaris</i> .....	8
3. Proses terbentuknya anak sel .....	9
4. Kurva Pertumbuhan mikroalga .....	12
5. Struktur klorofil a dan klorofil b .....	17
6. Morfologi ikan kerapu tikus ( <i>Cromileptes altivelis</i> ) .....	19
7. Gambaran umum sistem imun vertebrata .....	23
8. Inokulasi .....	45
9. Kultur Murni 1 dengan menggunakan toples berkapsitas 1-2 liter .....	46
10. Kultur Murni 2 dengan menggunakan toples berkapsitas 10 liter .....	47
11. Tahap kultur intermediet atau semi massal .....	48
12. Penyimpanan Bubur <i>C. vulgaris</i> didalam falcon 50 ml .....	48
13. Proses Penggerusan <i>C. vulgaris</i> .....	49
14. (A) Sentrifuge dan (B) Supernatan .....	50
15. (A) Marker (B) Hasil SDS-PAGE Protein <i>C. vulgaris</i> .....	52
16. Grafik linear pita protein marker <i>C. vulgaris</i> .....	53
17. Teknik penyondean FPP pada ikan kerapu tikus ( <i>C. altivelis</i> ) .....	56
18. Hasil Pengamatan Profil organ hati ikan kontrol .....	59
19. Grafik dan histogram dengan menggunakan software imageJ pada organ hati ikan kontrol .....	60
20. Hasil Pengamatan Profil organ hati ikan perlakuan FPP .....	61
21. Grafik dan histogram dengan menggunakan software imageJ pada organ hati ikan perlakuan FPP .....	62
22. Hasil Pengamatan Profil organ hati ikan perlakuan VNN .....	63
23. Grafik dan histogram dengan menggunakan software imageJ pada organ hati ikan perlakuan VNN .....	64
24. Hasil Pengamatan Profil organ hati ikan perlakuan FPP dan VNN .....	65
25. Grafik dan histogram dengan menggunakan software imageJ pada organ hati ikan perlakuan FPP dan VNN .....	66



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Data Pertumbuhan Berat Badan Ikan Uji .....	85
2. Penentuan dosis FPP untuk Perlakuan Pada Ikan Kerapu Tikus .....	85
3. Penentuan Dosis Pakan Dengan Daging Positif VNN untuk Uji Klinis .....	87
4. Dokumentasi Penelitian .....	89
5. Analisa Data .....	94



## DAFTAR ISTILAH

$\alpha$ - aktin	Gen <i>Houskeeping</i> dan merupakan bagian penting dari sitoskeleton sel, yang terkespresi pada hampir semua sel eukariotik dan terlibat dalam mengendalikan fungsi dasar pembenahan seperti penyusunan dan pemeliharaan bentuk sel, migrasi, pembelahan, perkembangan dan pensinyalan sel.
Aktin	Protein globular dengan massa sekitar 42-kDa yang memiliki berbagai fungsi dasar migrasi sel hingga transpor membran.
<i>Antibodi</i>	Molekul yang terbentuk dalam tubuh hewan dan manusia sebagai tanggapan terhadap adanya antigen.
Antigen	Substansi yang biasanya berupa protein yang mampu menstimulasi organisme untuk memproduksi antibodi dan mampu berkombinasi sehingga diproduksi antibodi.
<i>Antiviral</i>	Suatu agen yang secara eksperimental menghambat proliferasi dan kelangsungan hidup virus menular
<i>Histologi</i>	Ilmu yang menguraikan struktur hewan dan hubungan antara struktur pengorganisasian sel dan jaringan serta fungsi-fungsi yang mereka lakukan
<i>Histopatologi</i>	Gambaran keadaan jaringan organisme yang terpapar patogen
<i>Infeksi</i>	Pengenalan agen infeksi seperti virus atau bakteri ke dalam host sel atau organisme.
<i>immunity</i>	Sistem imun yang berperan melawan protein tubuh dan molekul lain seperti yang terjadi pada autoimun dan melawan sel yang teraberasi.
<i>Isolasi</i>	Memisahkan dan memurnikan suatu substansi
<i>Jaringan</i>	Sekumpulan sel yang tersimpan dalam suatu kerangka struktur atau matriks yang mempunyai suatu kesatuan organisasi yang mampu mempertahankan keutuhan dan penyesuaian terhadap lingkungan di luar batas dirinya
Limfosit B	Sel-sel dalam sistem imun yang mengkhususkan diri dalam pembentukan antibodi
Limfosit T	Sel-sel yang berperan pada berbagai fungsi imunologi yang berbeda, yaitu sebagai efektor pada respons imun seluler dan sebagai regulator yang akan mengatur kedua respons imun
Limfokin	Merupakan bagian dari sitokin yang dihasilkan oleh suatu sel imun yang juga diketahui sebagai limfosit.
<i>Necrosis</i>	Sekelompok sel yang mengalami perubahan atau kematian tanpa terprogram

<i>Preparasi jaringan</i>	Teknik pemotongan organ target penyakit virus tertentu untuk memudahkan dalam proses jaringan
<i>Prokariotik</i>	Organisme yang tidak memiliki membran inti
Organ	Sekumpulan sel atau sekumpulan jaringan dapat dikombinasikan menjadi suatu struktur untuk mengerjakan fungsi tertentu di dalam tubuh
<i>Reseptor</i>	Bagian target pada tingkat molekuler yang mengelilingi substansi sebagai hasil dari interaksi spesifik. Bagian organisme yang merespon terhadap stimuli spesifik seperti chemoreseptor, osmoreseptor atau potoreseptor
Sistem Imun	System pertahanan atau kekebalan tubuh, yang terdiri dari Sistem imun <i>Innate</i> dan Sistem imun <i>Adaptive</i>
Sistem imun <i>Adaptive</i>	Sistem imun dapatan yang mempunyai ciri ;(1) memiliki spesifitas yang dapat membedakan tiap-tiap molekul dari agen penginfeksi dan (2) memiliki sistem memori yang mampu untuk mengingat agen penginfeksi yang pernah masuk atau terpapar di dalam tubuhnya
Sistem imun <i>Innate</i>	Sistem kekebalan alami atau system imun non spesifik yang merupakan pertahanan tubuh terdepan dalam menghadapi berbagai antigen.
Sitokin	Sitokin merupakan glikoprotein yang dapat larut ketika dilepaskan oleh sel system immune (disekresi terutama dari leukosit) yang berperan dalam non <i>enzmatically</i> reseptor spesifik untuk meregulasi respon imun.
Toll Like Receptor (TLR)	Reseptor pada membran sel atau kelompok protein pada membran sel sebagai reseptor yang secara luas mengenal molekul mikroba serta dapat stimulasi respon innate imun bawaan
<i>Vertebrata</i>	mencakup semua hewan yang memiliki tulang belakang yang tersusun dari vertebra, vertebrata memiliki sistem otot yang banyak terdiri dari pasangan massa, dan juga sistem saraf pusat yang biasanya terletak di dalam tulang belakang.
Virus	Suatu partikel yang mengandung bahan genetik berupa DNA atau RNA yang diselubungi oleh protein dan pada beberapa virus ada juga komponen lain, misalnya lemak
<i>Virulensi</i>	Derajat keganasan pathogen atau tingkat kemampuan suatu organisme untuk menimbulkan penyakit

## DAFTAR SINGKATAN

APC	<i>Antigen Presenting Cells</i>
BBAP	Balai Budidaya Air Payau
CLRS	<i>C-Tipe reseptor lektin</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
eIF3	Eukaryotic initiation factors (eIF) are proteins involved in the initiation phase of eukaryotic translation
Fc	<i>Fraksi konstan</i>
HE	<i>Haematoxylline dan Eosin</i>
IFN	<i>Interferon</i>
Ig	<i>Imunoglobulin</i>
IL	<i>Interleukin</i>
ISG	<i>Interferon stimulated gen</i>
LPS	<i>Lipopolisakarida</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
NF-kB	<i>Nuclear Factor kappa Beta</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NLR	<i>NOD-like Receptors</i>
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PBS	<i>Phospat Buffer Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Reseptor</i>
RLR	<i>RIG-I-like Receptors</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
TBK1	faktor aktivasi IRF-3
Tc	<i>Sel T cytotoxic</i>
Th	<i>Sel T helper</i>
TCR	<i>T Cell Receptor</i>
TLR	<i>Tool-like Receptor</i>
VNN	<i>Viral Nervous Necrosys</i>
µm	mikromili

## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Dari berbagai jenis ikan Kerapu, ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) merupakan salah satu ikan laut yang berprospek sangat baik, ikan ini banyak diminati para konsumen sebagai ikan hias maupun ikan konsumsi. Namun, tingkat permintaannya berbanding terbalik dengan tingkat ketersediaan yang ada pada budidaya *C. altivelis*. Munculnya hambatan tersebut dikarenakan terjadinya serangan penyakit yang berujung pada kematian massal, hal tersebut diduga sistem imun atau kekebalan tubuh *C. altivelis* pada usia larva masih lemah dan belum mampu untuk melawan benda asing yang masuk kedalam tubuh (Bulanin, 2003).

Ancaman paling berbahaya pada *C. altivelis* adalah penyakit yang disebabkan oleh virus, salah satu jenis virus yang menyerang Kerapu adalah *Viral Nervous Necrosis* (VNN). Serangan VNN pada budidaya *C. altivelis* dapat mengakibatkan kematian hingga 100% saat ikan berusia larva maupun juvenil (Yuwanita dan Yanuhar 2013). *Viral Nervous Necrosis* mampu melemahkan sistem saraf ikan sehingga ikan akan kehilangan kemampuan untuk mengontrol saraf, melemahnya pergerakan dan terjadi kematian (Yanuhar, 2011).

Penelitian mengenai penanggulangan kematian massal *C. altivelis* cukup banyak menarik minat beberapa peneliti mengingat *C. altivelis* memiliki potensi ekonomi penting. Akan tetapi, selama ini penanggulangan *Viral Nervous Necrosis* (VNN) masih mengandalkan bahan-bahan kimia. Pada dasarnya bahan-bahan kimia tersebut tidak selektif sehingga dikhawatirkan akan menurunkan mutu lingkungan dan bersifat resisten pada patogen (Yanuhar, 2009). Semakin berkembangnya ilmu bioteknologi memungkinkan untuk membuat terobosan baru yang ramah lingkungan dalam menangani VNN dengan menggunakan

sumberdaya nabati, salah satunya pemanfaatan mikroalga sebagai imunostimulan bagi *C. altivelis*.

Eksplorasi terhadap manfaat mikroalga telah dilakukan untuk berbagai tujuan penelitian antara lain, penentuan kandungan logam berat, makanan kesehatan, pengelolaan perairan, bahan makanan alternatif dan pakan budidaya (Prabowo, 2009). Selain itu, pemanfaatan mikroalga juga mampu untuk meningkatkan ketahanan tubuh ikan terhadap serangan virus, yaitu dengan memanfaatkan spesies *Chlorella vulgaris*. Spesies ini mampu memberikan energi dan nutrisi organik yang penting untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan larva (Amini dan syamdini, 2006).

*Chlorella vulgaris* merupakan golongan alga hijau (*Chlorophyta*), bentuk sel bulat dan bulat telur dengan diameter sel 2-8 mikron (Pratama, 2011). Tubuhnya terdiri dari satu sel (*unicellular*) serta kandungan zat hijau (*Chlorophyl*) yang sangat tinggi, terdapat dua jenis klorofil yaitu klorofil a dan klorofil b. Selain itu *C. vulgaris* juga mengandung  $\beta$  karoten dalam jumlah 18-20 kali lebih banyak jika dibandingkan dengan  $\beta$  karoten pada wortel, pepaya atau tomat (Sargowo dan Ratnawati, 2002).

*Fragmen Pigmen Protein* (FPP) merupakan komponen yang menyusun *C. vulgaris*. FPP adalah pigmen protein kompleks yang terdapat didalam sel, salah satu bagian dari FPP yang berperan dalam pembentukan nutrisi adalah *Peridinin Chlorophyl Protein* (PCP). PCP adalah pigmen protein yang berkaitan dengan klorofil yang memiliki peran sebagai pengumpul cahaya dalam proses fotosintesis (Ogata *et.al.*, 1994). PCP juga dapat digunakan sebagai anti bakteri dan virus. Menurut Impra (2009), bahwa protein dalam bentuk enzim berperan sebagai katalis dalam proses biokimia seperti alat pelindung atau antibodi yang terbentuk jika tubuh memasukkan zat asing.

Secara umum sistem imunitas tubuh memiliki fungsi yaitu membantu perbaikan DNA tubuh, mencegah infeksi yang disebabkan oleh jamur, bakteri, virus dan organisme lain, serta menghasilkan antibodi untuk memerangi serangan bakteri dan virus asing yang masuk ke dalam tubuh. Tugas sistem imun adalah mencari dan merusak invader (penyerbu) yang membahayakan tubuh (Fatmah, 2006). Sistem kekebalan terdiri dari dua jenis, yaitu : (1) Sistem kekebalan bawaan atau *innate immunity* adalah garis pertama pertahanan *host* terhadap patogen pengganggu. (2) Sistem kekebalan didapat (*adaptive*), merupakan sistem imun yang terbentuk ketika ada rangsangan antigen yang berhasil masuk melewati sistem kekebalan bawaan. Sistem kekebalan didapat terlibat dalam penghapusan patogen dalam tahap akhir dari infeksi dan pembentukan memori kekebalan.

Antigen atau gen asing yang masuk ke dalam tubuh akan merangsang munculnya sistem kekebalan tubuh organisme. Mekanisme pembentukan sistem kekebalan yang banyak dipelajari adalah mekanisme seluler, yaitu peran sel B dan sel T dalam menghadapi serangan patogen. Sel B berfungsi secara spesifik mengenali antigen asing serta berperan membentuk kekebalan terhadap infeksi bakteri maupun virus, antibodi ini kemudian melekat pada antigen dan melumpuhkannya. Sel B juga mampu membentuk sel pengingat (*memory cell*), sel ini berfungsi untuk membentuk kekebalan tubuh dalam jangka panjang. Sedangkan sel T berperan langsung menyerang sel penghasil antigen.

Respon imun terhadap keberadaan patogen dalam tubuh organisme juga dipengaruhi oleh berbagai macam gen, salah satunya adalah  $\alpha$ -aktin. Gen tersebut memiliki peran yang sangat penting dalam proses koordinasi sistem imun dan berbagai proses seluler lainnya seperti migrasi sel, pembelahan sel dan ekspresi gen.  $\alpha$ -aktin merupakan gen *housekeeping* yang diekspresikan pada tiap-tiap sel. Selain diekspresikan secara alami oleh sel, ekspresi  $\alpha$ -aktin juga dapat

dipengaruhi oleh keberadaan antigen, seperti bakteri, virus maupun protein lain seperti FPP mikroalga. PCP (*Peridinin Chlorophyll Protein*) merupakan salah satu jenis FPP dalam bentuk enzim. PCP dapat berfungsi sebagai biokatalisator respon imun yang mampu meningkatkan respon fisiologis atau respon imun. Keberadaan PCP dalam tubuh organisme akan dikenali oleh TLR (*Toll Like Receptor*), proses pengenalan PCP ini akan menghasilkan sinyal *downstream* dan merangsang *de novo* untuk transkripsi gen-gen untuk meningkatkan sistem imun.  $\alpha$ -aktin merupakan salah satu gen yang keberadaannya dapat dipicu oleh keberadaan PCP. Peningkatan  $\alpha$ -aktin akan berdampak terhadap meningkatnya respon fisiologis seluler seperti fungsi reseptor, penyerapan sinyal dan transport vesikel antibodi (aktivasi sel B dan sel T).

Dari uraian di atas maka penelitian ini mengambil fokus ke pemanfaatan *Fragmen Pigmen Protein (FPP)* mikroalga *C. vulgaris* terhadap profil  $\alpha$ -aktin pada *C. altivelis* sebagai penanda respon imun.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimana pengaruh *Fragmen Pigmen Protein (FPP)* mikroalga *C. vulgaris* terhadap profil  $\alpha$ -aktin pada *C. altivelis* sebagai penanda respon imun.

## 1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui manfaat *Fragmen Pigmen Protein (FPP)* mikroalga *C. vulgaris* terhadap ekspresi  $\alpha$ -aktin pada *C. altivelis*.

## 1.4 Manfaat

### 1.4.1 Manfaat Teoritis

Sebagai landasan penelitian lanjutan untuk mengeksplorasi potensi FPP *C. vulgaris* sebagai bahan dasar antivirus melalui aktivasi gen  $\alpha$ -aktin pada *C. altivelis*.

### 1.4.2 Manfaat Praktis

Sebagai tahap penelitian lanjutan dalam kajian tentang mekanisme molekuler analisis pemanfaatan FPP *C. vulgaris* dalam aktivasi  $\alpha$ -aktin pada *C. altivelis* sebagai respon antivirus.

## 1.5 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Lingkungan dan Bioteknologi Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Laboratorium Biologi Molekuler FMIPA Universitas Brawijaya, Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Balai Budidaya Air Payau (BBAP) Situbondo dan Laboratorium UV-VIS Fakultas Kimia Universitas Islam Negeri. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei-Juli 2015.

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Mikroalga *Chlorella vulgaris*

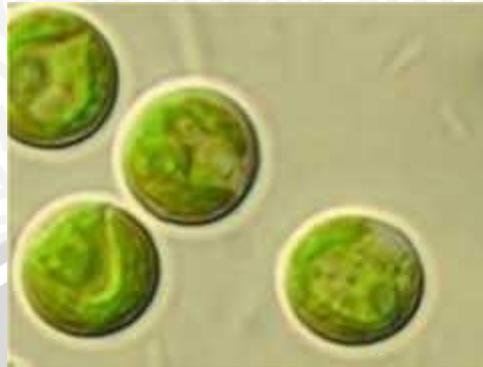
Mikroalga adalah organisme tumbuhan renik berukuran 2-20 mikron, banyak dijumpai di daerah perairan maupun daerah dengan kelembaban yang tinggi. Mikroalga merupakan produsen primer perairan yang memiliki kemampuan untuk berfotosintesis sehingga mampu menghasilkan makanan dengan bantuan cahaya matahari (Harnadiemas, 2012). Mikroalga ini banyak dikultur di berbagai negara terutama negara yang memiliki industri akuakultur seperti Indonesia, Thailan, Taiwan, Jepang, Ekuador dan beberapa negara di benua Eropa. Terdapat begitu banyak spesies dari mikroalga, salah satunya adalah *Chlorella vulgaris* (Wijoseno, 2011).

*C. vulgaris* adalah salah satu jenis mikroalga yang termasuk dalam golongan alga hijau atau *Chlorophyta*. Bentuk sel *C.vulgaris* bulat maupun bulat telur (*ellipsoidal*) dengan diameter sel berukuran 2 – 8 mikron (Pratama, 2011). *Chlorella vulgaris* bereproduksi dengan cara aseksual, yaitu dengan cara pembelahan diri yang setiap selnya mampu membelah diri dan menghasilkan empat sel baru tanpa mempunyai flagel (Kawaroe *et al.*, 2010).

*C. vulgaris* memiliki keunikan dimana mikroorganisme ini dapat bertahan hidup terhadap pengaruh luar dalam jangka waktu yang lama dan secara cepat dapat menyesuaikan diri dikondisi ekstrem karena mempunyai ketahanan genetik dengan mekanisme perubahan DNA yang sangat tinggi, serta bentuk, ukuran dan sifat dinding sel yang sangat kuat (Surawiria, 2005).

*C. vulgaris* merupakan organisme fotoautotrof dan termasuk ke dalam jenis eukariotik. Fotoautotrof berarti jenis tumbuhan yang belum mempunyai akar, batang dan daun tetapi mampu membentuk makanan sendiri melalui proses fotosintesis, sedangkan eukariotik artinya sel yang telah mengandung inti

sel dan organel – organel lainnya. *C. vulgaris* hidupnya berkoloni dalam jumlah yang besar (Najmuddin, 2011).



**Gambar 1.** *C. vulgaris* (Sumber: Google image, 2015)

### 2.1.1 Klasifikasi *Chlorella vulgaris*

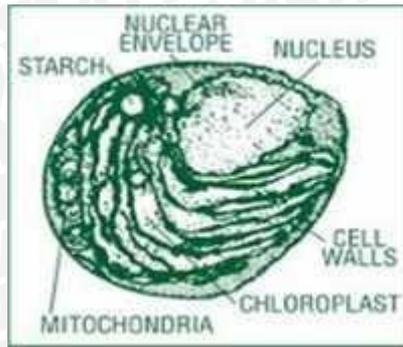
Berdasarkan taksonominya, menurut Prescott, (1970) *C.vulgaris* memiliki klasifikasi sebagai berikut:

Kingdom : Plantae Phylum  
: Chlorophyta Sub Phylum :  
Chlorophyceae Ordo :  
Chlorococcales Family :  
Oocystaceae Genus :  
Chlorella  
Spesies : *Chlorella vulgaris*



### 2.1.2 Morfologi

*C. vulgaris* merupakan mikroorganisme berbentuk spiral dengan ukuran 2 - 10 mikron dan memiliki struktur yang mirip dengan tumbuhan (Safi *et al.*, 2014). Tubuhnya terdiri dari satu sel (*unicellular*) serta kandungan zat hijau (*chlorophyl*) sangat tinggi, bahkan melebihi jumlah yang dimiliki oleh beberapa jenis tumbuhan tingkat tinggi (Prabowo, 2009). Struktur sel *C. vulgaris* dapat dilihat pada gambar 2 berikut :



**Gambar 2.** Struktur sel *C. vulgaris*(Sumber: Google image, 2015)

### 1. Inti sel

Inti sel atau juga bisa disebut nukleus merupakan organel yang terdapat dalam sel mikro alga. Nukleus mengandung sebagian besar materi genetik sel yang membentuk kromosom. Pada saat proses pembelahan terjadi, materi genetik yang berada dalam inti sel induk diturunkan kepada sel anak. Fungsi utama nukleus adalah mengontrol seluruh aktivitas sel. Kerasnya dinding sel karena tersusun atas selulosa dan lignin (Safi et al., 2014).

### 2. Sitoplasma

Sitoplasma merupakan zat semi cairan yang berada dalam membran sel dan mengelilingi inti sel. Berfungsi sebagai pelindung bagian internal sel.

### 3. Mitokondria

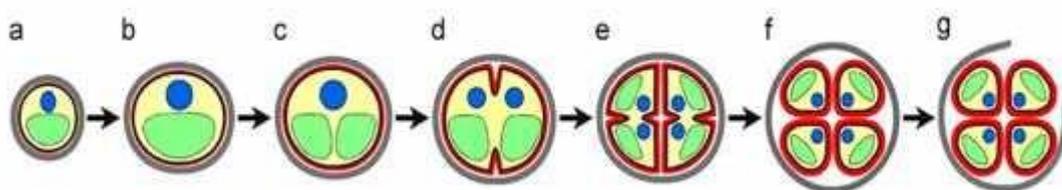
Mitokondria adalah organel yang berperan sebagai pemnghasil energi. Mitokondria mempunyai dua lapisan membran, yaitu lapisan membran luar dan lapisan membran dalam. Lapisan membran dalam ada dalam bentuk lipatan-lipatan yang sering disebut dengan *cristae*. Di dalam mitokondria terdapat 'ruangan' yang disebut *matriks*, dimana beberapa mineral dapat ditemukan.

#### 4. Kloroplas

*C. vulgaris* memiliki kloroplas tunggal dengan pembungkus membran yang terdiri dari fosfolipid. Fungsi kloroplas adalah untuk menghasilkan energi yang berasal dari sinar matahari menjadi energi kimia yang tersimpan dalam glukosa.

##### 2.1.3 Biologi dan Habitat

*Chlorella vulgaris* bereproduksi secara aseksual dan berlangsung sangat cepat, dalam waktu 24 jam satu sel dari *C. vulgaris* dapat tumbuh dalam kondisi optimal membentuk empat sel anak dengan dinding sel yang terbentuk didalam dinding sel induk. Setelah sel-sel baru yang terbentuk sudah matang maka terjadi proses pecahnya dinding sel induk, hal ini memungkinkan keluarnya sel anak dari sel induk dan serpihan-serpihan dari sel induk akan dikonsumsi sebagai pakan oleh sel-sel yang baru terbentuk (Yamamoto *et al.*, 2004). Pernyataan serupa juga didukung oleh Bolt dan Wynne, 1985 dalam Prabowo, 2009 menjelaskan reproduksi yang terjadi pada *Chlorella* adalah dengan pembentukan autospora atau bentuk miniatur dari sel induk. Tiap satu sel induk (*parent cell*) akan membelah menjadi 4, 8 atau 16 autospora yang nantinya akan menjadi anak sel (*daughter cell*) dan akan melepaskan diri dari sel induk. Proses terbentuknya anak sel dapat dilihat pada gambar 3.



**Gambar 3.** ( a ) fase awal pertumbuhan sel; ( b ) fase akhir pertumbuhan sel; ( c ) fase kloroplas menjadi 2; ( d ) fase awal protoplas menjadi 2; ( e ) fase akhir protoplas; ( f ) fase pematangan sel anak dan ( g ) fase menetas (Sumber : Safi *et al.*, 2014).

Berdasarkan habitatnya chlorella dapat dibedakan menjadi dua yaitu chlorella yang hidup di air tawar dan chlorella yang hidup di air laut. Chlorella air tawar dapat hidup hingga salinitas 5 ppt, sedangkan chlorella air laut dapat mentolelir kondisi lingkungan yang relatif bervariasi. Tumbuh optimal chlorella berkisar antara 25-34 ppt. Umumnya Chlorella bersifat planktonis yang melayang-layang di perairan, namun beberapa Chlorella dapat hidup bersimbiosis dengan tumbuhan lain (Dolan, 1992).

#### 2.1.4 Fase Pertumbuhan *Chlorella vulgaris*

Selama masa pertumbuhan *Chlorella vulgaris* mengalami beberapa fase pertumbuhan sel, yaitu yang pertama adalah fase lag (istirahat), fase eksponensial (logaritmik), fase penurunan laju pertumbuhan, fase stasioner dan terakhir fase kematian (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995).

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

Fase Lag merupakan fase pertama pada proses pertumbuhan mikroalga, fase ini dimulai saat pemberian inokulum ke dalam media kultur dimana terjadi penundaan pertumbuhan dikarenakan sel memerlukan waktu untuk menyesuaikan diri dengan lingkungan yang baru sebelum terjadinya pembelahan sel. Pembelahan sel akan terjadi ketika terbentuk dan terpenuhinya enzim-enzim dan metabolit sampai konsentrasi yang dibutuhkan. Pada fase ini tidak terjadi pembelahan sel sehingga kepadatan sel belum meningkat.

##### 2. Fase Eksponensial

Fase eksponensial adalah lanjutan dari fase lag dimana pada fase ini terjadi penambahan biomassa mikroalga. Fase ini dimulai dengan pembelahan sel secara cepat tetapi struktur sel masih dalam keadaan normal dan adanya keseimbangan antara nutrisi dalam media dengan kandungan nutrisi didalam sel. Pada akhir fase ini kandungan protein dalam sel sangat tinggi, sehingga

memungkinkan untuk dikelola lebih lanjut baik pembibitan maupun pemanfaatan lainnya.

### 3. Fase Penurunan Laju Pertumbuhan

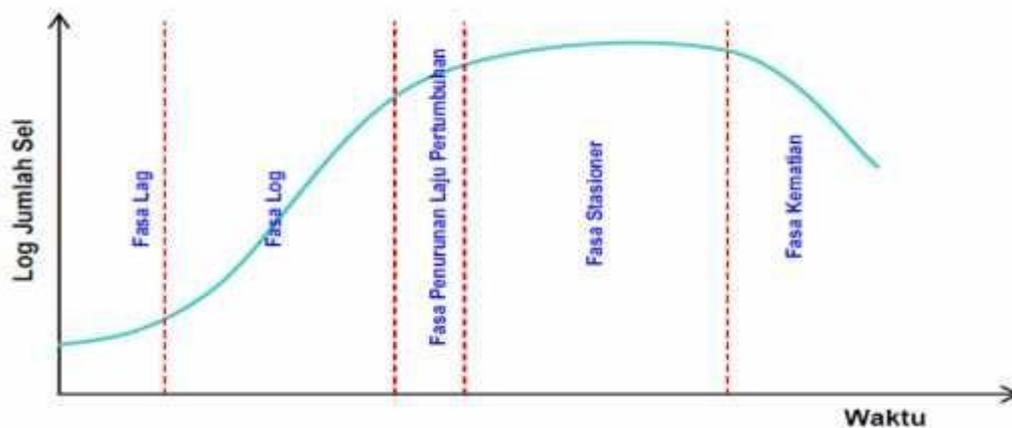
Pada fase ini pembelahan sel tetap terjadi tetapi tidak sebanyak pada fase sebelumnya, sehingga laju pertumbuhan mengalami penurunan. Hal ini terjadi karena adanya kompetisi yang tinggi didalam media serta nutrisi yang tersedia tidak mencukupi kebutuhan populasi sel, sehingga hanya sebagian sel yang mendapat cukup nutrisi yang akan bisa tumbuh dan membelah.

### 4. Fase Stasioner

Fase stasioner adalah fase dimana laju reproduksi dan laju kematian relatif sama. Penambahan dan pengurangan mikroalga seimbang sehingga kepadatannya relatif tetap (stasioner). Hal ini terjadi disebabkan oleh menipisnya nutrisi didalam media serta menumpuknya hasil metabolisme yang bersifat racun sehingga mengakibatkan pertumbuhan terhenti.

### 5. Fase Kematian

Fase ini ditandai dengan laju kematian yang lebih besar dari pada laju reproduksi sehingga jumlah sel mengalami penurunan. Selama fase ini jumlah kematian per satuan waktu perlahan - lahan mulai bertambah sedangkan jumlah sel yang membelah mengalami penurunan secara drastis. Hal ini terjadi karena menurunnya nutrisi dan menurunnya kemampuan metabolisme. Pola pertumbuhan mikroalga dapat dilihat pada Gambar 4.



**Gambar 4.** Kurva Pertumbuhan Mikroalga (Sumber: Wirosaputro, 2002).

### 2.1.5 Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan *Chlorella vulgaris*

Anggraini, (2012) menyatakan kualitas air juga dapat menjadi faktor pembatas dalam pertumbuhan mikroalga laut seperti salinitas, pH, suhu dan CO<sub>2</sub>. Adakalanya jenis-jenis mikroalga tertentu tidak dapat hidup oleh karena faktor tersebut. Berikut ini beberapa faktor yang mempengaruhi pertumbuhan *Chlorella vulgaris*:

#### a. Suhu

Suhu merupakan salah satu faktor pembatas yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga. Perubahan suhu berpengaruh terhadap proses kimia, fisika dan biologi. Dimana suhu berpengaruh pada jumlah oksigen yang terdapat didalam air, menurunkan suatu kelarutan bahan serta mempengaruhi tingkat metabolisme mikroalga. Menurut Wijoseno (2011), kisaran suhu optimal bagi pertumbuhan *C. vulgaris* adalah 23-30°C.

#### b. Salinitas

Salinitas merupakan salah satu faktor yang sangat penting bagi kehidupan di air, terutama dalam mempertahankan keseimbangan osmotik. Kisaran salinitas yang berubah-ubah dapat mempengaruhi pertumbuhan

mikroalga. Beberapa mikroalga dapat tumbuh dalam kisaran salinitas yang tinggi tetapi ada juga yang dapat tumbuh dalam kisaran salinitas yang rendah. Namun, hampir semua jenis mikroalga dapat tumbuh optimal pada salinitas sedikit di bawah habitat asal. Pengaturan salinitas pada media yang diperkaya dapat dilakukan dengan pengenceran dengan menggunakan air tawar.

### **c. Derajat Keasaman**

Derajat keasaman atau pH digambarkan sebagai keberadaan ion hidrogen. pH yang terlalu tinggi ataupun terlalu rendah yang tidak sesuai dengan habitatnya dapat mengganggu pertumbuhan mikroalga. Variasi pH dalam media kultur dapat mempengaruhi metabolisme dan pertumbuhan kultur mikroalga antara lain mengubah keseimbangan karbon anorganik, mengubah ketersediaan nutrisi dan mempengaruhi fisiologi sel.

### **d. DO (Oksigen Terlarut)**

Oksigen terlarut (DO) adalah jumlah oksigen terlarut dalam air yang berasal dari fotosintesis dan absorpsi atmosfer/udara. Oksigen terlarut di suatu perairan sangat berperan dalam proses penyerapan makanan oleh makhluk hidup dalam air. Untuk mengetahui kualitas air dalam suatu perairan, dapat dilakukan dengan mengamati beberapa parameter kimia seperti oksigen terlarut (DO).

### **e. Cahaya**

Pada kultur fitoplankton, cahaya merupakan faktor terpenting karena fitoplankton membutuhkan cahaya untuk proses fotosintesis (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995). Cahaya dalam kultur fitoplankton diperoleh dari penyinaran lampu neon. Penyinaran cahaya harus sesuai untuk kultur, apabila cahaya terlalu terang akan menghambat proses fotosintesis, durasi pencahayaan buatan minimum harus 18 jam (Lavens dan Sorgeloos, 1996). Sari dan Manan (2012)

menjelaskan bahwa untuk kultur skala laboratorium cahaya didapat dari cahaya lampu TL dengan kapasitas sebesar 1450 lux.

#### f. Nitrogen

Nitrogen merupakan bagian dari molekul klorofil, maka tidak mengherankan bila defisiensi unsur ini akan menghambat pembentukan klorofil. Nitrogen merupakan kebutuhan pokok bagi seluruh organisme terutama fitoplankton untuk tumbuh dan berkembang (Riyono, 2007).

#### 2.1.6 Pemanfaatan *Chlorella vulgaris*

*C. vulgaris* adalah organisme autotrof yang saat ini banyak dikembangkan untuk bahan baku industri selain itu kemampuan berfotosintesisnya berperan mereduksi CO<sub>2</sub> dari udara sehingga mengurangi efek rumah kaca (Wang *et al.*, 2008). *C. vulgaris* juga dimanfaatkan didalam bidang kesehatan dan pengobatan penyakit. Beberapa komponen utama pada *C. vulgaris* yang banyak diteliti antara lain:

##### 1. Dinding sel

Dinding sel yang sangat tebal tersusun dari 27% protein, 9,2% lemak, 15,4% selulosa, 31% hemiselulosa, 3,3% glukosamin dan abu yang banyak mengandung besi serta kapur. Khasiat dinding sel menurut Sargowo dan Ratmawati (2002) adalah:

- merangsang kekebalan tubuh sehingga tidak mudah terserang penyakit yang disebabkan oleh virus maupun bakteri.
- menyerap atau mengikat racun baik yang berasal dari bahan kimia, makanan atau bakteri.
- menyerap atau mengikat kolestrol sehingga tidak akan menyebabkan tekanan darah tinggi.

- merangsang produksi sel-sel kekebalan saluran pencernaan sehingga tidak mudah terserang infeksi saluran pencernaan.

## 2. $\beta$ - karoten

$\beta$ - karoten terdapat dalam jumlah 18-20 kali lebih banyak jika dibandingkan  $\beta$ - karoten yang terdapat pada wortel, pepaya atau tomat. Manfaat

$\beta$ - karoten adalah sebagai berikut (Sargowo dan Ratnawati, 2002):

- sebagai antioksidan
- merangsang kekebalan tubuh
- sumber vitamin A

## 3. Klorofil

Klorofil yang jumlahnya 3% dengan bantuan cahaya matahari mampu mengubah air dan zat asam arang menjadi oksigen serta bahan makanan yang sangat dibutuhkan oleh manusia. Manfaat klorofil bagi kesehatan yang telah diteliti, antara lain:

- menghambat pertumbuhan bakteri negatif didalam saluran cerna dan merangsang pertumbuhan bakteri yang berguna untuk pencernaan makanan sehingga tidak mudah diare.
- dapat mengurangi bau badan, bau mulut, bau nafas dan juga bau yang berasal dari gas perut.
- memperbaiki fungsi hati sehingga dapat menjalankan fungsi metabolisme makanan dan detoksifikasi racun.
- merangsang pembentukan sel darah merah dan memperlancar aliran darah.
- bersifat anti-proteolitik berfungsi untuk mencegah penyakit alergi, tumor atau kanker.
- bersifat antioksidan sehingga dapat mengikat radikal bebas.

#### 4. Protein

Protein dalam *C. vulgaris* terdiri dari asam amino esensial yang sangat diperlukan oleh tubuh karena tidak bisa disintesa oleh tubuh manusia secara langsung. Selain berguna bagi pertumbuhan, kandungan protein alami yang dimiliki *C. vulgaris* juga mampu membantu menjaga gula dalam darah.

### 2.2 Klorofil

Klorofil adalah kelompok pigmen fotosintesis yang terdapat dalam tumbuhan, mampu menyerap cahaya merah, biru dan ungu, serta memfleksikan cahaya hijau yang menyebabkan tumbuhan memperoleh ciri warnanya. Tersimpan dalam kloroplas serta dapat memanfaatkan cahaya yang diserap sebagai energi untuk reaksi-reaksi cahaya dalam proses fotosintesis.

#### 2.2.1 Pengertian Klorofil

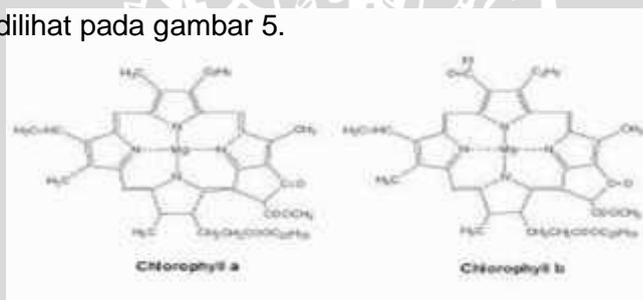
Klorofil merupakan zat berwarna hijau yang terkandung dalam sel mikroalga hijau salah satunya *Chlorella vulgaris*. Klorofil mempunyai peran utama yaitu digunakan untuk proses fotosintesis pada mikroalga hijau, selain itu klorofil juga mempunyai manfaat bagi manusia. Klorofil bermanfaat untuk mengikat radikal bebas membersihkan racun dalam tubuh, mempercepat regenerasi kulit dan anti infeksi (Pratama, 2011). Klorofil yang terdapat pada *Chlorella vulgaris* adalah klorofil a dan klorofil b dengan jumlah masing-masing sebesar  $\pm 5\text{mg/l}$  dan  $\pm 2,5\text{ mg/l}$  (Qian *et al.*, 2009).

Terdapat beberapa jenis klorofil didalam tumbuhan antara lain, klorofil A merupakan salah satu bentuk klorofil yang terdapat pada semua tumbuhan autotrof, klorofil B terdapat pada ganggang hijau Chlorophyta dan tumbuhan darat, klorofil C terdapat pada ganggang coklat Phaeophyta serta diatome Bacillariophyta, klorofil D terdapat pada ganggang merah Rhadophyta. Klorofil

mempunyai peran yang sangat besar karena tumbuhan dapat menyusun makanannya sendiri dengan bantuan cahaya matahari (Wijoseno, 2011).

### 2.2.2 Struktur Klorofil

*C. vulgaris* memiliki klorofil a dan klorofil b, kedua jenis klorofil ini saling membantu dalam proses fotosintesis. Klorofil a sebagai pigmen fotosintesis utama dapat menyerap cahaya dengan panjang gelombang 430 nm (biru) dan 662 nm (merah). Peran dari klorofil b adalah untuk membantu proses fotosintesis dengan meningkatkan jangkauan panjang gelombang cahaya yang ditangkap, klorofil dapat menangkap panjang gelombang 453 nm dan 642 nm. Dalam keadaan sedikit cahaya maka klorofil b akan lebih banyak dibentuk untuk meningkatkan kemampuan fotosintesis (Pratama, 2011). Struktur klorofil a dan klorofil b dapat dilihat pada gambar 5.



**Gambar 5.** Struktur klorofil a dan klorofil b (Sumber: Google image, 2015)

Ketika cahaya mengenai suatu materi maka cahaya tersebut akan dipantulkan, diteruskan (transmisi) atau diserap (absorpsi). Pigmen klorofil yang menyerap lebih banyak cahaya tampak pada warna biru (400-450 nm) dan merah (650-700 nm) dibandingkan hijau (500-600 nm). Warna hijau pada daun disebabkan karena klorofil menyerap cahaya merah dan biru serta memantulkan cahaya hijau (Arrohmah, 2007).

### 2.2.3 Peran dan Fungsi Klorofil

Pigmen dalam kloroplas, khususnya klorofil mempunyai peranan yang sangat penting dalam proses fotosintesis. Fotosintesis merupakan dasar dari

produksi zat-zat organik dalam alam (produksi primer), proses fotosintesis merupakan reaksi berantai panjang dan kompleks (Hadi, 2007).

### 2.3 Kerapu Tikus

Ikan Kerapu dikenal sebagai salah satu ikan budidaya laut yang memiliki nilai ekonomi dipasaran internasional. Kerapu bebek atau kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) merupakan salah satu jenis ikan laut dari keluarga Seranidae yang hidup diperairan karang serta merupakan komoditas ikan ekspor (Tridjoko dan Gunawan, 2010). *C. altivelis* adalah jenis ikan karang yang hanya hidup dan tumbuh cepat di daerah tropis (Akbar dan Sudaryanto, 2001)

*C. altivelis* saat masih kecil dengan ukuran 2 inci banyak diminati konsumen sebagai ikan hias dan mendapat julukan sebagai *panther fish* karena di sekujur tubuhnya dihiasi bintik-bintik kecil bulat berwarna hitam, bila ukuran bobot mencapai 0,5 kg/ekor digunakan sebagai ikan konsumsi (Ahmad et al., 1991) dan merupakan ikan termahal di kawasan Asia Tenggara, Indonesia merupakan salah satu negara penyumbang terbesar ikan kerapu hidup selain Thailand dan Filipina (Mishima dan Gonzares, 1994).

#### 2.3.1 Klasifikasi

Taksonomi ikan Kerapu Tikus menurut Weber and Beofort (1940) dalam Evalawati et al (2001), dapat dilihat di bawah ini:

Phylum	: Chordata
Subphylum	: Vertebrata
Class	: Osteichtyes
Ordo	: Percomorphi
Family	: Serranidae
Genus	: <i>Cromileptes</i>
Spesies	: <i>Cromileptes altivelis</i>

### 2.3.2 Morfologi

*C. altivelis* mempunyai ciri-ciri morfologi sirip punggung dengan 10 duri keras dan 18 -19 duri lunak, sirip perut dengan 3 duri keras dan 10 duri lunak, sirip ekor dengan 1 duri keras dan 70 duri lunak. Panjang total 3,3 – 3,8 kali tingginya, panjang kepala seperempat panjang total, leher bagian atas cekung dan semakin tua semakin cekung, mata seperenam kepala, sirip punggung semakin kebelakang semakin melebar, warna putih kadang kecoklatan dengan totol hitam pada badan, kepala dan sirip Weber and Beoford (1940) dalam (Ahmad *et al.*, 1991). Sedangkan menurut Heemstra and Randall (1993) dalam Evalawati *et al.* (2001) seluruh permukaan tubuh *C. altivelis* berwarna putih keabuan, berbintik bulat hitam dilengkapi sirip renang berbentuk melebar serta moncong kepala lancip menyerupai Bebek atau Tikus.



**Gambar 6.** Morfologi Ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*)  
(Sumber: Google Image, 2015)

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

### 2.3.3 Habitat dan Penyebaran

Habitat favorit larva kerapu tikus muda adalah perairan pantai yang pasirnya berkarang dan banyak ditumbuhi padang lamun (ladang terumbu karang). Pada siang hari, larva kerapu biasanya tidak muncul ke permukaan air, sebaliknya pada malam hari, larva kerapu banyak muncul ke permukaan air. Hal ini sesuai dengan sifat kerapu sebagai organisme *nocturnal*, yakni pada siang hari lebih banyak bersembunyi di liang-liang karang dan pada malam hari aktif bergerak di kolom air untuk mencari makanan (Subyakto, *et. al.* 2003). Menurut Setianto (2011), dalam siklus hidupnya, pada umumnya kerapu tikus muda hidup di perairan karang pantai dengan kedalaman 0,5- 3 meter selanjutnya menginjak masa dewasa beruaya ke perairan yang lebih dalam antara 7-40 meter, biasanya perpindahan ini berlangsung pada siang hari dan senja hari, telur dan larva bersifat pelagis sedangkan kerapu muda hingga dewasa bersifat demersal.

Daerah penyebaran *C. altivelis* dimulai dari Afrika Timur sampai pasifik barat daya. Di Indonesia Kerapu Tikus banyak ditemukan di perairan pulau Sumatera, Jawa, Sulawesi dan Ambon. Salah satu indikator adanya *C. altivelis* adalah perairan karang yang terhampar hampir diseluruh perairan pantai Indonesia (Amirudin *et al.*, 2012).

### 2.3.4 Reproduksi

*C. altivelis* termasuk dalam ikan yang hermiprodit protogini dimana akan mengalami perubahan kelamin dari betina ke jantan. Perubahan tersebut terjadi setelah ikan betina berukuran di atas 2,5 kg pada saat ikan berumur di atas 2-2,5 tahun. Ikan jantan mempunyai berat kisaran di atas 3 kg. Ciri-ciri ikan kerapu jantan warnanya lebih terang dari pada ikan kerapu tikus yang berkelamin betina (Ivanda *et al.*, 2013).

Ikan kerapu bebek memijah pada malam hari, yaitu dari pukul 22.00 sampai dengan 4.00 pagi. Awal pemijahan biasanya terjadi pada bulan gelap, yaitu minus 3 sampai plus 5 awal bulan (Sudaryonto, *et al.*, 1999; Bulanin, 1999). Telur yang telah dibuahi berbentuk bulat, transparan, mengapung di permukaan air sedangkan yang tidak dibuahi berwarna putih dan tenggelam di dasar (Bulanin, 1999). Telur yang dibuahi akan berkembang menjadi embrio dan akhirnya menetas menjadi larva. Umumnya larva yang baru menetas bersifat pasif karena mulut dan matanya belum terbuka, organ-organ tubuh masih lemah sehingga gerakannya sangat tergantung kepada arus. Larva ikan kerapu bebek yang baru menetas mempunyai panjang rata-rata 880 mikron dengan tinggi 480 mikron (Slamet *et al.*, 1996) dan panjang rata-rata 1.88 mm dan tinggi 460 mikron (Nurbaiti, 2000).

### 2.3.5 Kebiasaan makan

Ikan kerapu dikenal sebagai predator atau piscivorous yaitu pemangsa jenis ikan-ikan kecil, zooplankton, udang-udangan invertebrate, rebon dan hewan-hewan kecil lainnya. Ikan ini termasuk jenis karnivora dengan cara memangsanya memakan satu per satu makanannya. Sedangkan untuk larva ikan kerapu pemakan larva molusca (trokofor), rotifer, mikrocrustacea, copepod, dan zooplankton (Kordi, 2001).

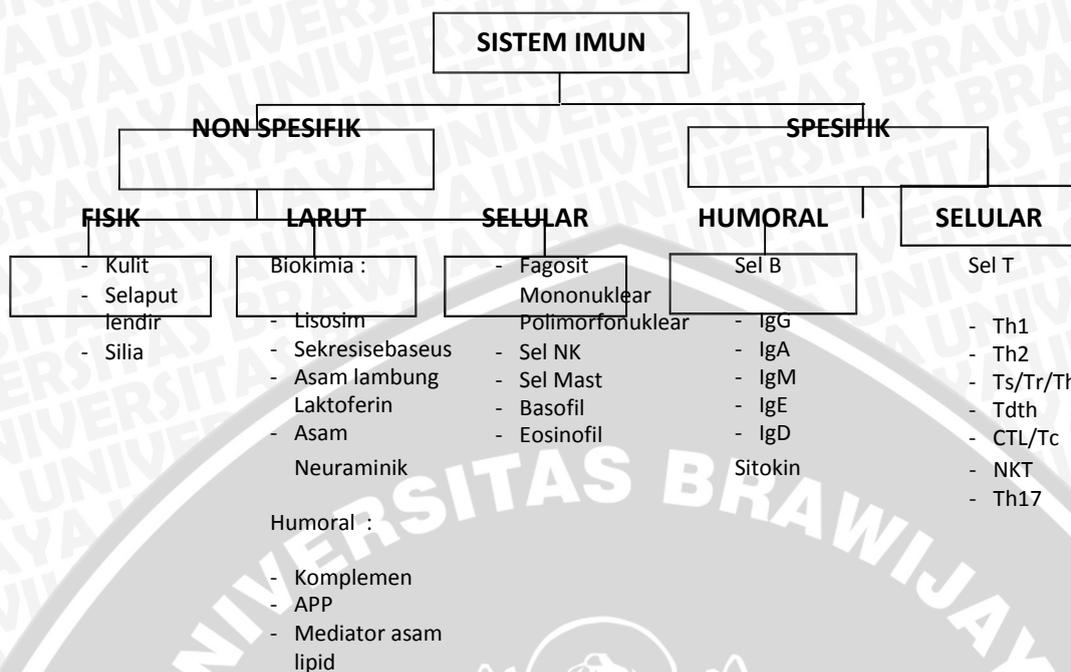
Baskoro *et al.*, (2010) menerangkan bahwa suhu yang terlalu tinggi, tidak normal dan tidak stabil ternyata akan mengurangi kecepatan makan ikan. Ada kalanya ikan yang berukuran besar akan mencari daerah makanan yang bersuhu lebih rendah daripada ikan-ikan yang berukuran lebih kecil dari jenisnya, hal tersebut mungkin disesuaikan dengan kebutuhan fisiologisnya.

## 2.4 Sistem Pertahanan Tubuh Ikan

Sistem kekebalan tubuh pada ikan secara fisiologis mirip dengan vertebrata yang lebih tinggi, meskipun terdapat perbedaan tertentu. Berbeda dengan vertebrata yang lebih tinggi, ikan adalah organisme yang hidup bebas dari tahap embrionik awal kehidupan dan tergantung pada sistem kekebalan tubuh bawaan mereka untuk bertahan hidup (Rombout *et al.*, 2005).

Sistem imun merupakan sistem koordinasi respon biologik yang bertujuan melindungi integritas dan identitas individu serta mencegah masuknya organisme dan zat yang berbahaya di lingkungan yang dapat merusak dirinya. Sistem imun mempunyai 3 fungsi utama, yang pertama adalah suatu fungsi yang sangat spesifik yaitu kesanggupan untuk mengenal dan membedakan berbagai molekul target sasaran dan juga mempunyai respon yang spesifik. Fungsi kedua adalah kesanggupan membedakan antara antigen diri dan antigen asing. Fungsi ketiga adalah fungsi memori yaitu kesanggupan melalui pengalaman kontak sebelumnya dengan zat asing patogen untuk bereaksi lebih cepat dan lebih kuat daripada kontak pertama (Munasir, 2001).

Apabila tubuh mendapatkan serangan dari benda asing maupun infeksi mikroorganisme (kuman, penyakit, bakteri, jamur, atau virus) maka sistem kekebalan tubuh akan berperan dalam melindungi tubuh dari bahaya akibat serangan tersebut. Ikan memiliki sistem pertahanan tubuh untuk melawan berbagai macam penyakit. Sistem pertahanan tubuh yang dimiliki oleh ikan terbagi atas sistem pertahanan non spesifik/innate dan sistem pertahanan adaptif (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).



**Gambar 7.** Gambaran umum sistem imun vertebrata (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010)

### 2.4.1 Sistem Imun Non Spesifik

Disebut non spesifik karena tidak ditujukan terhadap mikroba tertentu dan telah ada dan siap berfungsi sejak lahir (martini, 2001 dalam Ariana, 2003). Sistem ini merupakan pertahanan paling awal dalam menghadapi serangan berbagai mikroba dan dapat memberikan respon langsung. Sistem pertahanannya yang tidak ditujukan kepada mikroba tertentu inilah yang membuat sistem imun non spesifik mampu melindungi tubuh terhadap patogen yang potensial. Sistem imun non spesifik/alamiah terdiri dari sel dendrit, makrofag dan sel NK (*Natural Killer*). Komponen sistem imun non spesifik tidak mempunyai kemampuan bereplikasi dengan cepat namun selalu siap merespon dan melawan benda asing dengan singkat.

Sistem imun non spesifik atau innate merupakan mekanisme pertahanan tubuh non spesifik yang mencegah masuknya dan menyebarnya mikroorganisme

dalam tubuh serta mencegah terjadinya kerusakan jaringan. Ada beberapa komponen innate yaitu, 1. Pemusnahan bakteri intraselluler oleh sel polimorfonuklear (PMN) dan makrofak, 2. Aktivasi komplemen melalui jalur alternatif, 3. Degranulasi sel mast yang melepaskan mediator inflamasi, 4. Produksi interferon alfa (IFN  $\alpha$ ) oleh leukosit dan interferon beta (IFN  $\beta$ ) oleh fibroblast yang mempunyai efek antivirus, 5. Pemusnahan mikroorganisme ekstraselluler oleh sel *natural killer* (sel NK) melalui pelepasan granula yang mengandung perforin, 6. Pelepasan mediator eosinofil seperti *major basic protein* (MBP) dan protein kationik yang dapat merusak membran parasit (Munasir, 2001). Selain itu, Pertahanan *innate* juga berperan penting dalam pengaktifan pertahanan adaptif. Pengaktifan beberapa komponen pada pertahanan *innate* seperti sel-sel fagosit, produksi sitokin dan kemokin, dan pengaktifan sistem komplemen dan berbagai macam reseptor sel akan memicu sel T dan sel B serta APC (*Antigen Presenting Cells*) (Magnadottir, 2006).

#### 2.4.2 Sistem Imun Spesifik

Imun spesifik juga disebut sebagai kekebalan buatan atau adaptif karena terbentuk ketika ada rangsangan antigen yang telah berhasil melewati pertahanan *innate*. Mekanisme imun spesifik ini memerlukan pengenalan terhadap antigen terlebih dahulu sebelum membuat pertahanan yang kompleks dan spesifik. Sistem imun spesifik mempunyai kemampuan untuk mengenal benda yang dianggap asing bagi dirinya. Benda asing yang pertama kali terdeteksi mempunyai bahaya dengan tubuh akan segera dikenali oleh sistem imun spesifik. Pendeteksian tersebut menimbulkan kepekaan sehingga antigen yang sama dan masuk kedalam tubuh untuk kedua kalinya akan mudah dan cepat dikenali untuk kemudian dihancurkan.

Sistem imun spesifik terdiri dari dari sistem humoral (limfosit B), selular (limfosit T), sistem limfoid primer, sistem limfoid sekunder (limpa, kelenjar limfe dan sistem imun mukosa) (Agusjaya 2011). Ariana (2003), sistem imun spesifik diperankan oleh limfosit T dan limfosit B. Ketika suatu antigen merangsang respon imun spesifik, antigen tersebut akan mengaktifkan sel limfosit T. Ketika sel limfosit T teraktifasi oleh antigen, sel tersebut akan melawan antigen dan merangsang aktifasi sel limfosit B. Sel limfosit B yang teraktifasi akan merangsang pembentukan antibodi yang akan melawan antigen tersebut.

#### **2.4.3 Sel B (BCR/B-Cell Receptor)**

Peran utama dalam sistem imun spesifik humoral adalah limfosit B atau sel B. Sel B berasal dari sel asal multipoten di sumsum tulang belakang yang dirangsang oleh benda asing akan berproliferasi, berdiferensiasi dan berkembang menjadi sel plasma yang memproduksi antibodi. Antibodi berfungsi dalam pertahanan terhadap infeksi ekstraseluler, virus dan bakteri serta menetralkan toksinnya (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

Aktivasi sel B oleh antigen protein larut memerlukan bantuan sel Th, Tanpa adanya interaksi dengan TCR dan sitokin, ikatan antigen dengan Ig pada sel B sendiri tidak akan menginduksi proliferasi dan diferensiasi. Pada waktu yang sama, sebagian sel B akan kembali ke fase istirahat, sebagian sel akan menjadi matang, sel B menjadi memori yang dapat memberikan respon imun dengan lebih cepat pada paparan ulang dengan antigen yang sama. Ikatan antigen juga mengawali sinyal melalui BCR yang menginduksi sel B meningkatkan ekspresi sejumlah molekul membrane sel seperti MHC-II dan ligan kostimulator B. Peningkatan ekspresi kedua protein membrane tersebut meningkatkan kemampuan sel B berfungsi sebagai APC dalam aktivasi sel Th.

MHC-II memproses dan mempresentasikan antigen ke permukaan sel (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009).

#### 2.4.4 Sel T (TCR/ T-Cell Receptor)

Sel T juga berasal dari sumsum tulang belakang. Fungsi utama sistem imun spesifik selular ialah sebagai pertahanan terhadap bakteri yang hidup intraselular, virus, jamur, parasit dan keganasan. Sel T terdiri sel CD4<sup>+</sup> terdiri atas Th1 dan Th2. Th1 diaktifkan oleh CD4<sup>+</sup> untuk mengaktifkan makrofag yang berfungsi dalam menghancurkan mikroba. Sel T juga terdiri atas sel CD8<sup>+</sup>/CTL/Tc/Ts/Th3 yang berfungsi untuk memusnahkan sel terinfeksi (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

Respon imun awal limfosit T melalui fase pengenalan antigen, APC akan mengaktifasi limfosit T *naive*, yaitu proliferasi limfosit T yang spesifik terhadap antigen tersebut. Dan diferensiasi menjadi sel memori dan sel efektor. Limfosit T pada mulanya teraktivasi oleh interaksi dengan makrofag (salah satu APC) yang menyajikan fragmen-fragmen antigen yang telah terproses pada permukaan selnya. Sel T mempunyai beberapa tipe salah satu diantaranya adalah sel T sitotoksik. Sel T sitotoksik merupakan sel penyerang langsung yang mampu membunuh mikroorganisme dan pada suatu saat bahkan membunuh sel-sel tubuh sendiri (Putu *et al*, 2014).

Sel T sitotoksik yang juga dikenal dengan sel pembunuh (*killer T cells*) akan memusnahkan sel yang terinfeksi atau sel-sel abnormal dengan cara melepaskan zat yang bersifat toksik atau memicu sel agar melakukan penghancuran sel (*apoptosis*). Meskipun sel T sudah memiliki kerja yang spesifik, namun beberapa benda asing bisa lolos dari pertahanan sel tersebut. Sebagai contoh, sel kanker memproduksi senyawa kimia yang dapat menghambat respon imun dari sel T-sitotoksik. Dengan demikian sekalipun sel

kanker dapat dikenali sebagai sel asing, tetapi seringkali lolos dari serangan sel imun tubuh (Radji, 2009). Perbedaan antara imunitas humoral dan selular dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 1.** Perbedaan imunitas spesifik humoral dan selular

Pembeda	Imunitas Humoral	Imunitas Selular	
		Ekstraselular	Intraselular
Mikroba	Mikroba ekstraselular	Fagositosis oleh makrofag	Mikroba intraselular (virus) berkembang biak dalam sel terinfeksi
Respon limfosit	Sel B	Th	CTL
Mekanisme efektor dan fungsi	Antibodi mencegah infeksi dan menyingkirkan mikroba ekstraselular	Makrofag yang diaktifkan memusnahkan mikroba yang dimakan	CTL memusnahkan sel terinfeksi dan menyingkirkan sumber infeksi

(Sumber : Radji, 2009)

## 2.5 Peran $\alpha$ -aktin dalam Sistem Imun

$\alpha$ -aktin merupakan komponen sitoskeleton yang memiliki peran penting dalam imunitas dan berbagai proses seluler lainnya, seperti migrasi sel, pembelahan sel dan regulasi ekpresi gen. Dalam migrasi sel, terjadi pemasangan aktin yang membuat tonjolan pada bagian terkemuka yang mendorong membran sel ke depan (Pollard dan Borisy, 2003). Peckham *et al.*, (2001) juga mengungkapkan bahwa peningkatan ekpresi  $\alpha$ -aktin berdampak terhadap peningkatan tonjolan dan peningkatan migrasi sel.

Aktin merupakan regulator kunci dalam respon imun. Fungsi penting dalam mengatur keberhasilan respon imun, seperti motilitas sel, endositosis, polaritas sel, dan trafficking intraselular (Jonsson *et al.* 2012). Pada sel makrofag dan sel dendritik, aktin mengatur kemotaksis, fagositosis, dan presentasi

antigen. Selain itu remodelling aktin juga berperan dalam pengelompokan reseptor, aktivasi sel T dan sel B.



### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Fragmen Pigmen Protein* (FPP) mikroalga *C. vulgaris* yang diujikan pada ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*). Hal ini dilakukan untuk mengetahui efek dari pemberian materi nabati dalam meningkatkan sistem imun yang dilihat dari munculnya  $\alpha$ -actin. FPP didapatkan dari isolasi protein mikroalga *C. vulgaris* dengan menggunakan metode pemecahan sel dengan pelarut aseton dan dibuktikan dengan SDS-PAGE dan uji kuantitatif menggunakan Spektrofotometri. Ikan Kerapu Tikus yang digunakan sebagai hewan uji adalah berukuran  $\pm$  13-15 cm yang berasal dari BBAP Situbondo.

#### 3.2 Alat dan Bahan

##### 3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain : autoklaf, inkubator, timbangan analitik, tabung reaksi, cawan petri, magnetik stirrer, dissecting set, pipet tetes, beaker glass, erlenmeyer, pH meter, DO meter, mortar, sentrifuge, eppendorf 1,5 ml, falcon 15 ml dan 50 ml, mikropipet 2, 20, 200, dan 1000, chamber dot blot, seperangkat western blot, thermocycler, blue tip, yellow tip, white tip, seperangkat elektroforesis vertikal *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (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  $\times$ 26G, sarung tangan karet (gloves), masker, aluminium foil, hot stirrer plate, aquarium, heater, seperangkat aerasi, baki/nampan.

### 3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Mikroalga laut (*C. vulgaris*), ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*), air kolam, tissue, aluminium foil, aseton, natrium thiosulfat, Amilum,  $MnSO_4$ , NaOH+KI, kertas label, kertas alas, tali, Tryptic Soy Agar (TSA), poliakrilamide, phosphate Buffer Saline (PBS), separating gel 12,5 % dan stacking gel 4%, running buffer, TEMED, staining (Commassie brilliant blue) dan destaining (methanol: asam asetat glasial aquades 1:2:7), Ethylenediamine tetra-acetate (EDTA), nitrocelulosa (membran selovan), 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 Protein Marker).

### 3.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Darmono dan Hasan (2002), menyebutkan bahwa metode eksperimen adalah hasil kajian empiris dan menggunakan analisis dengan bantuan statistik untuk menguji hipotesis. Metode eksperimen dalam penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan pengaruh FPP pada *C. vulgaris* yang diberikan pada Ikan Kerapu Tikus sebagai kandidat antiviral VNN. Metode penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan memberikan FPP dengan dosis yang berbeda pada ikan Kerapu Tikus.

### 3.4 Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan data yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan 2 macam data, yaitu data primer dan data sekunder.

### 3.4.1 Data Primer

Data primer adalah data yang langsung dan segera diperoleh dari sumber data oleh penyelidik untuk tujuan yang khusus (Surakhmad, 1998). Data primer diperoleh dari sumbernya, diamati dan dicatat untuk pertama kalinya. Data tersebut akan menjadi data sekunder kalau dipergunakan orang yang tidak berhubungan langsung dengan penelitian yang bersangkutan. Menurut Marzuki (1983), metode yang dapat digunakan dalam pengumpulan data primer ada 3 macam, yaitu:

#### 1. 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.

#### 2. 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.

#### 3. 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.

### **3.4.2 Data Sekunder**

Data sekunder adalah data yang bukan diusahakan sendiri pengumpulannya oleh peneliti atau berasal dari tangan kedua, ketiga dan seterusnya. Misalnya dari Biro statistik, majalah, keterangan-keterangan atau publikasi lainnya (Marzuki, 1983). Widi (2010), mengatakan pengumpulan data sekunder dapat dibagi menjadi beberapa kategori, antara lain: (1) publikasi lembaga pemerintahan atau non pemerintahan seperti: data sensus, data statistik, survey pekerja, laporan kesehatan, informasi ekonomi, informasi demografi. (2) penelitian terdahulu (3) laporan atau catatan pribadi (4) media massa. Permasalahan dalam menggunakan data sekunder adalah ketersediaan data tersebut, format serta kualitas data. Yang harus diperhatikan sebelum menggunakan data sekunder adalah kebenaran data dan valid tidaknya suatu data jangan sampai peneliti terjebak pada opini pribadi atau bias dari data sekunder yang didapatkan. Data sekunder dalam penelitian ini didapatkan dari jurnal, majalah, internet, buku-buku serta instansi pemerintahan yang terkait guna menunjang keberhasilan penelitian ini.

## **3.5 Prosedur Penelitian**

### **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,
- Kompur 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,
- Kompur dimatikan dan ditunggu beberapa saat sampai termometer dan manometer menunjukkan angka 0 (nol), kemudian buka kran uap lalu buka penutup autoclave,
- Alat dan bahan yang sudah disterilkan diambil dan disimpan.

### 3.5.2 Kultur Mikroalga

Pelaksanaan kultur mikroalga *C. vulgaris* dilakukan di BBAP (Balai Budidaya Air Payau) Situbondo selama 1 minggu. Memiliki beberapa tahap di dalam laboratorium dan kultur intermediet yaitu :

#### A. Kultur Laboratorium

##### 1. Kultur agar atau kultur di plate/petridish (tanpa aerasi)

Kultur agar diawali dengan sterilisasi alat dan pembuatan media agar yang sudah diberi pupuk PA (*Pro Analis*) kemudian disterilisasi menggunakan *Autoclave* selanjutnya dituang ke petridish steril  $\frac{3}{4}$  bagian. Setelah media agar membeku dilakukan inokulasi menggunakan metode gores, atau metode pipet). *Phytoplankton* yang ditanam biasanya akan tumbuh setelah dua minggu (tergantung spesies yang ditanam).

## 2. Kultur test tube (tanpa aerasi)

Kultur agar yang sudah tumbuh dapat dipindahkan ke kultur test tube, dengan cara media steril dipupuk dengan dosis 1ml/liter. Pupuk yang digunakan adalah pupuk PA. Untuk spesies diatom menggunakan pupuk diatom dan untuk spesies *Chlorophyceae* menggunakan pupuk Walne. Sebelum melakukan kultur terlebih dahulu diambil satu koloni dari media agar dan diberi air laut steril kemudian dicek di bawah mikroskop, apabila steril tidak ada kontaminasi maka dikultur di test tube. Untuk sebuah test tube diberi media air laut steril yang sudah dipupuk  $\frac{3}{4}$  bagian kemudian diberi bibit satu koloni. Mikroalga akan tumbuh minimal 7 hari (seminggu).

## 3. Kultur erlenmeyer (tanpa aerasi)

Hasil kultur test tube selanjutnya dapat dijadikan bibit (*starter*) pada kultur erlenmeyer tanpa aerasi, disiapkan media air laut yang sudah dipupuk dengan dosis 1 ml/liter kemudian diberi bibit. Lama kultur 6-7 hari untuk spesies *Nannochloropsis sp* dan 3-4 hari untuk spesies diatom.

## 4. Kultur erlenmeyer/ stoples 1-2 liter (aerasi)

Sterilisasi media dengan cara direbus hingga mendidih kemudian dituang ke dalam wadah dan ditutup rapat. Setelah dingin dilengkapi peralatan aerasi, dipupuk dengan dosis 1ml/liter (PA), perbandingan bibit dan media adalah 3:7, dipertahankan pada suhu 25°C dan penyinaran menggunakan lampu TL 40 watt 2 buah dan inkubasi 5-7 hari.

## 5. Kultur carboy/ stoples 10 liter (aerasi)

Sterilisasi media menggunakan kaporit 10 ppm dan dinetralkan dengan thiosulfat  $\leq 5$  ppm Setelah netral dipupuk dengan dosis 1ml/liter (PA), perbandingan bibit dan media adalah 3 : 7, dipertahankan pada suhu 25°C dan penyinaran menggunakan lampu TL 40 watt 2 buah dan inkubasi 5-7 hari.

## B. Kultur intermediate

Air laut disterilisasi menggunakan kaporit 10 ppm dan dinetralkan dengan thiosulfat 5 ppm, lama sterilisasi minimal 24 jam. Sebelum dilakukan pemberian bibit terlebih dahulu diberi pupuk TG (*Technical Growth*) dengan dosis 1 ml/l. Untuk spesies diatom menggunakan pupuk diatao (TG) kemudian untuk spesies *Chlorophyceae* menggunakan pupuk Walne (TG). Perbandingan penggunaan bibit dan media adalah 3 :7. Kultur dilakukan pada ruangan semi outdoor dengan atap fiber tembus cahaya matahari Dan lama inkubasi 5-7 hari.

### 3.5.3 Proses Ekstraksi Klorofil Mikroalga

#### A. Menyiapkan Sampel

- Dilakukan pemanenan pada fase kultur intermediet dengan mengendapkan mikroalga dalam bak dengan dibantu larutan NaOH+KI (soda api) agar lebih mudah mikroalga itu mengendap ke bawah bak pengkulturan.
- Air laut dalam bak dibuang dan disisakan mikrolaga *C. vulgaris* kemudian diletakkan dalam plastik.
- Kemudian mikroalga yang sudah didapatkan kemudian disaring menggunakan kertas saring hingga terpisah antara air dan endapannya
- Setelah endapan diperoleh diletakan pada falcon 15 ml untuk dilakukan sentrifugase 4000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan air laut dan pellet mikroalga.
- Kemudian pellet diletakkan pada falcon 50 ml untuk disimpan pada lemari pendingin -80°C.

#### B. Proses Ekstraksi Klorofil

Pada ekstraksi klorofil mikroalga *C. vulgaris* menggunakan Aseton dengan rincian perlakuan yaitu:

- Sampel dikeluarkan dari lemari pendingin  $-80^{\circ}\text{C}$  dan *dithawing* sampai menjadi suhu ruangan.
- Kemudian sampel mikroalga ditimbang pada timbangan analitik sebanyak 5 gr kemudian diletakkan pada aluminium foil.
- Setelah ditimbang, sampel diletakkan kedalam mortar dan diberi Nitrogen cair hingga menjadi kaku. Hal ini dilakukan untuk memberikan kejutan kepada dinding sel mikroalga *C. vulgaris*.
- Setelah itu mikroalga digerus menggunakan alu hingga warna berubah menjadi hijau kekuningan dan mengeluarkan buih.
- Kemudian diberi aseton 80% sebanyak 60 ml ke dalam mortar kemudian dihomogenkan hingga antara aseton dan mikroalga tercampur.
- Setelah itu didiamkan selama 15 menit dengan ditutup menggunakan aluminium foil seluruh permukaan mortar agar aseton mampu mengikat klorofil yang ada di dalam mikroalga.
- Disaring menggunakan kertas saring hingga mendapatkan filtrat dari mikroalga *C. vulgaris* dan diletakkan di dalam falcon 50 ml
- Dilakukan pengukuran kandungan klorofil total dengan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 480 nm, 646 nm, dan 663 nm

### 3.5.4 Pengukuran Klorofil

Pengukuran klorofil ini dilakukan secara kuantitatif dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-VIS dengan tujuan melihat absorbansi pada panjang gelombang tertentu dari klorofil total yang didapatkan pada hasil ekstraksi di atas. Panjang gelombang yang akan diukur yaitu 646 nm dan 663 nm. Setelah didapatkan nilai absorbansi dari spektrofotometer kandungan klorofil dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Klorofil total (mg/L)} = (17,3 \times A_{646}) + (7,18 \times A_{663}) \text{ (Harborne, 1987)}$$

Ket :     A646     = absorbansi pada panjang gelombang 645 nm  
           A663     = absorbansi pada panjang gelombang 663 nm

### 3.5.5 Elektroforesis Protein SDS-PAGE (*Sodium deodecyl poliakrilamide gel electrophoresis*)

Fatchiyah (2011), menyatakan prosedur Elektroforesis protein dengan SDS-PAGE adalah sebagai berikut:

#### A. Menyiapkan sampel

1. Tambahkan sampel bufer ke dalam sampel protein (perbandingan 1 : 1) dalam tabung Eppendorf.
2. Panaskan sampel pada suhu 100°C selama 5 menit.
3. 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- PAGE adalah sebagai berikut:

- Disusun plate pembentuk gel.
- Dibuat separating gel 12,5%. Dengan cara:
  - Disiapkan tabung polipropilen 50ml.
  - Dimasukkan 3,125 ml stok akrilamida dalam tabung.
  - Dimasukkan 2,75 ml 1M Tris pH 8,8. Tabung di tutup dan digoyang secara perlahan.
  - Dimasukkan aquabides 1,505 ml. Tabung ditutup dan digoyang secara perlahan.
  - Dimasukkan 75 µl SDS 10%. Tabung ditutup lalu digoyang secara perlahan.
  - Dimasukkan 75 µl APS 10%. Tabung ditutup lalu digoyang secara perlahan.
  - Dimasukkan 6,25 µl TEMED. Tabung ditutup lalu digoyang secara perlahan.

- Dituangkan larutan ke dalam plate pembentuk gel menggunakan mikropipet 1 ml sampai batas yang terdapat pada plate.
- Secara perlahan, tambahkan aquades di atas larutan gel dalam plate agar permukaan gel tidak bergelombang.
- Lalu 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 siap untuk digunakan,
  - Menyiapkan stacking gel 3% dengan cara:
    - Disiapkan tabung polipropilen 50ml.
    - Dimasukkan 0,45 ml stok akrilamida dalam tabung.
    - Dimasukkan 0,38 ml 1M Tris pH 6,8. Tabung di tutup, lalu tabung digoyang secara perlahan.
    - Dimasukkan aquabides 2,11 ml. Tabung ditutup, lalu tabung digoyang secara perlahan.
    - Dimasukkan 30  $\mu$ l SDS 10%. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan.
    - Dimasukkan 30  $\mu$ l APS 10%. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan.
    - Dimasukkan 5  $\mu$ l TEMED. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan.

### **C. Running Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)**

Tahapan proses SDS-PAGE ini, diantaranya:

- Dimasukkan plate yang sudah berisi gel ke dalam chamber elektroforesis.
- Dituang 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.
- Dimasukkan 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.

### 1. Running sampel

Tahapan dalam proses running sampel ini, antara lain :

- Untuk memulai running, dihubungkan perangkat elektroforesis dengan sumber listrik.
- Kemudian megatur arus konstan 20 mA selama kurang lebih 40-50 menit atau sampai tracking dye mencapai jarak 0,5 cm dari dasar gel.
- Selanjutnya menuang running buffer dan mengambil gel dari plate.

### 2. Pewarnaan (*Staining*) Media/Gel Hasil **Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)**

#### 1. Pewarnaan Commasie Brilliant Blue

- a. Untuk 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

- b. Rendam gel dalam 20 ml staining solution sambil digoyang selama kurang lebih 15 menit. Setelah itu, tuang kembali larutan staining pada wadahnya.
- c. 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 yang dilakukan ketika melakukan pewarnaan perak nitrat (silver stain) adalah :

- Rendam gel dalam larutan fiksasi selama 30 menit.
- Larutan fiksasi dituang dan gel kemudian direndam dalam larutan sensitizing selama 30 menit.
- Selanjutnya gel dicuci 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.
- Gel siap diamati.

### 3.5.6 Pengukuran Berat Molekul Protein Sampel

- Untuk setiap sampel protein, 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.

### 3.5.7 Uji Invivo Pada Ikan

#### A. Aklimatisasi Ikan

Ikan uji yang digunakan yaitu ikan kerapu tikus yang pengujiannya dilakukan di BBAP Situbondo. 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 dipuaskan 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 kolam. 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 kolam sehingga mengakibatkan kolam ikan akan mengalami penurunan kualitas air utamanya oksigen terlarut. Pemberian pakan dilakukan pada jam 08.00 dan 15.00 WIB. Selain itu setiap harinya dilakukan pengukuran parameter kualitas air seperti

suhu, salinitas, pH dan oksigen terlarut untuk menjaga agar kondisi lingkungan ikan kerapu tikus tetap terjaga.

### **B. Uji *in-vivo* Fragmen Pigmen Protein pada Kerapu Tikus**

Pengujian dilakukan dengan metode sonde dengan bantuan selang *feeding tube* sebanyak 6 kali yang dilakukan selama 6 kali yaitu pada hari ke-0, ke-6, ke-9, ke-14, ke-19, dan ke-24. Masing-masing dosis yang diberikan yaitu pada hari ke-0 (306 µl), ke-6 (315 µl), ke-9 (322 µl), ke-14 (326 µl), ke-19 (345 µl) dan ke-24 (351µl). Pemberian dosis FPP mengacu pada Yanuhar (2011). Perhitungan sebagaimana terlampir pada lampiran.

Dosis FPP yang diberikan berbeda pada setiap penyondean, yaitu dengan mengitung dosis stok FPP yang sudah diperoleh dari hasil spektrofotometri dengan dibandingkan berat ikan. Pemberian FPP disesuaikan dengan berat badan ikan. Perhitungan dosis ini dilakukan untuk mendapatkan hasil yang optimal dalam melakukan penelitian, diharapkan ikan yang digunakan masih dapat menerima FPP yang diberikan sehingga dapat digunakan atau dimanfaatkan sebagai materi hayati di dalam tubuh untuk meningkatkan sistem imun pada ikan.

Ikan yang sudah dipelihara dan diberi perlakuan selama 27 hari selanjutnya dibedah untuk dianalisis organ hati ikan Kerapu Tikus. Analisis organ hati menggunakan metode SDS-PAGE, Western blotting, dan Imunohistokimia.

### **C. Uji *in-vivo* VNN pada kerapu tikus**

Penginfeksi VNN pada Kerapu Tikus menggunakan metode oral, yaitu pakan berupa ikan rucah yang disisipi daging ikan yang sebelumnya sudah positif VNN. Penginfeksi dilakukan pada hari ke-14 atau setelah penyondean FPP yang ke-4 dan diberikan secara berkala 2 kali sehari sampai hari ke 24 dengan dosis yang disesuaikan dengan berat pada ikan (Lampiran). Pengamatan dilakukan setiap jam untuk melihat perubahan tingkah laku mulai

dari normal sampai abnormal atau gejala spesifik seperti berenang yang tidak beraturan.

### 3.5.8 Isolasi Protein Organ Ikan

Ikan kerapu tikus yang sudah diberi perlakuan, kemudian dibedah. Hati yang menjadi organ target dalam penelitian ini diambil sebanyak 0,5 gr, kemudian digerus dengan menggunakan mortar. Penggerusan dilakukan di atas es selama 10 menit, kemudian ditambah buffer ekstrak (CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH:8), 20 mM EDTA, 14 M NaCl) sebanyak 500 µl. Kemudian digerus lagi 5 menit, dan disentrifuge 12.000 rpm selama 10 menit dengan kondisi suhu 4 °C. Selanjutnya supernatan diambil dan disimpan pada suhu 4°C sampai dilakukan analisa berikutnya.

### 3.5.9 IMUNOHISTOKIMIA (IHK)

Prosedur IHK mengacu pada metode Yanuهار (2009), yaitu sebagai berikut :

- Melakukan preparasi jaringan organ yang dipapar imunogenik
- Melakukan deparafinasi preparat dengan xilol 20 µm selama ± 5 menit
- Melakukan dehidrasi dengan alkohol absolut sebanyak 2 kali ulangan pada konsentrasi 90%, 80% dan 70% masing-masing selama 5 menit
- Membilas preparasi dengan dionize water 20 µm sebanyak 3 kali ulangan, masing-masing 5 menit
- Menyimpan preparasi dalam refrigerator (overnight)
- Membilas preparat dengan PBS pH 7,4 20 µm sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit
- Menginkubasi preparat dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% selama 10 menit
- Blocking unspezifik protein dan inkubasi dalam 5% PBS dengan 1-2% BSA

- Menyiapkan antibodi primer yang dilarutkan dalam larutan blotto dengan perbandingan 1:1000
- Mencuci dengan antibodi primer antibodi monoclonal $\alpha$ -aktin (AC-15), (1:1000) overnight 4°C
- Preparat kemudian dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit
- Keringkan kembali sisa-sisa PBS yang masih menempel dan siapkan antibodi sekunder yang dilarutkan dalam larutan blotto dengan perbandingan 1:200
- Preparat kemudian ditetesi dengan larutan antibodi sekunder anti mouse conjugate pajotin dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang
- Preparat kembali dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit
- Keringkan kembali sisa-sisa PBS yang masih menempel
- Menginkubasi dalam SA-HRP dengan perbandingan 1:500 selama 40 menit
- Preparat kembali dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit
- Menggunakan kromagen DAB selama 20 menit
- Preparat kembali dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit
- Memberikan counterstain dengan majer *hemotoxilen* selama 10 menit
- Membilas preparat dengan DH<sub>2</sub>O sebanyak 3 kali ulangan masing-masing selama 5 menit
- Mengeringkan preparat dengan cara diangin-anginkan
- Mengamati preparat hasil pewarnaan IHK di bawah mikroskop okuler dengan perbesaran 40x
- Mengambil gambar hasil IHK dengan menggunakan *olympus digital camera*
- Hasil

## 4. PEMBAHASAN

### 4.1 Kultur Mikroalga *Chlorella vulgaris*

Proses kultur mikroalga *C. vulgaris* dilakukan di Balai Benih Air Payau (BBAP) Situbondo, dengan durasi pengkulturan 1-2 minggu. Terdapat beberapa tahapan dalam proses kultur mikroalga *C. vulgaris*, diantaranya tahapan di dalam labotratorium dan di luar laboratorium. Pada tahap di dalam laboratorium meliputi kultur awal atau biasa disebut kultur agar, kultur murni 1 dan kultur murni 2. Sedangkan pada tahap di luar laboratorium terdapat kultur intermediet (kultur semi massal) dan kultur massal.

#### 1) Kultur skala Laboratorium

Pada kultur skala laboratorium meliputi beberapa tahapan (kultur agar, kultur murni 1 dan kultur murni 2) yang saling berkaitan, antara lain:

##### a. Kultur Agar

Kultur agar atau kultur awal dilakukan untuk menumbuhkan bibit mikroalga. Kultur agar diawali dengan proses sterilisasi alat menggunakan *autoclave* dan pembuatan media agar yang telah diberi pupuk PA (Pro Analisis). Selanjutnya media agar dituang ke dalam petridish hingga  $\frac{3}{4}$  bagian. Setelah media agar membeku dilakukan inokulasi menggunakan metode gores. Pada tahap kultur agar membutuhkan waktu  $\pm$  2 minggu untuk menumbuhkan mikroalga. Tahap inokulasi dapat dilihat pada gambar 8.



**Gambar 8.** Tahap Inokulasi (Dokumen pribadi, 2015)

b. Kultur Murni 1

Setelah melalui proses kultur awal, selanjutnya adalah tahap kultur murni

1. Tahap ini dilakukan pada toples berukuran 1-2 liter. Sterilisasi media (air laut) dilakukan dengan cara merebus hingga mendidih kemudian dituang ke dalam wadah dan ditutup rapat. Tujuan dari penutupan ini adalah untuk menghindari tumbuhnya plankton jenis lain dan berbagai patogen (virus maupun bakteri). Setelah media dingin lalu diberikan aerasi dan diberi pupuk dengan dosis 1 ml/liter. Setelah itu dimasukkan bibit ke dalam media, untuk perbandingan bibit dan media tumbuh adalah 3:7, dipertahankan pada suhu 25°C dan penyinaran menggunakan lampu TL 40 Watt sebanyak 2 buah serta diinkubasi selama 5-7 hari. Tahap kultur murni 1 dengan menggunakan toples berkapasitas 1-2 liter dapat dilihat pada gambar 9.



**Gambar 9.** Kultur murni 1 menggunakan toples berkapasitas 1-2 liter  
(Sumber : Laporan Penelitian Unggulan PT-BOPTN, 2015)

c. Kultur Murni 2

Tahap selanjutnya adalah kultur murni 2, pengkulturan dilakukan dengan menggunakan toples berkapasitas 10 liter. Proses sterilisasi sama seperti kultur murni 1, selanjutnya dilakukan penambahan kaporit sebesar 10 ppm lalu dilakukan pengukuran pH. Tujuan dilakukan pengukuran pH adalah untuk memastikan bahwa kondisi pH media dalam keadaan netral, apabila pH belum netral maka perlu ditambahkan thiosulfat  $\geq 5$  ppm. Setelah itu dilakukan

penambahan bibit kedalam media dengan perbandingan bibit dengan media sebesar 3:7, lalu ditambahkan pupuk dan vitamin dengan dosis 1ml/liter. Suhu dikondisikan pada keadaan 25°C dengan penyinaran menggunakan lampu TL 40 Watt. Proses kultur murni 2 dengan menggunakan toples berkapasitas 10 liter dapat dilihat pada gambar 10.



**Gambar 10.** Kultur murni 2 menggunakan toples berkapasitas 10 liter  
(Sumber : Laporan Penelitian Unggulan PT-BOPTN, 2015)

## 2) Kultur Intermediet

Kultur intermediet atau kultur semi massal menggunakan bak berkapasitas 500 liter sampai 1000 liter. Kultur dilakukan di ruangan semi outdoor dengan atap fiber tembus cahaya matahari. Sterilisasi media (air laut) menggunakan chlorin dengan dosis 30 ppm (30 g/ton air) selama 6 jam. Selanjutnya aerasi dihidupkan sampai chlorin tercampur rata diseluruh badan air. Selanjutnya penetralan chlorin dilakukan dengan pemberian Na-thiosulfat 10 ppm dan diaerasi. Penambahan pupuk dengan dosis 1 ml/liter, setelah itu bibit dimasukkan ke dalam media steril dengan perbandingan antara bibit dengan media sebesar 3:7. Pada tahap kultur intermediet, proses inkubasi dilakukan selama 5-7 hari. Tahap kultur intermediet dapat dilihat pada gambar 11.



**Gambar 11.** Tahap kultur semi masal (Dokumen pribadi, 2015)

#### 4.2 Isolasi Protein *C. vulgaris*

Kultur *C. vulgaris* yang dilakukan di BBAP Situbondo sebanyak  $\frac{1}{2}$  ton berat basah dapat menghasilkan endapan atau biasa disebut dengan bubur *C. vulgaris* sebanyak 830 ml. Sebelum melakukan proses isolasi Fragmen Pigmen Protein, klorofil dan karotenoid bubur tersebut dipindahkan ke dalam 17 falcon steril, masing-masing falcon memiliki volume sebesar 50 ml. Setelah itu bubur yang terdapat didalam falcon disimpan pada deep freezer dengan suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  agar kualitas dari bubur *C. vulgaris* tetap terjaga. Proses penyimpanan bubur *C. vulgaris* didalam falcon berukuran 50 ml dapat dilihat pada gambar 12.



**Gambar 12.** Penyimpanan bubur *C. vulgaris* didalam falcon berukuran 50 ml (Sumber : Laporan Penelitian Unggulan PT-BOPTN, 2015)

#### 4.2.1 Isolasi Fragmen Pigmen Protein (FPP) *C. vulgaris*

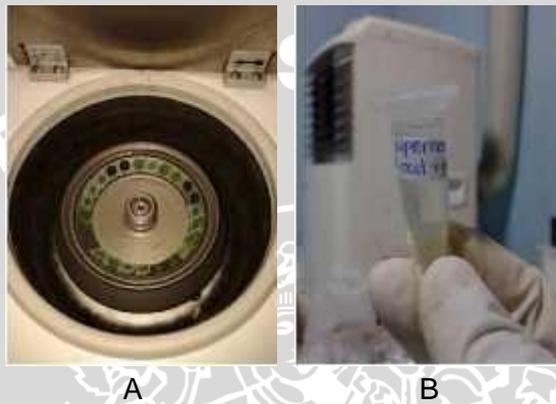
Proses isolasi FPP mengacu pada penelitian Yanuhar (2015), yaitu langkah pertama yang dilakukan adalah mengambil bubuk *C. vulgaris* di dalam deep freezer pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  kemudian disesuaikan dengan suhu kamar  $20^{\circ}$  (*thawing*). Selanjutnya sampel bubuk *C. vulgaris* ditimbang sebanyak 10 gr, setelah itu sampel diletakkan dalam mortal serta ditambahkan nitrogen cair yang berfungsi untuk memberi kejutan pada sel agar mulut sel terbuka sehingga dinding sel dari *C. vulgaris* lebih mudah untuk dipecah saat proses penggerusan dan protein didalam *C. vulgaris* dapat keluar. Setelah pemberian nitrogen cair, sampel digerus selama 15 menit kemudian ditambahkan glisin dan KCl sebanyak 7 ml secara bertahap. Pemberian glisin dan KCl ini bertujuan sebagai pelarut. Kemudian penggerusan dilakukan selama 2 jam hingga sampel berubah warna menjadi hijau kekuningan dan mengeluarkan buih. Proses penggerusan bubuk *C. vulgaris* di dalam mortal dapat dilihat pada gambar 13.



**Gambar 13.** Proses penggerusan bubuk *C. vulgaris*  
(Sumber : Laporan Penelitian Unggulan PT-BOPTN, 2015)

Hasil penggerusan dimasukkan kedalam eppendorf steril berukuran 2 ml yang selanjutnya akan dilakukan proses *sentrifuge* dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Setelah *sentrifuge* selesai, dilakukan pemisahan antara supernatan (cairan berwarna bening) dengan pellet (bagian yang mengendap). Setelah melakukan proses *sentrifuge*, supernatan yang telah didapat diukur

konsentrasi protein menggunakan *nanodrop-spectrophotometry* UV-VIS. Pengukuran whole protein (kadar protein total dalam mikroalga) dengan *nanodrop-spectrophotometry* menggunakan 3 panjang gelombang yaitu 260, 280 dan 320 nm dan didapatkan hasil protein *C. vulgaris* sebesar 5,649 mg/ml. Proses *sentrifuge* dan hasil yang didapat berupa supernatan dapat dilihat pada gambar 14.



**Gambar 14.** (A) *Sentrifuge* dan (B) supernatan merupakan hasil dari *sentrifuge* (Sumber : Laporan Penelitian Unggulan PT-BOPTN, 2015)

#### 4.2.2 Isolasi Klorofil dan Karotenoid *C. vulgaris*

Proses isolasi klorofil dan karotenoid hampir sama dengan isolasi FF, akan tetapi pada isolasi klorofil menggunakan aseton sebagai pelarut. Langkah awal yang dilakukan adalah sampel *C. vulgaris* dikeluarkan dari deep freezer pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  dan dilakukan proses penyesuaian suhu seperti suhu kamar  $20^{\circ}\text{C}$  (*thawing*).

Sampel *C. vulgaris* ditimbang sebanyak 2,5 gr, kemudian sampel diletakkan kedalam mortal dan ditambahkan nitrogen cair hingga bubur *C. vulgaris* menjadi kaku. Pemberian nitrogen cair berfungsi untuk memberi kejutan pada sel agar dindingsel lebih mudah untuk dipecahkan saat digerus, seperti pernyataan Bintang (2010), pemecahan sel secara mekanik dapat dilakukan dengan metode *solid shear* atau pemecahan padatan, pemecahan sel (tanaman,

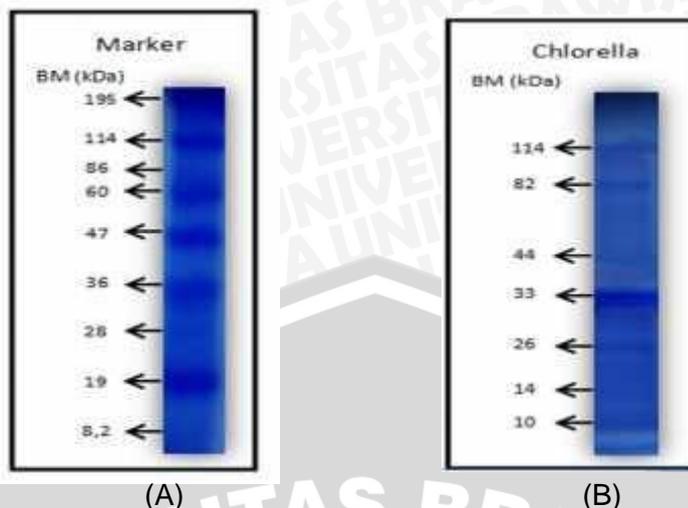
yeast dan bakteri) ini dapat dilakukan dengan cara penggerusan di mortal dengan penambahan nitrogen cair. Setelah itu dilakukan penggerusan menggunakan alu hingga warna berubah.

Selanjutnya pemberian aseton 80% sebanyak 60 ml serta dihomogenkan hingga aseton dan bubur *C. vulgaris* tercampur, hal ini dilakukan agar klorofil dan karotenoid yang ada didalam mikroalga dapat terlarut. Permukaan mortal ditutup menggunakan alumunium foil dan didiamkan selama 15 menit, selanjutnya alumunium foil dibuka dan hasil yang terdapat pada mortal disaring menggunakan kertas saring sehingga didapatkan hasil berupa filtrat dari *C. vulgaris* kemudian disimpan didalam falcon bervolume 50 ml. Langkah berikutnya adalah hasil isolasi klorofil dan karotenoid dianalisa secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 480 nm untuk analisis karotenoid dan panjang gelombang 646 dan 663 nm untuk analisis klorofil.

### **4.3 Analisis Fragmen Pigmen Protein (FPP) *C. vulgaris***

#### **4.3.1 Analisis Kualitatif**

Analisis kualitatif pada mikroalga *C. vulgaris* menggunakan metode *Sodium Dodesyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Metode ini digunakan untuk memisahkan antara mikroalga *C. vulgaris* dengan fragmen pigmen proteinnya, terdapat pewarnaan dalam metode SDS-PAGE yang berfungsi untuk menggambarkan pita-pita protein yang terbentuk dari gel hasil elektroforesis. Berikut ini merupakan gambar hasil SDS-PAGE dari ekstraksi mikroalga *C. vulgaris*. Hasil SDS-PAGE protein *C. vulgaris* dan marker dapat dilihat pada gambar 15.



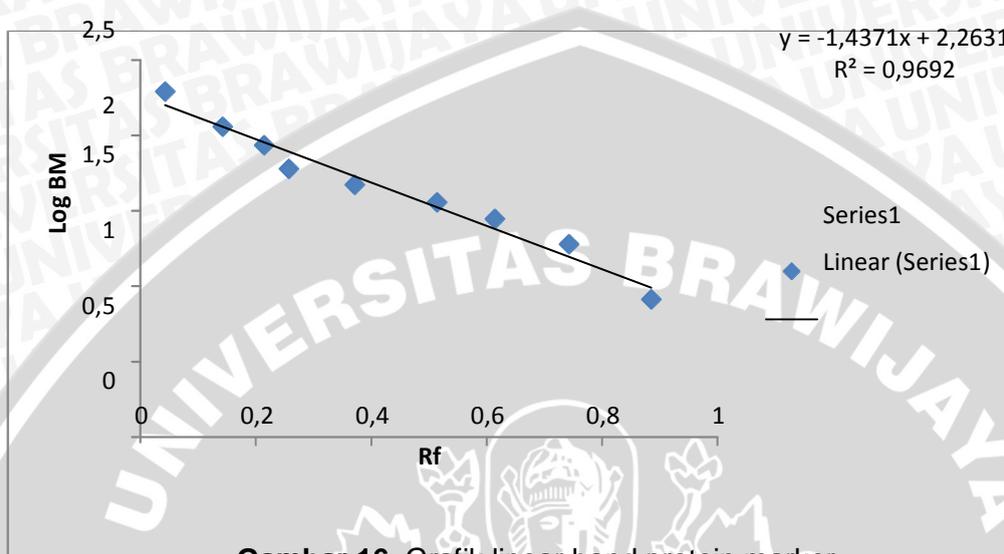
**Gambar 15.** (A) Marker (B) Hasil SDS-PAGE Protein *C. vulgaris*

Hasil analisis pada Gambar 15 menunjukkan adanya band protein *Piridinin Chlorophyl Protein* (PCP) yang terlihat. Untuk mengetahui berat molekul band protein tersebut diperlukan perhitungan. Pertama perhitungan untuk mencari rumus linier band protein marker yang digunakan. Hasil perhitungan dapat dilihat pada Tabel 2 di bawah ini.

**Tabel 2.** Perhitungan Berat Molekul Band Pita 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	17	70	0,242857143
60	1,77815125	20	70	0,285714286
47	1,672097858	30	70	0,428571429
36	1,556302501	36	70	0,514285714
28	1,447158031	41	70	0,585714286
19	1,278753601	53	70	0,757142857
8,2	0,913813852	60	70	0,857142857

Setelah didapat hasil perhitungan berat molekul pada pita band protein marker, selanjutnya menghitung persamaan linear dari hasil di atas dengan menggunakan Microsoft excel. Hasil perhitungan grafik linear dapat dilihat pada Gambar 16 di bawah ini:



**Gambar 16.** Grafik linear band protein marker.

Pada Grafik di atas didapatkan persamaan linier band protein marker yaitu  $y = -1,437x + 2,263$ . Setelah mendapatkan persamaan tersebut kemudian dilakukan perhitungan berat molekul band protein *C. vulgaris*. Hasil perhitungan band protein dapat dilihat pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Perhitungan berat molekul band protein *C. vulgaris*

A(cm)	B(cm)	Rf (x)	$y = -1,4371x + 2,2631$	BM Sampel
10	70	0,142857	2,0578	114,2352141
17	70	0,242857	1,91409	82,05215656
30	70	0,428571	1,6472	44,38129803
36	70	0,514286	1,52402	<b>33,42104306</b>
41	70	0,585714	1,42137	26,38578382
53	70	0,757143	1,17501	<b>14,96270109</b>
60	70	0,857143	1,0313	10,74731554

Setelah perhitungan berat molekul band protein, ditemukan bahwa FPP pada *C. vulgaris* terdapat beberapa band protein dengan berat molekul 114 kDa, 82 kDa, 44 kDa, 33kDa, 26 kDa, 14 kDa, 10 kDa. Berdasarkan band protein yang ditemukan, dapat diindikasikan bahwa pada *C. vulgaris* memiliki kandungan *Peridinin Chlorophyl Protein* (PCP) dalam 2 bentuk yaitu, bentuk monomer (bentuk panjang) dengan berat molekul protein 33 dan homodimer (bentuk pendek) dengan berat molekul 14. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Weis *et al*, (2002) yang menyebutkan bahwa *Peridinin* memiliki dua bentuk yaitu satu sebagai homodimer (bentuk pendek) dengan berat molekul berkisar 14-16 kDa dan yang lain sebagai monomer (bentuk panjang) dengan berat molekul berkisar antara 30-35 kDa.

#### 4.3.2 Analisis Kuantitatif

Analisis kuantitatif pada penelitian ini menggunakan alat spektrofotometer UV-VIS. Tujuan menggunakan alat ini adalah untuk melihat absorbansi pada panjang gelombang tertentu dari klorofil total yang didapatkan pada hasil ekstraksi yang sudah dilakukan. Panjang gelombang yang akan diukur yaitu 646 nm, 663 nm dan 480 nm.

Hasil yang didapatkan dari ekstraksi klorofil pada pengukuran panjang gelombang 480 nm adalah 1.258 mg/l, pada panjang gelombang 646 nm yaitu 0,271 dan pada panjang gelombang 663 yaitu 0,405 mg/l. Dengan demikian didapatkan hasil analisis kuantitatif pada kandungan essential mikroalga pada Tabel 4 di bawah ini yaitu :

**Tabel 4.** Kandungan Essential Mikroalga *C. vulgaris*

$\beta$ - karoten (mg/l)	Klorofil a (mg/l)	Klorofil b (mg/l)	Klorofil total (mg/l)
3.50	4.27	4.32	7.60

Apabila dibandingkan dengan penelitian *Qian et al.*, (2009) jumlah klorofil yang didapat pada *C. vulgaris* antara klorofil a dan klorofil b adalah sebesar  $\pm 5$  mg/l dan  $\pm 2,5$  mg/l. Hasil yang didapat sedikit berbeda, hal ini disebabkan pengaruh oleh beberapa faktor yaitu proses pemecahan dinding sel yang tidak optimal, tingginya tingkat kontaminasi pada sample atau ketidakmurnian pelarut yang digunakan. Hal ini juga dinyatakan dalam penelitian yang dilakukan oleh (Harnadiemas, 2012) yang menyatakan kemurnian dari pelarut merupakan salah satu factor yang menjadi penentu pada analisis kuantitatif karena akan mempengaruhi zat terlarut yang didalamnya.

#### 4.4 Uji in Vivo pada Ikan Kerapu Tikus

Setelah dilakukan isolasi pada FPP mikroalga *C. vulgaris*, dilakukan pengujian kepada ikan kerapu tikus dengan cara oral (metode sonde) yaitu metode memasukan FPP melalui mulut ikan. Ikan kerapu tikus yang digunakan berukuran  $\pm 13-15$  cm, dipilih ikan kerapu tikus dengan ukuran tersebut karena pada ukuran ini ikan tergolong dalam fase juvenil, dimana ikan belum mempunyai sistem imun yang sempurna.

Pengujian in-vivo FPP pada ikan kerapu tikus dilakukan selama 27 hari. Ikan uji menggunakan kerapu tikus dengan berat tubuh rata-rata 46 gr. Pemberian FPP pada ikan kerapu tikus dilakukan dengan menggunakan metode sonde. Menurut Yanuhar (2009), metode sonde merupakan pemberian makanan kedalam tubuh ikan dengan cara memasukkan makanan tersebut langsung kedalam mulut ikan. Dosis yang digunakan disesuaikan dengan berat badan ikan. Pemberian FPP dilakukan sebanyak 6 kali yaitu pada hari ke-0 dengan dosis hari ke-0 (306  $\mu$ l), hari ke-6 (315  $\mu$ l), hari ke-9 (322  $\mu$ l), hari ke-14 (326  $\mu$ l), hari ke-19 (345  $\mu$ l) dan hari ke-24 (351  $\mu$ l). Tahap penyondean FPP pada *C. altivelis* dapat dilihat pada gambar 17.



**Gambar 17.** Teknik penyondean FPP pada ikan kerapu tikus (*C. altivelis*)  
(Sumber : Laporan Penelitian Unggulan PT-BOPTN, 2015)

Berdasarkan pengamatan yang dilakukan pada penelitian ini, terdapat perbedaan respon yang diberikan pada ikan kontrol, ikan + FPP, ikan + VNN, dan ikan + FPP + VNN. Pada ikan kontrol ikan dalam kondisi normal, hal tersebut dilihat dari aktivitas berenang yang aktif pada hampir semua akuarium, warna tubuh yang cerah dan respon yang baik terhadap gerakan dan juga pakan. Selain itu data pertumbuhan juga normal yaitu 0,97 gr/hari. Berbeda dengan hasil pengamatan perlakuan yang lain. Pada perlakuan ikan dengan penambahan FPP tidak terjadi perbedaan aktivitas pada ikan, hanya saja warna yang sedikit berubah dan pertumbuhan yang lebih kecil dibandingkan ikan kontrol. Hal ini diindikasikan karena perlakuan pemberian FPP yang dilakukan dengan metode sonde yang sedikit membuat ikan menjadi stres. Menurut Yokoyama *et al.*, (2006) menyatakan bahwa stres pada ikan akan berdampak terhadap menurunnya laju pertumbuhan pada ikan.

Pada perlakuan ikan dengan penginfeksi VNN memberikan perubahan yang cukup signifikan. Hal tersebut dapat dilihat dari aktifitas ikan yang lebih sering berada di dasar, warna yang gelap, respon yang menurun pada gerakan maupun pakan, dan akhirnya terjadi kematian ikan pada minggu ke-2 pemeliharaan. Perubahan performa tersebut merupakan dampak dari serangan

virus pada ikan. Beberapa penelitian menyatakan, serangan virus ini akan berdampak terhadap menurunnya nafsu makan, berenang terbalik dan berdiam di dasar kolam (Roza *et al.*, 2002), kemudian terjadi kematian (Roza *et al.*, 2003). Sedangkan menurut Bovo *et al.*, (1999) menyatakan serangan VNN akan berdampak terhadap abnormalnya tingkah laku dan gangguan penglihatan yang diakibatkan kerusakan sistem saraf pusat dan retina, seperti nekrosis, vakuolasi, dan adanya granulat pada jaringan mata.

Pada perlakuan ikan dengan pemberian FPP dan diinfeksi dengan VNN memperlihatkan ikan yang masih bisa dikatakan dengan kondisi normal. Hal tersebut dilihat dari aktifitas berenang ikan, warna, dan respon terhadap pakan. Selain itu meskipun ikan sudah diinfeksi VNN, tetapi masih bisa bertahan sampai akhir masa pemeliharaan. Kondisi ini diasumsikan pemberian FPP mampu membentuk sistem imun yang baik, dan ketika terjadi serangan VNN ikan mampu bertahan. Yang tampak juga pada perlakuan ini adalah pertumbuhan berat badan yang lebih kecil dari ikan kontrol dan ikan pemberian FPP saja. Ini merupakan dampak serangan VNN dan ikan memanfaatkan energi yang dimiliki untuk pembentukan gen-gen antivirus, sehingga dapat mempengaruhi laju pertumbuhan. Menurut Mcloughlin dan Graham (2007) serangan virus pada ikan dapat berdampak terhadap perilaku, asupan makanan dan pertumbuhan. Pada saat terjadi infeksi, ikan mampu mengeliminasi virus akan tetapi akan berdampak terhadap terganggunya pertumbuhan (Heidari, *et al.*, 2015). Hasil pengamatan tersaji pada Tabel 5.

**Tabel 5.** Performa atau respon ikan selama pemeliharaan

Perlakuan	Aktivitas	Warna Tubuh	Respon	Pertumbuhan	Keterangan
Ikan Kontrol	Aktif berenang hampir di seluruh kolom akuarium	Cerah	Responsif terhadap gerakan dan pakan	Penambahan berat Total (23,2 gr), sedangkan Perhari (0,97 gr)	Normal
Ikan + FPP	Aktif berenang hampir di seluruh kolom akuarium, terkadang bergerombol di aerasi	Cenderung putih cerah keabu-abuan	Responsif terhadap gerakan dan pakan	Penambahan berat Total (12 gr), sedangkan Perhari (0,50 gr)	Normal
Ikan + VNN	Berenang di dasar akuarium dan sering bergerombol di aerasi	Cenderung Gelap, coklat tua agak hitam	Kurang responsif dan nafsu makan menurun, terjadi <i>Whirling</i>	Ikan mati pada minggu ke-2	Serangan VNN menimbulkan kematian pada minggu ke-2
Ikan + FPP + VNN	Aktif berenang hampir di seluruh kolom akuarium, terkadang bergerombol di aerasi	Putih keabu-abuan	Kurang responsif terhadap gerakan, akan tetapi respon pakan normal	Penambahan berat Total (8,8 gr), sedangkan Perhari (0,37 gr)	Pertumbuhan berat cenderung lebih kecil karena infeksi virus

#### 4.5 Hasil Uji Imunohistokimia $\alpha$ -aktin Pada Organ Hati Ikan Kerapu

##### Tikus (*Cromileptes altivelis*)

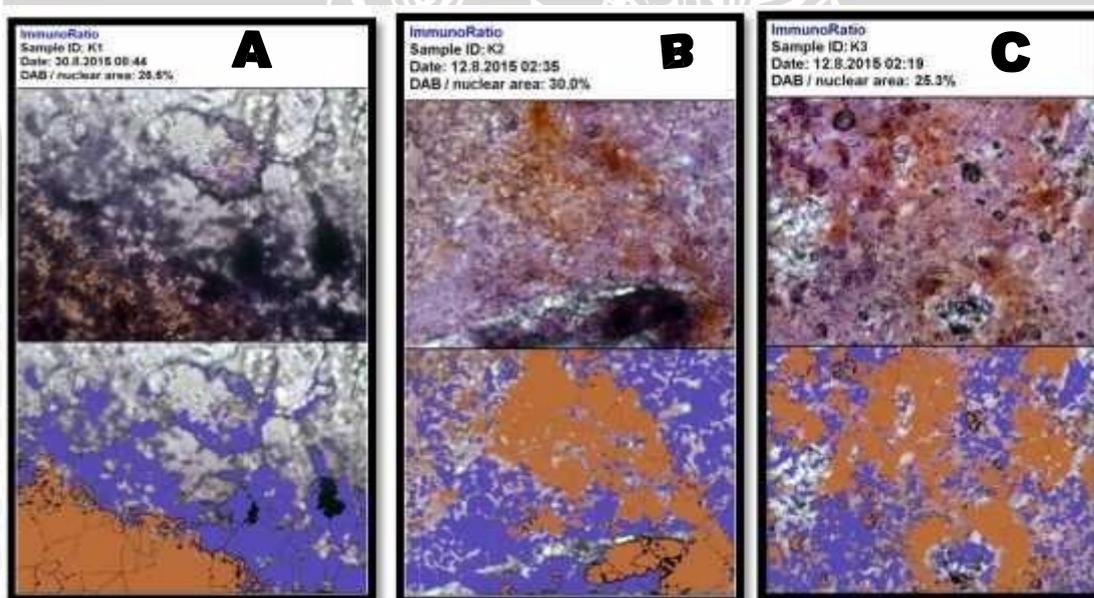
Imunohistokimia (IHK) merupakan metode yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan antigen spesifik di dalam suatu sel jaringan dengan menggunakan prinsip pengikatan antara antibodi dengan antigen pada jaringan hidup. Pada penelitian ini menggunakan organ perlakuan yaitu hati ikan Kerapu Tikus. Tujuan penggunaan organ hati karena hati pada ikan merupakan bagian terpenting yang berfungsi mensekresikan bahan untuk proses pencernaan. Organ ini merupakan suatu kelenjar kompak berwarna merah kecoklatan

tersusun oleh sel hati (hepatosit) yang sangat erat kaitannya dengan fungsi dari empedu (Fujaya, 2008).

Terdapat 4 perlakuan dalam penelitian ini antara lain, organ tanpa perlakuan (Kontrol), organ dengan perlakuan VNN, organ dengan perlakuan FPP dan Organ dengan perlakuan VNN+FPP. Tahap analisa data yang digunakan dalam imunohistokimia, mengacu pada tehnik yang digunakan oleh Ramadhani, *et al.* (2012), yaitu menggunakan *ImmunoRatio* (IR). IR dapat digunakan secara *on line* maupun *off line* untuk menganalisis citra digital hasil pewarnaan IHK.

#### 4.5.1 Organ Hati Ikan Kontrol

Ikan kontrol merupakan ikan yang tanpa diberikan perlakuan FPP maupun VNN. Pengamatan ini dilakukan dengan tujuan untuk melihat profil  $\alpha$ -ktin pada ikan normal. Hasil IHK organ ikan kontrol dapat dilihat pada gambar 18 di bawah ini.

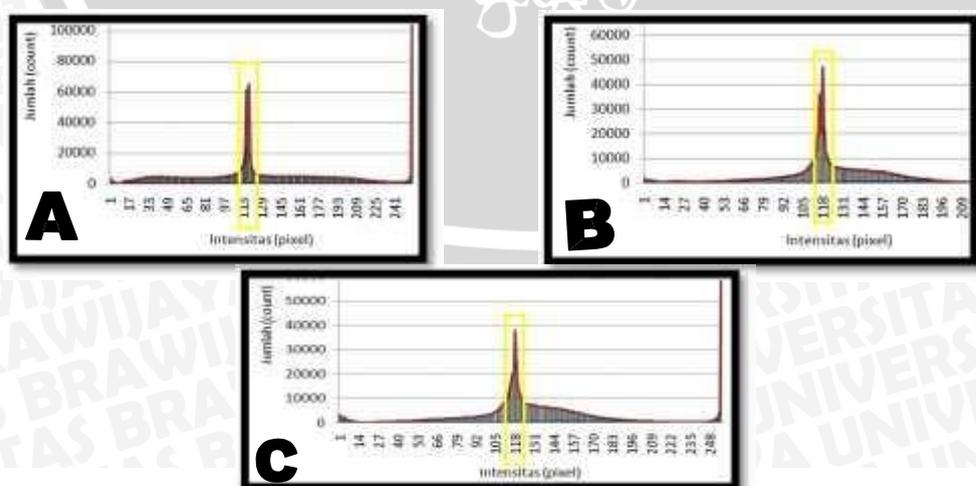


**Gambar 18.** Hasil Pengamatan Profil organ hati ikan kontrol (a) kontrol 1, (b) kontrol 2 dan (c) kontrol 3.

Gambar di atas menunjukkan bahwa organ hati ikan kontrol masih berada dalam kondisi normal, hal tersebut dapat dilihat dari penampakan sel-sel jaringan

yang berada dalam kondisi normal. Hasil analisis *immunoratio* ikan kontrol pada ulangan 1 (Gambar 18a) didapatkan nilai DAB sebesar 26,6%, selanjutnya pada ulangan ke 2 organ ikan kontrol (Gambar 18b) didapatkan nilai DAB sebesar 30% dan pada ulangan ke 3 (Gambar 18c) didapatkan nilai DAB sebesar 25,3%, sehingga didapatkan nilai rata-rata DAB pada ketiga ulangan sebesar 27,3%. Nilai rata-rata DAB sebesar 27.3% menunjukkan bahwa pada organ ikan kontrol terdapat gen target  $\alpha$ -aktin yang ditunjukkan dengan warna kuning kecoklatan, hal tersebut menandakan bahwa adanya ikatan antara antigen dengan antibodi.

Analisis  $\alpha$ -aktin juga dapat dihitung melalui pencitraan *software imageJ*. ImageJ merupakan *software* yang dapat menghitung keberadaan gen target berdasarkan tingkat kerapatan gambarnya. Menurut Vargnese et al., (2014) analisis IHK bisa dilakukan dengan pencitraan gambar imageJ untuk melihat kerapatan pixelnya, semakin kecil angka yang tertera menandakan bahwa hasil yang didapat adalah semakin pekat. Penilaian histogram disini didasarkan pada intensitas pixel, angka 0 mewakili angka paling gelap/pekat sedangkan angka 255 menunjukkan angka terang/rendah. Terdapat 4 zona dari angka 0 sampai 255 yaitu, 0-60 merupakan zona positif kuat, 61-120 merupakan zona positif, 121-180 zona positif lemah dan 181-225 merupakan zona negatif. Grafik histogram organ hati ikan kontrol dapat dilihat pada Gambar 19 di bawah ini.

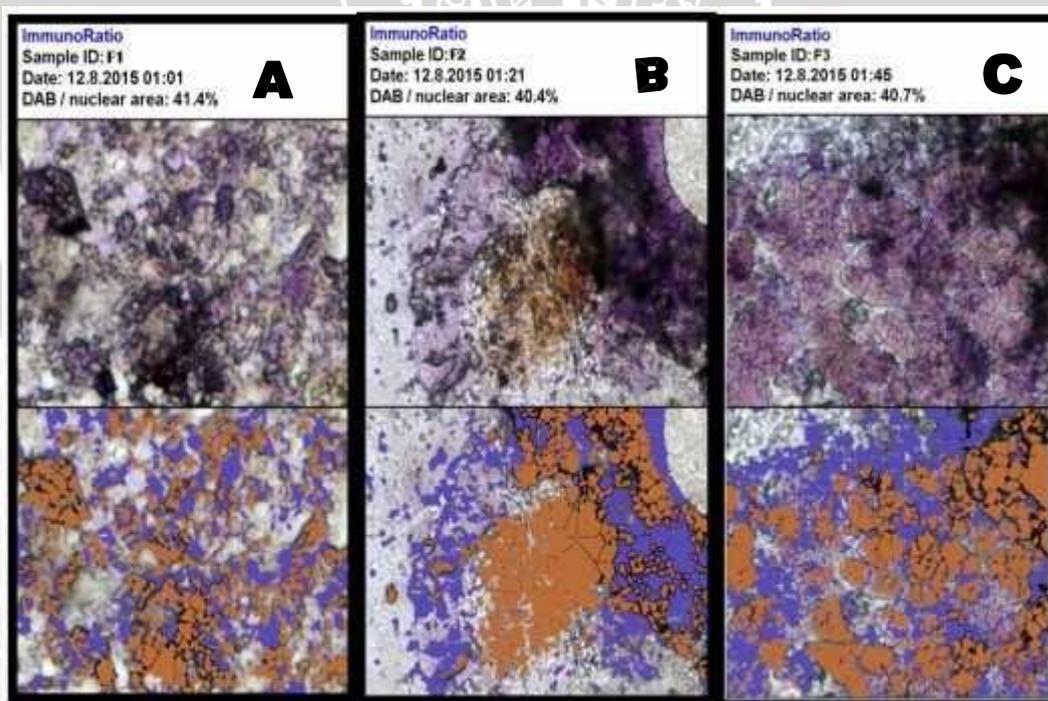


**Gambar 19.** Grafik organ hati ikan kontrol menggunakan *software imageJ* (a) kontrol 1, (b) kontrol 2 dan (c) kontrol 3.

Pada gambar organ ikan kontrol 1 (Gambar 19a) menunjukkan adanya keberadaan gen target  $\alpha$ -aktin dalam kategori positif karena terdapat pada kisaran 115-120, sedangkan pada ikan kontrol 2 (Gambar 19b) menunjukkan gen target  $\alpha$ -aktin berada pada kisaran 110-120 yang berarti ikan kontrol 2 berada pada kategori positif. Organ ikan kontrol 3 (Gambar 19c) menunjukkan keberadaan gen target  $\alpha$ -aktin juga berada dalam kategori positif dikarenakan gen target berada pada kisaran 110-120.

#### 4.5.2 Organ Hati Ikan dengan Pemberian Fragmen Pigmen Protein (FPP)

Pada organ ikan dengan pemberian FPP terdapat perbedaan apabila dibandingkan dengan ikan kontrol, terjadi peningkatan  $\alpha$ -aktin yang cukup signifikan. Hasil IHK organ hati yang diberikan perlakuan FPP dapat dilihat pada gambar di bawah ini.

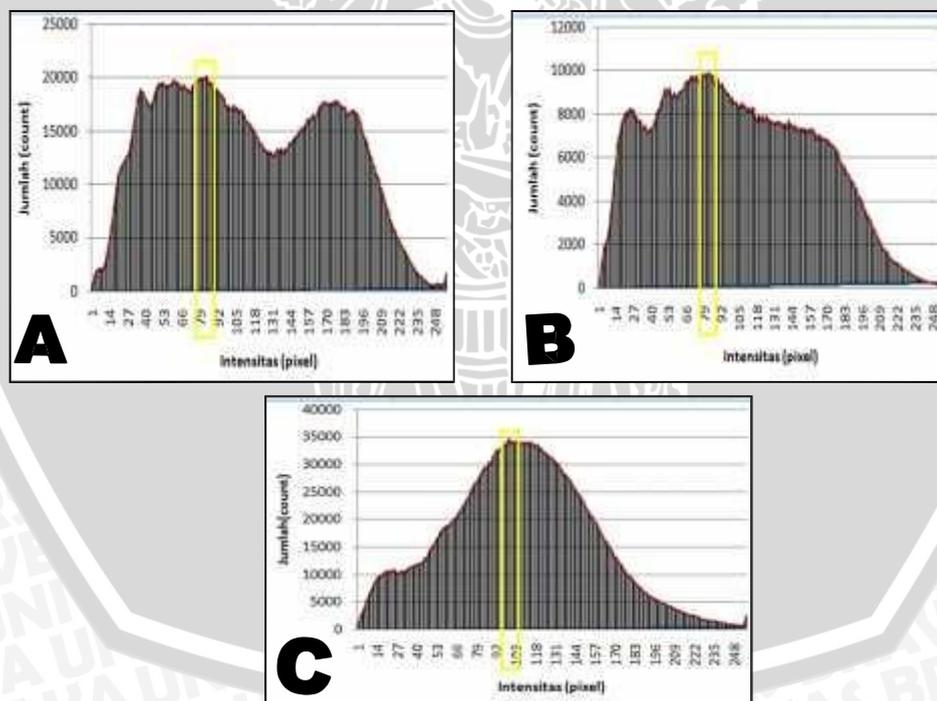


**Gambar 20.** Hasil Pengamatan Profil organ hati dengan pemberian FPP (a) ulangan 1, (b) ulangan 2 dan (c) ulangan 3.

Pada gambar di atas terlihat adanya warna kuning kecoklatan yang cukup banyak, hal tersebut menandakan adanya ikatan antara antigen dengan

antibodi yang diberikan. Hasil analisis *immunoratio* pada ikan dengan perlakuan pemberian FPP didapatkan nilai rata-rata DAB pada ketiga ulangan sebesar 40,83%. Nilai rata-rata DAB sebesar 40,83% didapatkan dari prosentase gambar 20a sebesar 40,4%, presentase gambar 20b sebesar 41,4% dan prosentase gambar 20c sebesar 40,7%. Hal tersebut menyatakan bahwa pada organ hati dengan perlakuan pemberian FPP terdapat rata-rata ekspresi  $\alpha$ -aktin sebesar 40,83%. Pemberian FPP mampu menjadi *inducer* dalam meningkatkan ekspresi  $\alpha$ -aktin yang dibuktikan dengan meningkatnya nilai prosentase DAB pada organ ikan dengan perlakuan pemberian FPP jika dibandingkan dengan nilai DAB pada organ ikan kontrol.

Grafik histogram organ hati ikan dengan perlakuan pemberian FPP dapat dilihat pada Gambar 21 di bawah ini.



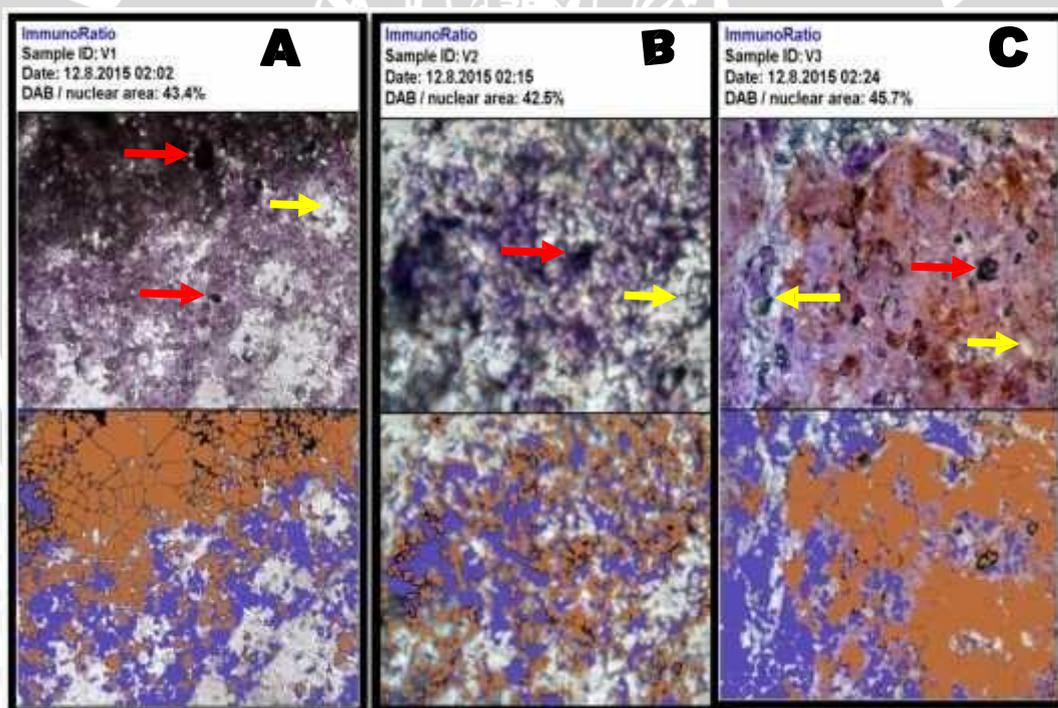
**Gambar 21.** Grafik organ hati ikan perlakuan FPP dengan menggunakan software *imageJ*, (a) ulangan 1, (b) ulangan 2 dan (c) ulangan 3.

Pada gambar organ hati ikan dengan pemberian FPP 1 (Gambar 21a) menunjukkan bahwa keberadaan gen target  $\alpha$ -aktin dalam kategori positif karena

terdapat pada kisaran 75-85, sedangkan pada organ ikan perlakuan FPP 2 (Gambar 21b) menunjukkan gen target  $\alpha$ -aktin berada pada kisaran 70-80 yang berarti organ ikan perlakuan FPP 2 berada pada kategori positif. Organ ikan dengan pemberian FPP 3 (Gambar 21c) menunjukkan keberadaan gen target  $\alpha$ -aktin juga berada dalam kategori positif dikarenakan gen target berada pada kisaran 95-105.

#### 4.5.3 Organ Hati Ikan Perlakuan VNN

Pada perlakuan organ hati dengan penginfeksi virus terdapat perbedaan apabila dibandingkan dengan perlakuan kontrol dan perlakuan FPP. Gambar hasil IHK organ hati ikan perlakuan VNN dapat dilihat pada gambar 22 di bawah ini.

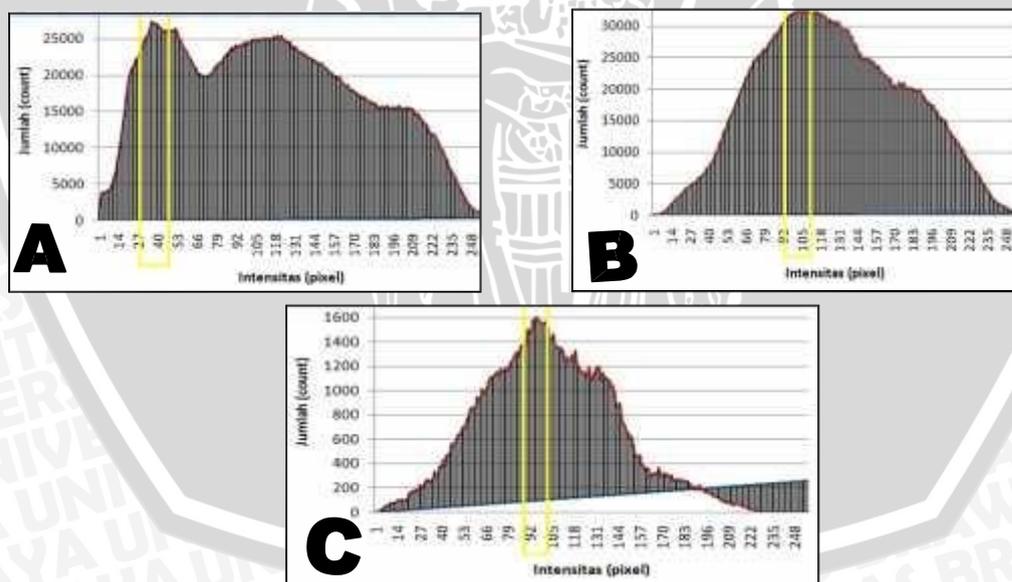


**Gambar 22.** Hasil Pengamatan Profil organ hati ikan perlakuan Pemberian VNN (a) ulangan 1, (b) ulangan 2 dan (c) ulangan 3.

Gambar di atas menunjukkan hasil analisis *immunoratio* pada ikan dengan perlakuan pemberian VNN, didapatkan nilai rata-rata DAB pada ketiga ulangan sebesar 43,86%. Nilai rata-rata DAB sebesar 43,86% didapatkan dari

prosentase gambar 22a sebesar 42,5%, presentase gambar 22b sebesar 43,4% dan prosentase gambar 22c sebesar 45,7%. Terjadi peningkatan warna kuning kecoklatan yang lebih banyak apabila dibandingkan dengan perlakuan kontrol, hal ini menandakan bahwa tubuh ikan dapat merespon masuknya virus dengan meningkatnya sistem imun yang ditandai dengan bertambahnya  $\alpha$ -aktin.

Hasil analisis imunohistokimia terlihat adanya kerusakan jaringan akibat pemberian infeksi VNN. Terdapat beberapa kerusakan yang terjadi seperti kerusakan vakuolis (ruang kosong) yang ditunjukkan oleh panah kuning dan necrosis (peradangan) yang ditunjukkan oleh panah merah. Nekrosis (peradangan) biasanya ditandai dengan adanya warna merah disekitar jaringan (Sukarni *et al.*,2012). Hal ini mengindikasikan bahwa serangn VNN yang menyerang ikan kerapu tikus menyebabkan kerusakan sel dan jaringan pada inang. Grafik histogram organ hati ikan perlakuan VNN dapat dilihat pada gambar 23 di bawah ini.



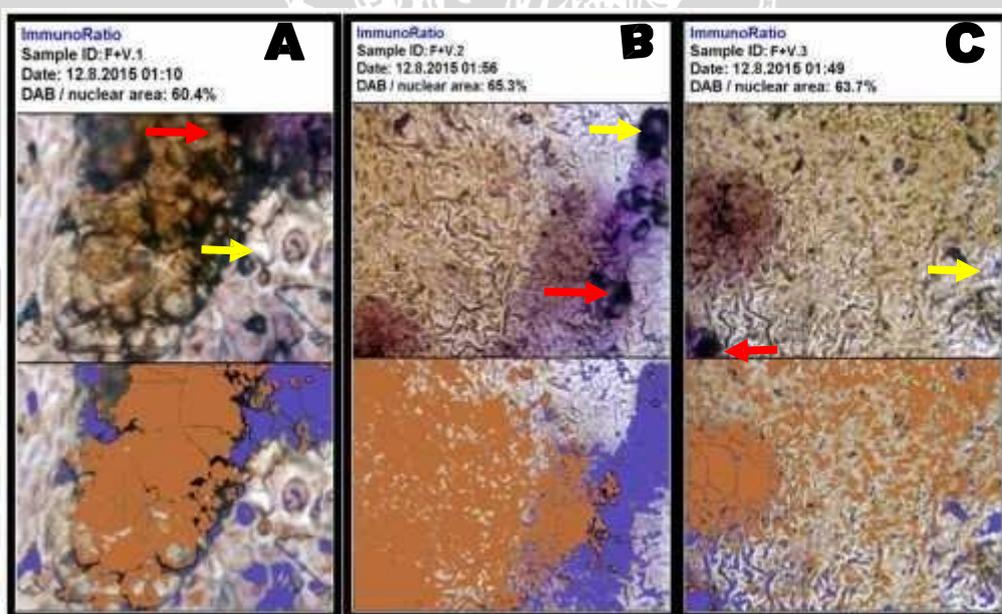
**Gambar 23.** Grafik organ hati ikan perlakuan VNN dengan menggunakan software *imageJ* (a) ulangan 1, (b) ulangan 2 dan (c) ulangan 3.

Pada gambar organ ikan dengan pemberian VNN 1 (Gambar 23a) menunjukkan bahwa keberadaan gen target  $\alpha$ -aktin dalam kategori positif kuat

karena terdapat pada kisaran 30-40, sedangkan pada organ ikan perlakuan VNN 2 (Gambar 23b) menunjukkan gen target  $\alpha$ -aktin berada pada kisaran 95-105 yang berarti organ ikan perlakuan VNN 2 berada pada kategori positif. Organ ikan dengan pemberian VNN 3 (Gambar 23c) menunjukkan keberadaan gen target  $\alpha$ -aktin juga berada dalam kategori positif dikarenakan gen target berada pada kisaran 90-100.

#### 4.5.4 Organ Hati Ikan Perlakuan FPP dan VNN

Pada organ hati ikan yang diinduksi FPP dan diinfeksi VNN mengalami peningkatan jumlah  $\alpha$ -aktin yang sangat banyak apabila dibandingkan dengan perlakuan-perlakuan yang lainnya. Peningkatan  $\alpha$ -aktin ditunjukkan dengan banyaknya warna kuning kecoklatan. Berikut adalah gambar hasil IHK dari organ ikan perlakuan yang diinduksi FPP dan infeksi VNN. Gambar hasil IHK organ hati ikan perlakuan VNN dan infeksi VNN dapat dilihat pada gambar 24 di bawah ini.



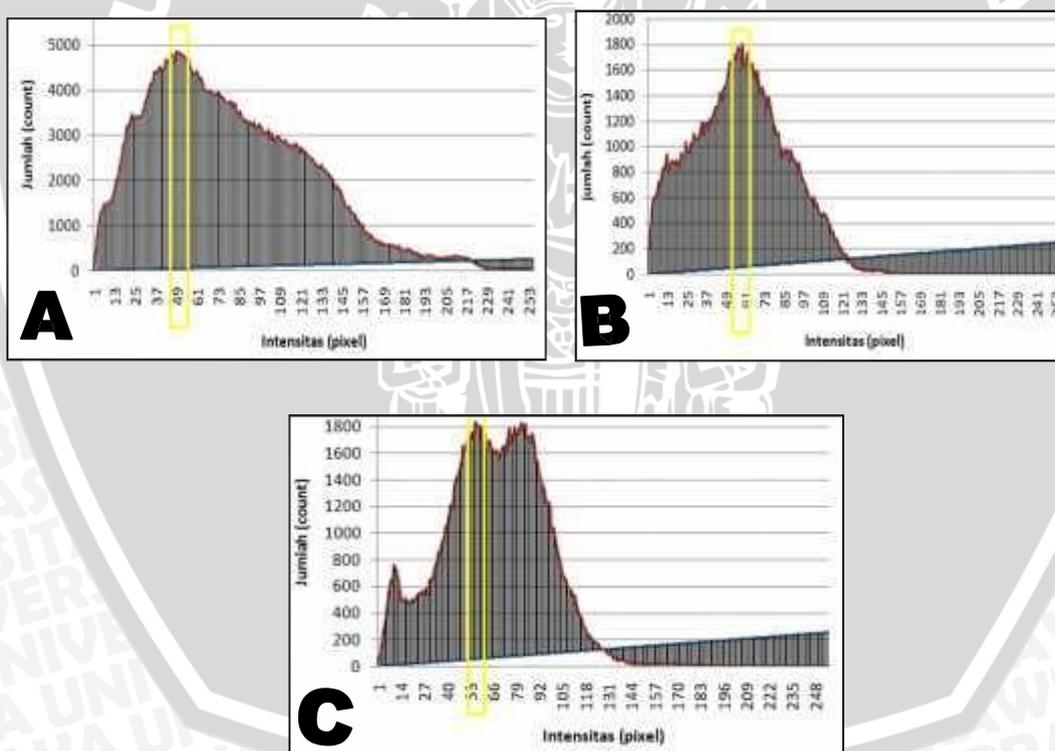
**Gambar 24.** Hasil Pengamatan Profil organ hati ikan perlakuan FPP dan VNN (a) ulangan 1, (b) ulangan 2 dan (c) ulangan 3.

Pada gambar di atas, didapatkan hasil rata-rata DAB sebesar 63,13 %.

Nilai ini didapat dari prosentase gambar 24a sebesar 60,4 %, presentase gambar

24b sebesar 65,3% dan prosentase gambar 24c sebesar 63,7%. Nilai analisa IR menunjukkan nilai rata-rata DAB sebesar 63,13 % menunjukkan pada organ hati yang diinduksi FPP dan diinfeksi VNN prosentase ekspresi  $\alpha$ -aktin sebesar 74,63%, yang berarti bahwa ekspresi  $\alpha$ -aktin pada organ hati perlakuan induksi FPP dan pemberian infeksi VNN sebesar 63,13%. Pada perlakuan ini Jumlah DAB merupakan jumlah yang paling besar jika dibandingkan dengan nilai DAB pada perlakuan yang lainnya. Terdapat beberapa kerusakan yang terlihat, seperti terdapat beberapa kerusakan vakuolis (panah kuning) dan necrosis (panah merah).

Grafik histogram organ hati ikan perlakuan FPP dan VNN dapat dilihat pada gambar 25 di bawah ini.



**Gambar 25.** Grafik organ hati ikan perlakuan pemberian FPP + VNN dengan menggunakan software *imageJ* (a) ulangan 1, (b) ulangan 2 dan (c) ulangan 3.

Pada gambar organ hati ikan dengan pemberian FPP dan VNN 1 (Gambar 25a) menunjukkan bahwa keberadaan gen target  $\alpha$ -aktin dalam kategori positif

kuat karena terdapat pada kisaran 45-60, sedangkan pada organ ikan dengan perlakuan induksi FPP dan VNN 2 (Gambar 25b) menunjukkan gen target  $\alpha$ -aktin berada pada kisaran 50-60 yang berarti organ ikan perlakuan FPP dan VNN 2 berada pada kategori positif kuat. Organ ikan dengan pemberian FPP dan VNN 3 (Gambar 25c) menunjukkan keberadaan gen target  $\alpha$ -aktin juga berada dalam kategori positif kuat dikarenakan gen target berada pada kisaran 50-60.

Dari hasil di atas menyatakan bahwa FPP dari mikroalga *C. vulgaris* yang diinduksikan pada ikan kerapu tikus dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh pada ikan yang ditunjukkan dengan kenaikan nilai prosentase DAB  $\alpha$ -aktin. Ini membuktikan bahwa FPP mampu memberikan dampak yang cukup signifikan. FPP yang berupa PCP mampu menjadi biokatalisator dalam pembentukan ekspresi  $\alpha$ -aktin.

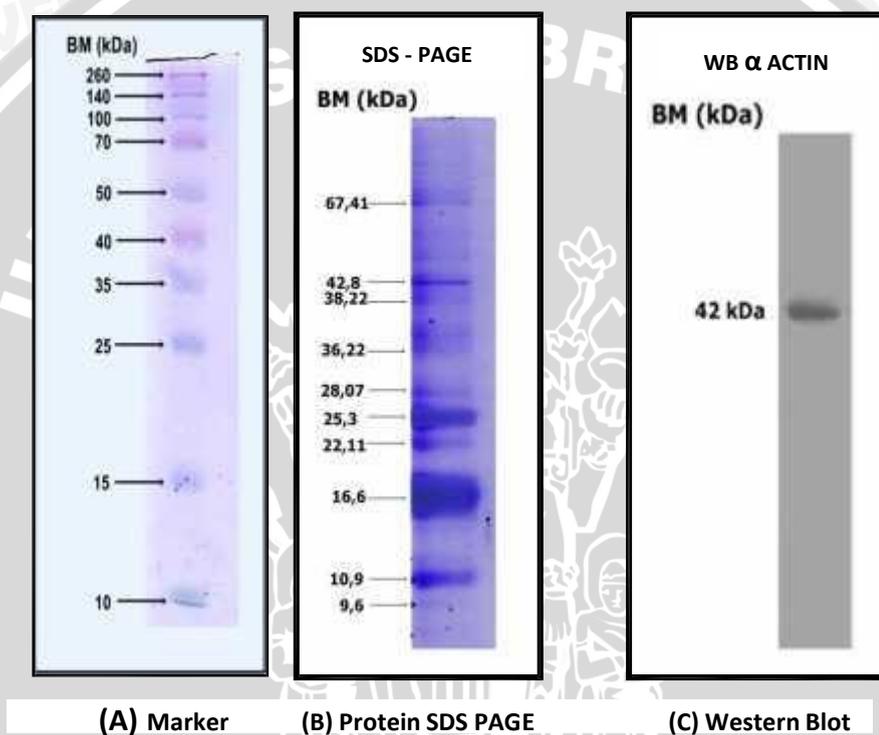
Peningkatan  $\alpha$ -aktin akan berdampak pula terhadap respon fisiologis seluler seperti fungsi reseptor, penyerapan sinyal, dan transport vesikel antibodi.  $\alpha$ -aktin juga memiliki fungsi penting dalam ekspresi gen untuk menghasilkan gen-gen antivirus,  $\alpha$ -aktin tersebut membantu pengaturan mesin transkripsi dalam pencetakan gen atau protein sebagai respon imun dalam menghadapi virus.

#### **4.6 Profil Aktin Pada Organ Hati Ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*)**

Ikan kerapu tikus yang telah diberi perlakuan penambahan FPP selanjutnya akan dilakukan pengamatan profil proteinnya menggunakan SDS-PAGE. Organ target yang digunakan pada penelitian ini adalah organ hati. Organ hati dipilih karena merupakan salah satu organ internal ikan yang memiliki fungsi sebagai organ ekskresi.

Analisa protein pada organ hati ikan kerapu tikus dimulai dari pengambilan sampel organ hati yang kemudian dipotong halus lalu dihaluskan menggunakan mortar dan alu dengan penambahan tris HCl kurang dari 5 ml.

Hasil gerusan organ hati tersebut kemudian dibuat gel running yang telah diberi perlakuan pewarnaan (*staining*) dengan *Cromassive Brilliant Blue* (CBB) yang berfungsi untuk memberi warna pita protein sehingga dapat diamati. Selanjutnya dilakukan proses pencucian (*destaining*), tujuannya adalah untuk memudahkan pewarna yang digunakan pada gel sehingga dapat dibaca dengan jelas. Hasil SDS-PAGE kemudian diamati menggunakan GelDock. Hasil elektroforesis SDS-PAGE organ hati ikan kerapu tikus dapat dilihat pada gambar 26 di bawah ini.



**Gambar 26.** (A) Marker (PRO-STAIN™), (B) Hasil Elektroforesis Pita *Crude* Protein Organ Hati dengan SDS-PAGE (C) hasil Western Blot gen target  $\alpha$  ACTIN (Sumber : Laporan Penelitian Unggulan PT-BOPTN, 2015)

Hasil dari elektroforesis di atas diperoleh 10 pita protein marker yaitu 87,41 kDa, 42,8 kDa, 38,22 kDa, 36,22 kDa, 28,07 kDa, 25,3 kDa, 22,11 kDa, 16,6 kDa, 10,9 kDa, 9,6 kDa. Pengamatan terhadap hasil ekspresi molekul  $\alpha$ -aktin pada gambar di atas, pada organ hati ikan kerapu di atas menunjukkan adanya ekspresi  $\alpha$ -aktin. Hal ini ditunjukkan dengan adanya pita protein dengan

berat molekul 42,08 kDa. Hal ini dibuktikan pada penelitian yang dilakukan oleh cherng *et al.*, 2008 yang menyatakan bahwa berat molekul  $\alpha$ -aktin adalah 48. Sub unit individu aktin dikenal sebagai globular aktin, sedangkan polimer filamer dari G-aktin disebut dengan F-aktin. Mikrofilamen adalah komponen tertipis dari sitokeleton dengan diameter berukuran 7nm (DiNubile, 1999). Filamen aktin dirakit dalam dua jenis, struktur lingkaran dan jaringan. Aktin mengikat protein kemudian mendikte pembentukan struktur sel setelah menyebrangi filamen-filamen. Pada struktur lingkaran yang saling berhubungan satu sama lain, sehingga berada pada posisi yang sejajar. Proses ini aktin berperan dalam pembentukan sel (sitokinesis) dan gerakan sel (Cooke *et al.*, 1994). Hasil SDS PAGE organ hati menunjukkan bahwa VNN dan FPP dapat meningkatkan aktin yg disini menunjukkan pita protein organ hati dan pada 42,8 Kda menunjukkan berat molekul dari  $\alpha$ -aktin.

Analisa lebih lanjut dilakukan untuk memastikan bahwa  $\alpha$ -aktin terekspresi pada hati ikan uji, yaitu menggunakan metode Westernblot. Menurut Blancher dan Jones (2001), penggunaan metode westernblot adalah untuk mengidentifikasi dengan menggunakan antibodi spesifik. Dalam penelitian ini antibodi spesifik yaitu anti- $\alpha$ -aktin yang digunakan untuk mengkonfirmasi keberadaan gen atau protein target ( $\alpha$ -aktin) dalam sampel tersebut. Berdasarkan hasil pada gambar 26, dapat dinyatakan bahwa  $\alpha$ -aktin terekspresi pada setiap perlakuan. Hasil ini menunjukkan bahwa dalam kondisi normal ikan uji juga mengekspresikan  $\alpha$ -aktin.

#### 4.7 Analisis 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  $\alpha$ -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 perlakuan penelitian dapat dilihat pada Tabel 6 .

**Tabel 6.** Data Hasil Penelitian

Ulangan	Perlakuan				TOTAL
	Kontrol	FPP	VNN	FPP+VNN	
1	26,6	41,4	43,4	60,4	171,8
2	30	40,4	42,5	65,3	178,2
3	25,3	40,7	45,7	63,7	175,4
Total	81,9	122,5	131,6	189,4	525,4
Rata-rata	27,3	40,83	43,86	63,13	

Setelah didapatkan data hasil penelitian seperti yang ditampilkan pada tabel di atas, selanjutnya dilakukan analisa sidik ragam prosentase DAB  $\alpha$ -aktin pada setiap perlakuan. Tabel analisa sidik ragam dapat dilihat pada Tabel 7 di bawah ini. Sedangkan perhitungan analisa sidik ragam (ANOVA) dapat dilihat pada lampiran 2.

**Tabel 7.** Analisa Keragaman (ANOVA) DAB  $\alpha$ -aktin setiap perlakuan

SK	DB	JK	KT	FHIT	F tabel 5%
A	3	1964,5	654,83	173,23**	4.07
Galat	8	30,24	3,78		
Total	11	1994,74			

Ket :

A = perlakuan

\* = tidak berbeda nyata

\*\*= berbeda nyata

Berdasarkan analisa sidik ragam di atas, diperoleh hasil  $F_{hitung} > F_{tabel}$ . Ini menunjukkan bahwa hasil pemberian perlakuan yang berbeda yaitu pemberian FPP, pemberian VNN serta pemberian FPP dan VNN berpengaruh berbeda nyata dengan tingkat ekspresi  $\alpha$ -aktin. Hal ini menandakan adanya pengaruh pemberian perlakuan berbeda terhadap jumlah ekspresi gen  $\alpha$ -aktin yang ditunjukkan oleh besarnya prosentase DAB. Hal ini karena pemberian perlakuan yang berbeda sehingga jumlah ekspresi gen  $\alpha$ -aktin juga berbeda.

Uji BNT (beda nyata terkecil) perlu dilakukan untuk mengetahui bagaimana pengaruh dari pemberian perlakuan yang berbeda terhadap ekspresi  $\alpha$ -aktin. Hasil uji BNT pengaruh pemberian perlakuan yang berbeda terhadap ekspresi  $\alpha$ -aktin disajikan pada tabel 8, sedangkan untuk perhitungan BNT dapat dilihat pada lampiran 2.

**Tabel 8.** Hasil Uji BNT pengaruh pemberian perlakuan yang berbeda terhadap ekspresi  $\alpha$ -aktin

Prosentase B Aktin tiap perlakuan		K	F	V	FV	Notasi	BNT 5%
		27,3	40,63	43,86	63,13		
K	27,3	-	-	-	-	A	3,18
F	40,63	13,53*	-	-	-	B	
V	43,86	16,56*	3,23*	-	-	C	
FV	63,13	35,83*	22,3*	16,27*	-	D	

Ket : K = Kontrol  
 F = Perlakuan Pemberia FPP  
 V = Perlakuan Pemberia VNN  
 FV = Perlakuan Pemberia FPP+VNN  
 $T_n$  = Tidak Nyata  
 \* = Berbeda Nyata

Berdasarkan hasil uji BNT di atas, diperoleh bahwa perlakuan pemberian perlakuan yang berbeda yaitu pemberian FPP, pemberian VNN dan pemberian FPP+VNN berbeda nyata terhadap jumlah prosentase DAB ekspresi  $\alpha$ -aktin. Hal ini ditunjukkan oleh nilai selisih prosentase DAB > BNT 5%. Jika dilihat ada tabel



di atas, perlakuan pemberian FPP+VNN merupakan perlakuan yang paling baik diantara perlakuan yang lainnya, karena memiliki notasi d.

#### 4.8 Kualitas Perairan Pemeliharaan Ikan Kerapu Tikus

Kualitas air dalam budidaya ikan adalah setiap peubah yang mempengaruhi pengelolaan dan sintasan, perkembangbiakan, pertumbuhan, atau produksi ikan. Air yang baik adalah yang mampu menunjang kehidupan ikan dengan baik. Dalam penelitian ini, analisa kualitas perairan yang diukur adalah sebagai berikut :

##### 4.8.1 Suhu

Suhu merupakan salah satu parameter fisika yang mempengaruhi pertumbuhan organisme dan kualitas perairan dalam budidaya. Kordi (2011), menyebutkan bahwa suhu mempengaruhi aktivitas biota, secara umum laju pertumbuhan meningkat seiring dengan kenaikan suhu namun dapat menekan kehidupan biota bahkan menyebabkan kematian apabila fluktuasi suhu sampai ekstrim (drastis). Hasil pengukuran suhu pada aquarium ikan Kerapu Tikus dapat dilihat pada Tabel 9.

**Tabel 9.** Hasil pengukuran suhu ( $^{\circ}\text{C}$ ) pada kolam ikan Kerapu Tikus).

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

\*Keterangan: 1 = aquarium ikan control  
2= aquarium ikan FPP  
3= aquarium ikan VNN  
4= aquarium ikan FPP+VNN

Hasil pengukuran suhu yang diperoleh dari hasil penelitian pada aquarium ikan Kerapu Tikus pada tabel 9 berkisar 28°C sampai 31°C. Nilai suhu ini tidak terjadi perubahan yang signifikan per waktu penyondean pada setiap aquarium. Angka ini termasuk dalam kisaran suhu yang normal untuk lingkungan hidup ikan kerapu tikus. Kordi (2001), menyebutkan pertumbuhan ikan pada wilayah tropis akan berlangsung optimal pada kisaran suhu 28°C - 32°C. Kordi (2010), suhu yang digunakan dalam pemeliharaan ikan haruslah mempunyai nilai yang konstan. Perubahan suhu yang tinggi dalam perairan akan mempengaruhi proses metabolisme aktivitas tubuh dan syaraf kecil.

#### 4.8.2 Salinitas

Salinitas adalah konsentrasi dari total ion yang terdapat dalam perairan (Boyd, 1988 dalam Effendi, 2000). Salinitas menggambarkan kepadatan total didalam air setelah semua karbonat dikonversi menjadi oksida, semua promida dan iodida telah digantikan oleh klorida, dan semua bahan organik telah dioksidasi. Nilai salinitas perairan tambak akan mempengaruhi kondisi kesuburan perairan dan akan berpengaruh terhadap pertumbuhan ikan Kerapu Tikus. Hasil pengukuran salinitas pada aquarium Ikan kerapu Tikus dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 10.

**Tabel 10.** Hasil pengukuran rata-rata salinitas (%) pada kolam ikan Kerapu Tikus

Hari penyondean	Aquarium			
	1	2	3	4
0	30	30	30	29
6	30	29	30	30
9	30	29	30	30
14	29	30	30	29
19	30	30	29	29
24	30	30	29	30

\*Keterangan: 1 = aquarium ikan control  
2= aquarium ikan FPP  
3= aquarium ikan VNN  
4= aquarium ikan FPP+VNN

Pada tabel 10 terlihat bahwa nilai salinitas air aquarium pemeliharaan ikan kerapu tikus berkisar antara 29-30‰. Nilai salinitas ini termasuk normal untuk lingkungan hidup ikan kerapu tikus. Menurut Putra (2008), salinitas yang ideal untuk pembesaran ikan Kerapu tikus adalah 28-33 ppt.

#### 4.8.3 Derajat Keasaman

Derajat Keasaman (pH) air mempengaruhi tingkat kesuburan perairan karena dapat mempengaruhi kehidupan jasad renik. Nilai pH dapat digunakan sebagai indeks kualitas lingkungan atau tolak ukur untuk menunjukkan tinggi rendahnya konsumsi ion hydrogen dalam suatu perairan. Pengukuran pH dilakukan pada pagi dan sore hari dengan pengamatan rutin setiap hari selama perlakuan. Menurut Ghufran, *et al.* (2007), pada pH rendah kondisi oksigen terlarut akan mengalami penurunan begitu sebaliknya. Hasil pengukuran rata-rata pH pada aquarium Kerapu Tikus (*C. altivelis*) dapat dilihat pada Tabel 11.

**Tabel 11.** Hasil pengukuran rata-rata pH pada kolam ikan Kerapu Tikus

Hari penyondean	Aquarium			
	1	2	3	4
0	7,9	7,7	7,9	7,9
6	7,6	7,9	7,6	7,7
9	7,9	7,8	7,7	7,6
14	7,9	7,9	7,8	7,9
19	7,7	7,8	7,9	7,8
24	7,9	7,7	7,8	7,7

\*Keterangan: 1 = aquarium ikan control  
 2= aquarium ikan FPP  
 3= aquarium ikan VNN  
 4= aquarium ikan FPP+VNN

Hasil pengukuran pH pada aquarium ikan Kerapu Tikus berkisar antara 7,6-7,9. Menurut Effendi (2003), sebagian besar ikan menyukai pH yang berkisar antara 7-8,5. pH sangat mempengaruhi proses biokomiawi perairan, misalnya

proses nitrifikasi akan terhambat atau berakhir jika pH dalam perairan menurun nilainya. Nilai pH yang didapatkan dalam penelitian adalah optimal untuk pertumbuhan ikan.

#### 4.8.4 Oksigen Terlarut

Oksigen merupakan faktor penting bagi kehidupan makro dan mikro organisme perairan karena diperlukan untuk proses pernafasan. Sehingga apabila ketersediaannya dalam air tidak mencukupi, maka segala aktivitas biota akan terhambat. 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). Menurut Kordi *et al.* (2007), ketersediaan oksigen bagi biota air menentukan lingkaran aktivitasnya, konversi pakan, demikian laju pertumbuhan bergantung pada oksigen dengan ketentuan faktor kondisi lainnya adalah optimum. Hasil pengamatan oksigen terlarut pada aquarium ikan Kerapu Tikus dapat dilihat pada Tabel 12.

**Tabel 12.** Hasil pengukuran oksigen terlarut (mg/l) pada kolam ikan Kerapu Tikus

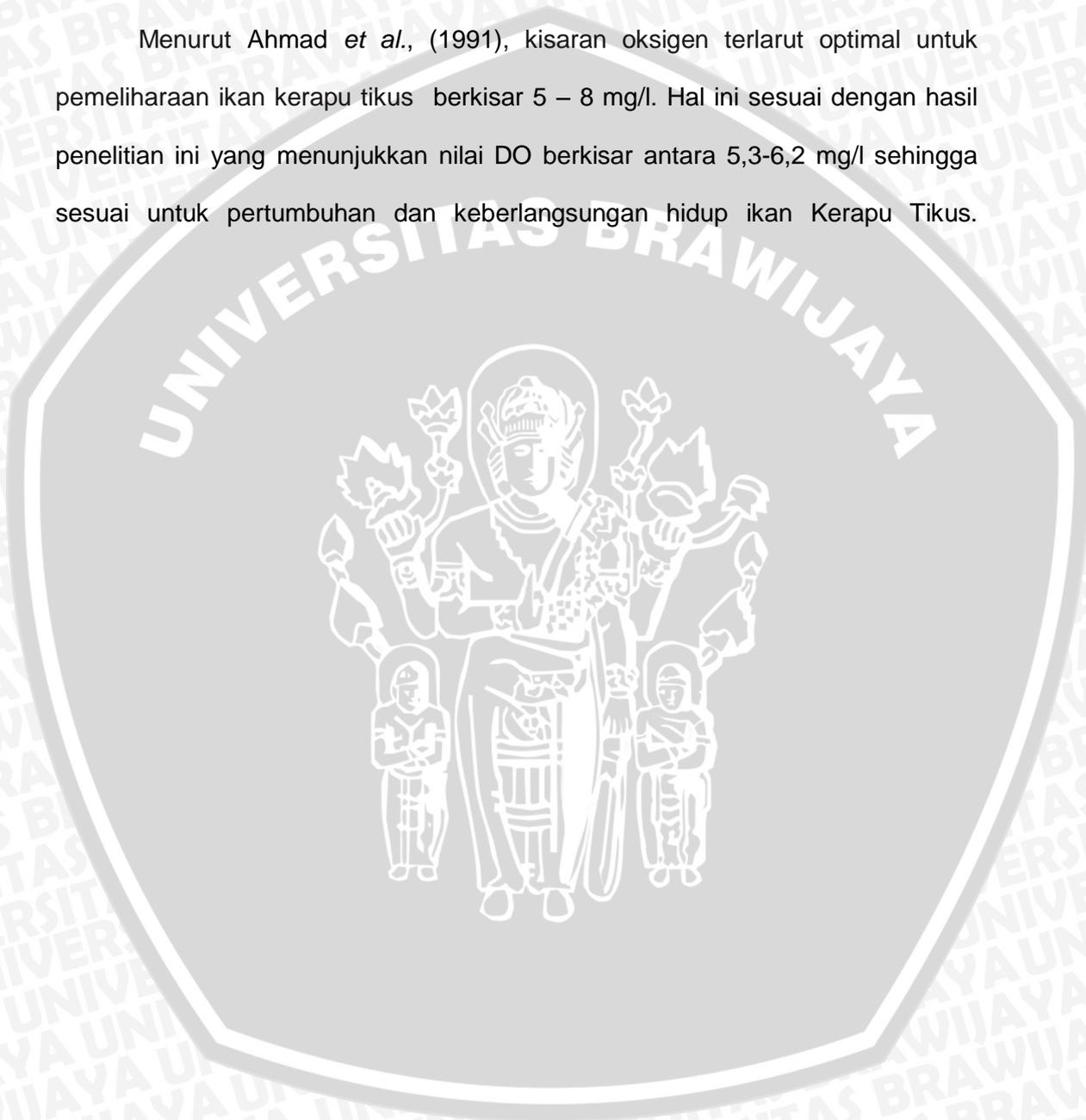
Hari penyondean	Aquarium			
	1	2	3	4
0	6,2	6,2	5,7	5,9
6	6,1	6	5,8	5,8
9	5,8	5,7	5,6	5,8
14	6	5,9	5,8	5,9
19	5,9	5,8	5,3	5,9
24	5,8	5,9	5,6	5,8

\*Keterangan: 1 = aquarium ikan control  
 2= aquarium ikan FPP  
 3= aquarium ikan VNN  
 4= aquarium ikan FPP+VNN

Pada Tabel 12 menunjukkan hasil pengukuran oksigen terlarut yang didapatkan berkisar antara 5,3-6,2 mg/l. Affan (2012), suhu berperan penting

bagi kehidupan dan perkembangan biota laut, peningkatan suhu dapat menurunkan kadar oksigen terlarut sehingga mempengaruhi metabolisme seperti laju pernafasan dan konsumsi oksigen serta meningkatnya konsentrasi karbon dioksida.

Menurut Ahmad *et al.*, (1991), kisaran oksigen terlarut optimal untuk pemeliharaan ikan kerapu tikus berkisar 5 – 8 mg/l. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian ini yang menunjukkan nilai DO berkisar antara 5,3-6,2 mg/l sehingga sesuai untuk pertumbuhan dan keberlangsungan hidup ikan Kerapu Tikus.



## 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa Pemberian Fragmen Pigmen Protein (FPP) mikroalga *C. vulgaris* mampu meningkatkan ekspresi  $\alpha$ -aktin. FPP yang ditemukan dalam *C. vulgaris* berupa PCP, yang memiliki *piridinin* dalam 2 bentuk yaitu bentuk monomer (bentuk panjang) dengan berat molekul 33 kDa dan bentuk homodimer (bentuk pendek) dengan berat molekul 15 kDa. Pada ikan kontrol DAB rata-rata ekspresi  $\alpha$ -aktin sebesar 27,3%, pada ikan dengan pemberian FPP nilai rata-rata DAB sebesar 40,83 ikan dengan penginfeksi VNN nilai DAB rata-ratanya sebesar 43,86%, dan ikan dengan penginduksian FPP dan penginfeksi VNN nilai DAB rata-ratanya sebesar 63,13%. *Peridinin chlorophyll protein* (PCP) yang terkandung dalam *C. vulgaris* mampu menjadi biokatalisator terekpresinya  $\alpha$ -aktin. Peningkatan ekspresi  $\alpha$ -aktin dalam penelitian ini menjadi indikator peningkatan respon imun pada ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*).

### 5.2 Saran

Perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mengeksplorasi pemanfaatan sumberdaya hayati laut dalam menanggulangi serangan penyakit dan virus yang menyerang ikan kerapu tikus.

## DAFTAR PUSTAKA

- Affan, J. M. 2012. Identifikasi lokasi untuk pengembangan budidaya keramba jaring apung (KJA) berdasarkan faktor lingkungan dankualitas air di perairan pantai timur Bangka Tengah. Depik, ISSN 2089-7790. 1(1):78-85.
- AgusJaya. 2011. Peningkatan respon Imun adaktif pada Asosiasi dengan Infeksi Laten *Wucheria bancrofti*. Program Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia.
- 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 ikankerapu dalam karamba jaring apung. Balai Penelitian Perikanan Budidaya Pantai, Maros, 59 hlm.
- Akbar, S. dan Sudaryanto. 2001. Pembenihan dan Pembesaran Kerapu Bebek. PenebarSwadaya. Jakarta.
- Amini S. dan Syamdini.2006. Konsentrasi Unsur hara Pada Media dan Pertumbuhan *Chlorella vulgaris* dengan Pupuk anorganik Teknik dan Analisis. Jurnal Perikanan VIII (2): 201-206.
- Amiruddin H. Ridhlo K.D. Robianta N. La D.2012. Manajemen Induk Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) Sebagai Upaya Optimalisasi Produksi Telur Berkualitas. Balai Budidaya Laut Ambon.
- Anggraini, P. 2002. Efek Keterbatasan Nitrogen dalam Medium Walne pada Budidaya Biomassa *Chlorella vulgaris buitenzorg* dalam Reaktor Pelat Datar. Departemen Teknik Kimia. Universitas Indonesia : Depok.
- Ariana, Y. M. D. 2003. *Pengaruh Aging Terhadap Sistem imun*. Fakultas Kedokteran gigi, Universitas Jember.
- Arrohmah. 2007. Studi Karakteristik Klorofil pada Daun sebagai Material Photodetector Organic. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sebelas Maret : Surakarta.
- Baratawidjaja, K. G. dan I. Rengganis. 2010. *Imunologi Dasar*. Edisi ke-10. Fakultas Kedokteran Universitas : Indonesia
- Baskoro, Mulyono S., Taurusman, Am Azbas dan Sudirman. 2010. *Tingkah Laku Ikan Hubungannya dengan Ilmu dan Teknologi Perikanan Tangkap*. Lubuk Agung. Bandung. 258 Hlm.
- Bintang, P.H. 2010. *Konsumsi Harian Cepepoda Terhadap Pakan Chlorella Sp. Pada Volume Media Kultivasi Yang Berbeda*. Ilmu Kelautan UNDIP. 13 (3): 121-126.

- Bulanin, U. 2003. *Perkembangan Larva Ikan Kerapu Bebek, Cromileptes altivelis, Sampai Umur 50 Hari*. Fakultas Perikanan Universitas Bung Hatta
- Bovo, G., Nishizawa, T., Maltese, C., Borghesan, F., Mutinelli, F., Montesi, F., De Mas, S. 1999. Viral encephalopathy and retinopathy of farmed marine fish species in Italy. *Virus Res.* 63:143–146.
- Cherng S, Jenny Y, Hongbao Ma.2008. Alpha-Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA). *The Journal of American Science.*:4(4):7-9]. (ISSN: 1545-1003).
- Cooke R, White H, Pate E. 1994. A model of the release of myosin heads from actin in rapidly contracting muscle fibers. *Biophys J* 66(3 Pt 1):778-788.
- Darmono dan Hasan A. M. 2002. Menyelesaikan Skripsi dalam Satu Semester. PT Grasindo. Jakarta.
- DiNubile MJ. 1999. Erythrocyte membrane fractions contain free barbed filament ends despite sufficient concentrations of retained capper(s) to prevent barbed end growth. *Cell Motil Cytoskeleton* 43(1):10-22.
- Dolan, M. R. 1992. Assessment of in vitro antitumoral and antimicrobial activities of marine algae harvested from the eastern Mediterraneansea. *African Journal of Biotechnology*, 9 (27): 4272-4277.
- Evalawati., M. Meiyana dan Aditya. 2001. *Biologi Kerapu, Pembesaran Kerapu bebek dan Kerapu Macan di Keramba Jaring Apung*. Ditjenkan. Jakarta.
- Fatchiyah. 2011. *Biologi Molekular*. Erlangga: Jakarta.
- Fatmah. 2006. Respon Imunitas yang Rendah Pada Tubuh Manusia usia lanjut. . Departemen Gizi Kesehatan masyarakat, fakultas kesehatan Masyarakat, universitas Indonesia, Depok. MAKARA, kesehatan Vol.10 No. 1.
- Fujaya, Y. 2008 *Fisiologilkan, Dasar Pengembangan Teknologi Perikanan*. RinekaCipta. Yogyakarta
- Ghufran, M; H. Kordi. K; A.B. Tancung. 2007. *Pengelolaan Kualitas Air Dalam Budidaya Perairan*. Rineka Cipta : Jakarta.
- Hadi, R. S. 2007. Beberapa Sifat Umum dari Klorofil Fitoplankton. *Oseana*, XXXII No.1 23-31.
- Harnadiemas R.F. 2012. Evaluasi Pertumbuhan dan Kandungan Esensial *Chlorella vulgaris* pada Kultivasi Fotobioreaktor Outdoor Skala Pilot Dengan Pencahayaan Terang Gelap Alami. Fakultas Teknik Universitas Indonesia. Dpok.
- Impra. 2009. Protein. Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya Malang.
- Isnansyto, A. Dan Kurniastuti. 1995. Teknik Kultuur Phytoplankton dan Zooplankton.Kansius. Jogjakarta. 198 hal.

- Ivanda, L. P. D., Agus, T., Sukandar. 2013. Tingkah Laku Pemijahan, Pembesaran Ikan Kerapu Tikus *Cromileptes altivelis* di Balai Budidaya Air Payau Situbondo. PSPK Student Journal. Universitas Brawijaya. Malang. Vol 1 No. 1 11-15
- 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
- Kawaroe, M, 2008, *Mikroalga Sebagai Bahan Baku Biofuel*. Surfactant dan Bioenergy Research Centre, Lembaga Pengabdian Pada Masyarakat, Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Kordi, M. 2001. Usaha Pembesaran Ikan Kerapu di Tambak. Kanisius. Yogyakarta.
- Kordi. K. M. Ghufran, H., dan A.B. Tancung. 2007. Pengelolaan Kualitas Air Dalam Budidaya Perairan. Rineka Cipta. Jakarta.
- Kordi M. 2010. *Pembenihan Ikan Laut Ekonomis Secara Buatan*. Penerbit Lily Publisher, Yogyakarta. 188 halaman.
- Lavens, P. Dan P. Sorgeloos. 1996. Manual on the Production and use live food for aqua culture. FAO Fisheries Technical Paper 361.
- Magnadottir B., 2006. Immunological control of fish diseases. Journal of Marine Biotechnology 12, 361–379.
- Marzuki. 1983. Metodologi Riset. Fakultas Ekonomi. UII Yogyakarta.
- Mishima, H. & Gonzales, B. 1994. *Some biological and ecological aspects on C. altivelis around Palawan Island, Philippines*. Suizanzoshoku, 42(2): 345-349.
- Munasir, Z. 2011. *Respon Imun Terhadap Infeksi Bakteri*. Sari Pediatri, Vol.2, No.4 193-197.
- Najmuddin, F. Z. 2011. Peningkatan Produksi Biomassa *Chlorella vulgaris* dengan perlakuan mikrofiltrasi pada Sirkulasi Aliran Medium Kultur Sebagai Bahan Baku Biodiesel. Fakultas Teknik Kimia Universitas Indonesia. Depok.
- Nurbaiti. 2000. Perkembangan Embrio dan Larva Ikan Kerapu Bebek *Cromileptes altivelis*. Skripsi, Fakultas Perikanan. Universitas Bung Hatta Padang
- Ogata, A., Dominguez, A., Lamela, T., Garcia, D. & Fabregas, J. 2009. Steady states of semicontinuous cultures of a marine diatom: effect of saturating nutrient concentrations. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 227, 23–34.

- Peckham, M., Miller, G., Wells C., Zicha, D., Dunn, G. A. 2000. Specific changes to the mechanism of cell locomotion induced by overexpression of alpha-actin. *J Cell Sci* 114:1367–1377.
- Pollard, T. D., Borisy, G. G. 2003. *Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments*. *Cell* 112:453–465.
- Prabowo, D. A. 2009. Optimasi Pengembangan Media untuk Pertumbuhan *Chlorella* sp. Pada Skala Laboratorium. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Pratama, I. 2011. Pengaruh Metode Pemanenan Mikroalga terhadap Biomassa dan Kandungan Esensial *Chlorella vulgaris*. Fakultas Teknik Kimia. Universitas Indonesia. Depok.
- Prescott, G. W. 1970. *How to Know Freshwater Algae*. Dubuque. Iowa. W.M.C Brown Company Publisher.
- Putra, A. 2010. Transparansi Teknik Pendugaan Produktifitas Perairan. Fakultas Biologi. Universitas Jenderal Soedirman. Purwokerto.
- Putu, N.M.N., Merry, D.C.R., Syafriadi, M. 2014. *Respon Limfosit T sitotoksik Pada Gingivitis setelah Pemberian Kurkumin*. Universitas Jember: Jember.
- Qian, Haifeng, Jingjing Li, Liwei Sun, Wei Chen, G. Daniel Sheng, Weiping Liu, Zhengwei Fu. 2009. Combined effect of copper and cadmium on *Chlorella vulgaris* Growth and Photosynthesis-related gene transcription. *Aquatic Toxicology* 94 (2009) 56-61.
- Radji, M. 2009. *Vaksin DNA: Vaksin Generasi Keempat*. Departemen Farmasi FMIPA-UI-Depok, 16424. Majalah ilmu kefarmasian Vol. VI No. 1- ISSN 1693-9883.
- Riyono, S. H. 2007. Beberapa Sifat Umum Dari Klorofil Fitoplankton. *XXXII*(1), 23–31.
- Rombout J. H, Huttenhuis H. B. T, Picchiatti S, Scapigliati S. 2005. *Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes*. *Fish and Shellfish Immunology* 19, 441–455.
- Roza, D., F. Johnny, S. Kawahara, dan A. Hanafi. 2002. Penyakit pada budidaya ikan kerapu dan upaya penanggulangan. Kumpulan Makalah Seminar Pengembangan Teknologi Budidaya Kerapu. Balai Budidaya Laut Lampung - JICA: 75-86.
- Roza, D., F. Johnny, and K. Mahardika. 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. 12 p.
- Safi, C. Zeib B. Merah O. Pontalier P. 2014. *Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris : A review*. *Journal Elsavier* 265-278.

- Sargowo, D., Ratnawaty, R. 2002. Pengaruh Zat Aktif Ganggang Hijau terhadap Produk Radikal Bebas dan Fraksi Lipid Penderita Dislipidemia Usia Lanjut. *Medika*, 28(11) : 693-701.
- Sari, E. Dan Manan, T. R. 2012. Pengaruh Lama Penyinaran Terhadap Pertumbuhan Populasi Spirulina (*Spirulina platensis*) di Laboratorium. Skripsi. Fakultas Pertanian Jurusan Perikanan Universitas Padjadjaran.
- Setianto, A. 2011. Usaha Budidaya Ikan Kerapu. Pustaka Baru Press. Yogyakarta. 162 hml.
- Slamet, B. Tridjoko, A. Prijono, T. Sehadharma dan K. Sugama. 1996. Penyerapan Nutrisi Endogen, Tabiat Makan dan Perkembangan Morphologi Larva Ikan Kerapu Bebek (*Cromileptes altivelis*). *J. Pen. Perikanan Indonesia*. (2) 2 : 13-21.
- Subyakto, Slamet dan Cahyaningsih, S. 2003. Pembenihan Kerapu Skala Rumah Tangga. Agromedia pustaka. Jakarta. 61 hml.
- Sukarni, Maftuch, dan Nursyam H. 2012. *Kajian Penggunaan Ciprofloxacin terhadap Histologi Insang dan Hati Ikan Botia (Botia macracanthus, Bleeker) yang Diinfeksi Bakteri Aeromonas hydrophila*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya. Malang.
- Surakhmad, W. 1998. Pengantar Penelitian Ilmiah (Dasar, Metode dan Teknik). Tarsito. Bandung.
- Surawiria, U. 2005. *Chlorella* untuk Kesehatan dan Kebugaran. Jakarta, Papas Sinar Sinanti.
- Tridjoko dan Gunawan. 2010. Pengamatan Diameter Sel Telur Calon Induk Ikan Kerapu Bebek (*Cromileptes altivelis*) Turunan Ke Dua (F-2) dalam Menunjang Teknologi Pembenihan Ikan Kerapu. Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut. Singaraja, Bali.
- 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
- Wang, P., Deng, Z., Hu, Z., Fan, L. 2008. Lipid Accumulation and Growth of *Chlorella ziofongiensis* in flat plate photobioreactors outdoor. *Bioresource technology*. 102 : 10577-10584
- Weis, V. M., Verde, E.A., Reynold, W.S. 2002. *Characterization of a Short Form Peridinin-Chlorophyll-Protein (PCP) cDNA and Protein From the Symbiotic Dinoflagellate Symbiodinium muscatinei (Dinophyceae) From the Sea Anemone Anthopleura elegantissima (Cnidaria)*. *J. Phycol.* 38, 157 – 163.
- Widi, R. K. 2010. Asas Metodologi Penelitian. Graha Ilmu. Yogyakarta.

Wijoseno, T. 2011. *Uji Pengaruh Variasi Media Kultur Terhadap Tingkat Pertumbuhan dan Kandungan Protein, Lipid, Klorofil, dan Karotenoid pada Mikroalga Chlorella vulgaris buitenzorg*. Fakultas Teknik Universitas Indonesia. Depok.

Wirosaputro, S. 2002. *Chlorella untuk Kesehatan Global*. Gajah Mada University Press.

Yamamoto, M., Fujishita, M., Hirata, A., Kawano, S. 2004. Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *J Plant Res*;117:257–64.

Yanuhar, U. 2009. *Pengaruh Pemberian Bahan Aktif Ekstrak Nannochloropsis Oculata Terhadap Kadar Radikal Bebas Pada Ikan Kerapu Tikus (Cromileptes Altivelis) Yang Terinfeksi Bakteri Vibrio Alginolyticus*.

\_\_\_\_\_. 2011. *The Function of Receptor Protein Humpback Grouper Cromileptes altivelis in Expression and Proliferation of CD4 and CD8 cells in Defence Immunity of Viral Nervous Necrotic Infection*. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 1(2),

\_\_\_\_\_. 2013. Laporan Penelitian Unggulan PT-BOPTN. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan, Melalui DIPA Universitas Brawijaya Nomor: DIPA-023.04.2.424989/2013, Tanggal 5 Desember 2012 dan Berdasarkan SK Rektor Universitas Brawijaya Nomor: 295/SK/2013 Tanggal 12 Juni 2013.

\_\_\_\_\_. 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: 437-443.

Yokoyama, S., Koshio, S., Takakura N., Oshida, K., Ishikawa, M., Gallardo-Cigarroa, F. J., Catacutan, M. R., Teshima, S.-i. 2006. Effect of dietary bovine lactoferrin on growth response, tolerance to air exposure and low salinity stress conditions in orange spotted grouper *Epinephelus coioides*. *Aquaculture*, 255 (1-4), pp. 507-513.

Yuwanita, R. & Yanuhar, U., 2013. Pathognomonic of Viral Nervous Necrotic (VNN) Virulence on Larvae of Humpback. , 7(6), pp.1074–1081.

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

Perlakuan	Hari Ke- (gr)							Pertumbuhan Total	Rata-rata Per-hari
	0	4	8	12	16	20	24		
Ikan Kontrol	46,0	48,6	50,2	52	56,7	66,8	69,2	23,2	0,97
Ikan + FPP	46,0	48,9	50	51,8	52,5	54,6	58	12,0	0,50
Ikan + VNN	46,0	48,2	49	49,7	-	-	-	-	-
Ikan + FPP + VNN	46,0	47,3	48,4	49	51,8	52,7	54,8	8,8	0,37

**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

$$\begin{aligned}
 V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\
 10 \text{ ml} \times 67 \mu\text{g/ml} &= V_2 \times 33,3 \mu\text{g/ml} \\
 670 &= V_2 \times 33,3 \mu\text{g/ml} \\
 670 / 33,3 &= V_2 \\
 20,12 &= V_2
 \end{aligned}$$

Untuk mendapatkan konsentrasi 33,3 µg/ml, dilakukan dengan penambahan Tris HCL 0,5 N dengan pH 8,6 sebanyak 20,12 ml.

- Dosis yang diberikan pada setiap penyondean :

**Penyondean ke-1**

$$\begin{aligned}
 1000 \mu\text{l} / 150 \text{ gr} &= V_2 / 46 \\
 6,666666667 &= V_2 / 46 \\
 6,66 \times 46 &= V_2 \\
 306 &= V_2
 \end{aligned}$$



**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  $0,320 \text{ mg/ml} = 320 \text{ } \mu\text{g/ml}$
- Tiap 1 gram daging ikan mengandung protein VNN =  $320 / 2 (1 \text{ ml}/500 \text{ } \mu\text{l}) = 160 \text{ } \mu\text{g/ml}$
- Dosis uji klinis pada ikan adalah  $0,51 \text{ mg/ml}$  ( $510 \text{ } \mu\text{g/ml}$  tiap 150 g ikan) (Yanuhar, 2012)
- Dosis pemberian pakan uji dengan VNN adalah sebagai berikut:

**Hari ke-12** Berat badan ikan 49 g.

$$= 510 / (150 / 49)$$
$$= 166,6$$
$$= 166,6 / \text{konsentrasi protein dalam 1 g (160 } \mu\text{g/ml)}$$
$$= 1,04 \text{ g.}$$

Jadi, pada hari ke-12 pemberian pakannya sebanyak **1,04 g**.

**Hari ke-16** Berat badan ikan 51,8 g.

$$= 510 / (150 / 51,8)$$
$$= 176,12$$
$$= 176 / 160 \text{ } \mu\text{g/ml}$$
$$= 1,1 \text{ g.}$$

Pada hari ke-16 pemberian pakannya sebanyak **1,10 g**

**Hari ke-20** Berat badan ikan 51,8 g.

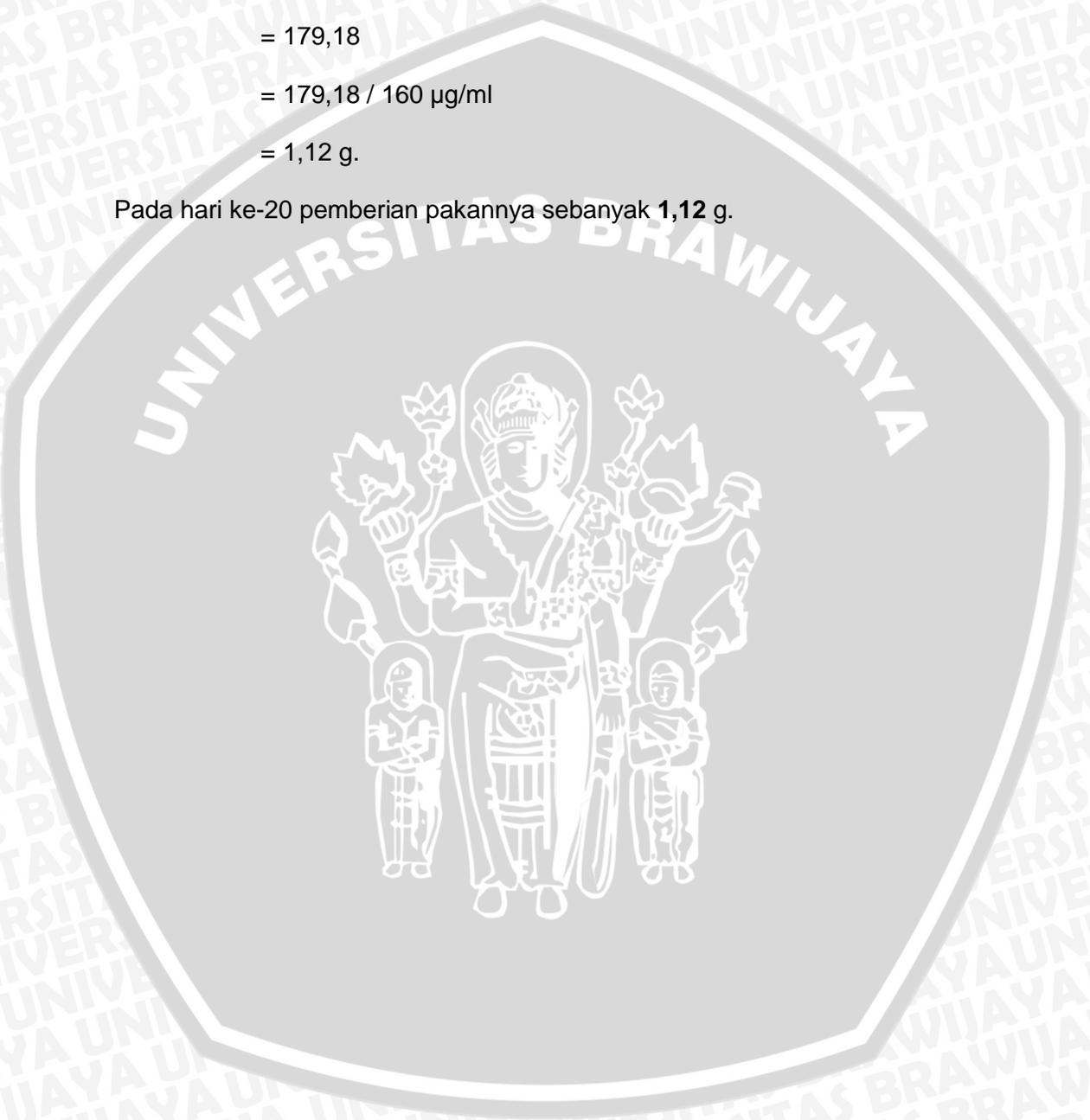
$$= 510 / (150 / 52,7)$$

$$= 179,18$$

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

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

Pada hari ke-20 pemberian pakannya sebanyak **1,12 g.**



Lampiran 4. Dokumentasi selama proses penelitian

GAMBAR	KETERANGAN
	Proses Pemanenan <i>C. vulgaris</i>
	Proses Penyaringan <i>C. vulgaris</i>
	Proses sentrifuge untuk menghilangkan kadar air <i>C. vulgaris</i>
	Proses Penimbangan bubuk <i>C. vulgaris</i>





Proses penggerusan *C. vulgaris* dan pemberian nitrogen cair



Proses sentrifuge untuk memisahkan pellet dan supernatan



Proses spektrofotometri

Penginduksia FPP dengan metode sonde

**Lampiran 5. Analisa Data**

Tabel analisa sidik ragam

Ulangan	Perlakuan				TOTAL
	Kontrol	FPP	VNN	FPP+VNN	
1	26,6	41,4	43,4	60,4	171,8
2	30	40,4	42,5	65,3	178,2
3	25,3	40,7	45,7	63,7	175,4
Total	81,9	122,5	131,6	189,4	525,4
Rata-rata	27,3	40,83	43,86	63,13	

$$a = 4$$

$$n = 3$$

$$an = 12$$

$$\text{kuadrat} = 2$$

$$*db$$

$$dbt = \sum n - 1$$

$$= 12 - 1$$

$$= 11$$

$$dbp = t - 1$$

$$= 4 - 1$$

$$= 3$$

$$dbg = t(r - 1)$$

$$= 4(3 - 1)$$

$$= 8$$

$$FK = Y_{ij}^2 / r.t$$

$$= (525,4)^2 / 3.4$$

$$= 276045,16 / 12$$

$$= 23003,76$$

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

$$= 24998,5 - 23003,76$$

$$= 1994,737$$

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

$$= (74904,78 / 3) - 23003,76$$

$$= 24968,26 - 23003,76$$

$$= 1964,497$$

$$d) JKG = JKT - JKP$$

$$= 1994,737 - 1964,497$$

$$= 30,24$$

$$e) KT (\text{Kuadrat Tengah})$$

$$KTP = JKP / dbp = 1964,497 / 3$$

$$= 654,83$$

$$KTG = JKG / dbg = 30,24 / 8$$

$$= 3,78$$

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

$$= 654,83 / 3,78$$

$$= 173,236$$

Tabel anova

SK	DB	JK	KT	FHIT	F tabel 5%
A	3	1964,497	654,83	173,236	2,43
Galat	8	30,24	3,78		
Total	11	1994,737			

Perhitungan Nilai BNT Perlakuan :

$$\begin{aligned}
 SED &= \frac{\sqrt{2 \text{ KTG}}}{n(\text{perlakuan})} \\
 &= \frac{\sqrt{2 \times 3,78}}{4} \\
 &= 1,055
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{BNT } 5\% &= T \text{ Tabel } 5\% \cdot SED \\
 &= 2,31 \cdot 1,055 \\
 &= 2,43
 \end{aligned}$$

Tabel BNT

Rata-rata β-aktin	27.30	40.83	43.87	63.13	notasi	BNT 5%
27.30					a	2.43
40.83	13.53				b	
43.87	16.57	3.03			c	
63.13	35.83	22.30	19.27		d	

