

**EKSPRESI NFKB (*Nuclear Factor Kappa Beta*) MATA IKAN KERAPU  
CANTANG (*Epinephelus fuscoguttatus x Epinephelus lanceolatus*) YANG  
DIINFEKSI VNN (*Viral Nervous Necrosis*) DENGAN PEMBERIAN EKSTRAK  
*Dunaliella salina***

**SKRIPSI**

Oleh:

**FAIZAL CAMPANTRE HARTAMA  
NIM. 155080500111021**



**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019**

**EKSPRESI NFKB (*Nuclear Factor Kappa Beta*) MATA IKAN KERAPU  
CANTANG (*Epinephelus fuscoguttatus x Epinephelus lanceolatus*) YANG  
DIINFEKSI VNN (*Viral Nervous Necrosis*) DENGAN PEMBERIAN EKSTRAK  
*Dunaliella salina***

**SKRIPSI**

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

Oleh:

**FAIZAL CAMPANTRE HARTAMA  
NIM. 155080500111021**



**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019**

SKRIPSI

**EKSPRESI NFKB (*Nuclear Factor Kappa Beta*) MATA IKAN KERAPU  
CANTANG (*Epinephelus fuscoguttatus x Epinephelus lanceolatus*) YANG  
DIINFEKSI VNN (*Viral Nervous Necrosis*) DENGAN PEMBERIAN EKSTRAK  
*Dunaliella salina***

Oleh:  
**FAIZAL CAMPANTRE HARTAMA**  
NIM. 155080500111021

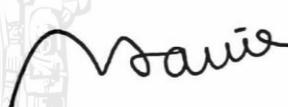
Telah dipertahankan didepan penguji  
Pada tanggal 17 Juni 2019  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,  
Dosen Pembimbing 1

Menyetujui,  
Dosen Pembimbing 2



(Dr. Ating Yuniarti, S.Pi, M.Aqua.)  
NIP. 197506041999032 002  
Tanggal : 04 JUL 2019



(Rani Yuwanita, S.Pi, MP.)  
NIK. 201506 860612 2 001  
Tanggal : 04 JUL 2019

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Manajemen  
Sumberdaya Perairan



(Dr. Ir. M. Firdaus, MP.)  
NIP. 19680919 200501 1 001  
Tanggal : 04 JUL 2019

**IDENTITAS TIM PENGUJI**

Judul : **EKSPRESI NFKB (*Nuclear Factor Kappa Beta*) MATA IKAN KERAPU CANTANG (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus lanceolatus*) YANG DIINFEKSI VNN (*Viral Nervous Necrosis*) DENGAN PEMBERIAN EKSTRAK *Dunaliella salina***

Nama Mahasiswa : Faizal Campantre Hartama

NIM : 155080500111021

Program Studi : Budidaya Perairan

**PENGUJI PEMBIMBING**

Pembimbing 1 : Dr. Ating Yuniarti, S.Pi, M.Aqua

Pembimbing 2 : Rani Yuwanita, S.Pi, MP

**PENGUJI BUKAN PEMBIMBING**

Penguji 1 : Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS

Penguji 2 : Yuni Widyawati, S.Pi, MP

Tanggal Ujian : 17 Juni 2019

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyadari bahwa penulisan ini tidak terlepas dari dukungan moril dan materi dari semua pihak. Melalui kesempatan ini, dengan kerendahan hati perkenankan saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

- Dr. Ating Yuniarti, S.Pi., M. Aqua selaku dosen pembimbing I yang telah banyak memberikan saran, arahan, bimbingan dan ilmu yang bermanfaat hingga dapat menyelesaikan laporan skripsi ini.
- Rani Yuwanita, S. Pi, MP. selaku dosen pembimbing 2 yang telah banyak memberikan saran, arahan, bimbingan dan ilmu yang bermanfaat hingga dapat menyelesaikan laporan skripsi ini.
- Bapak Lilik Hariyanto dan ibu Sutami selaku kedua orang tua yang selalu memberikan doa, motivasi dan dukungan kepada saya.
- Ariful, Viola, Fauzan, Anggi dan Alma selaku teman satu tim skripsi saya yang senantiasa bekerjasama dalam menyelesaikan penelitian.
- Teman-teman Aqualatte yang telah meberikan dukungan dalam pengerjaan laporan skripsi.

Malang, Juni 2019

Penulis

## RINGKASAN

**FAIZAL CAMPANTRE HARTAMA.** Skripsi Tentang Ekspresi NFKB (*Nuclear Factor Kappa Beta*) Mata Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus x Epinephelus lanceolatus*) yang Diinfeksi VNN (*Viral Nervous Necrosis*) dengan Pemberian Ekstrak *Dunaliella salina* (dibawah bimbingan **Dr. Ating Yuniarti, S.Pi., M. Aqua dan Rani Yuwanita, S. Pi., MP**).

---

Salah satu penyakit yang telah dilaporkan oleh para peneliti adalah *Viral Nervous Necrosis* (VNN) yang dapat menyebabkan kematian massal pada ikan kerapu, terutama pada stadia larva dan juvenil. Salah satu pencegahan yang dapat dilakukan untuk mengurangi dampak dari virus VNN yaitu menggunakan pakan alami. Pakan alami yang dapat digunakan yaitu *Dunaliella salina*, pemilihan mikroalga ini dikarenakan *D. salina* mempunyai kandungan  $\beta$ -karoten, fenol, *naphthaline* dan tetradeksana yang berperan sebagai anti inflamasi, antivirus dan antimikroba. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui ekspresi NFKB (*Nuclear Factor Kappa Beta*) mata ikan kerapu cantang yang telah diinfeksi virus VNN dengan pemberian ekstrak *D. salina*.

Metode penelitian yang digunakan yaitu metode deskriptif kuantitatif. Metode ini akan membandingkan persentase ekspresi NFKB yang teraktifasi dan tidak teraktifasi. Perlakuan yang diberikan yaitu pemberian ekstrak *D. salina* ke dalam pelet dengan dosis 250 mg, 300 mg, 350 mg dan 400 mg/kg pakan dan perlakuan dosis 0 mg/kg pakan tanpa pemberian ekstrak *D. salina*. Pemberian perlakuan *D. salina* ini selama 10 hari dan di lanjutkan dengan ujiantang virus VNN (dosis 0,2 ml/ekor).

Hasil yang didapatkan dari penelitian ini yaitu gejala patologi klinik yang terjadi pada 12-48 jam belum ada tanda-tanda yang menunjukkan ikan terinfeksi VNN. Pada 60-84 jam, ikan mulai menunjukkan tanda-tanda infeksi dari virus VNN yaitu nafsu makan yang menurun, ikan cenderung berenang pasif di dasar perairan dan warna tubuh mulai menghitam. Hasil lesi anatomi ikan kerapu pada 96 jam didapatkan yaitu sirip pektoral memerah, limpa membengkak dan hati memucat. *Survival Rate* (SR) yang didapatkan setelah ujiantang selama 108 jam yaitu dosis 0, 250, 300, 350 dan 400 mg/kg pakan didapatkan persentase secara berurutan 30%, 40%, 40%, 50% dan 60%. Hasil dari uji PCR yang didapatkan pasca ujiantang yaitu ikan kerapu cantang dinyatakan positif terinfeksi VNN. Uji SDS-PAGE dilakukan untuk mengkonfirmasi ikan terinfeksi virus VNN. Ekspresi NFKB yang aktif akan berwarna coklat sedangkan yang tidak aktif akan berwarna ungu. Persentase ekspresi NFKB yang muncul dengan penggunaan aplikasi *Immunoratio* didapatkan ekspresi tertinggi pada dosis 0 mg/kg pakan yaitu 63,5% dan ekspresi terendah pada dosis 400 mg/kg pakan yaitu 50,4%. Terlihat terjadi penurunan persentase ekspresi NFKB, dengan pemberian dosis *D. salina* 400 mg/kg merupakan perlakuan yang terbaik. Hal ini dapat disimpulkan bahwa penggunaan *D. salina* dapat menghambat infeksi VNN pada ikan kerapu cantang.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis ucapkan kehadirat Allah SWT, atas kelimpahan rahmat dan hidayah-Nya, penulis dapat menyajikan laporan skripsi ini yang berjudul “Ekspresi NFKB (*Nuclear Factor Kappa Beta*) Mata Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus x Epinephelus lanceolatus*) yang Diinfeksi VNN (*viral nervous necrosis*) dengan Pemberian Ekstrak *Dunaliella salina*”. Di dalam tulisan ini disajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi latar belakang dan tujuan penelitian, jadwal pelaksanaan penelitian, metode perolehan data dari penelitian dan analisa data penelitian. Laporan skripsi ini di bawah bimbingan Dr. Ating Yuniarti, S.Pi., M. Aqua selaku pembimbing 1 dan Rani Yuwanita, S. Pi, MP. selaku pembimbing 2.

Sangat disadari bahwa dengan keterbatasan yang dimiliki, walaupun telah dikerahkan segala kemampuan untuk lebih teliti, penulis mengharapkan saran yang membangun agar tulisan ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, Juni 2019

Penulis

## DAFTAR ISI

|   | Halaman   |
|---|-----------|
| UCAPAN TERIMA KASIH.....  | iii       |
| RINGKASAN.....  | vi        |
| KATA PENGANTAR .....  | vii       |
| DAFTAR ISI .....  | viii      |
| DAFTAR GAMBAR.....  | xi        |
| DAFTAR TABEL.....   | x         |
| DAFTAR LAMPIRAN.....  | xii       |
| <b>1. PENDAHULUAN .....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1 Latar Belakang .....  | 1         |
| 1.2 Rumusan Masalah.....  | 3         |
| 1.3 Tujuan .....  | 3         |
| 1.4 Kegunaan Penelitian.....  | 3         |
| 1.4.1 Kegunaan Teoritis .....   | 4         |
| 1.4.2 Kegunaan Praktis.....   | 4         |
| 1.5 Tempat dan Waktu Pelaksanaan.....   | 4         |
| <b>2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>  | <b>5</b>  |
| 2.1 Ikan Kerapu Cantang ( <i>E. fuscoguttatus</i> x <i>E. lanceolatus</i> ) ..... | 5         |
| 2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi.....  | 5         |
| 2.1.2 Habitat.....  | 6         |
| 2.1.3 Kebiasaan Makan Ikan Kerapu Cantang .....                                   | 7         |
| 2.1.4 Sistem Pertahanan Tubuh Ikan Kerapu Cantang .....                           | 8         |
| 2.2 NFKB.....   | 10        |
| 2.3 <i>Dunaliella salina</i> .....  | 11        |
| 2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi .....   | 11        |
| 2.3.2 Habitat.....  | 12        |
| 2.3.3 Siklus Hidup .....  | 13        |
| 2.3.4 Kandungan <i>Dunaliella salina</i> .....                                    | 14        |
| 2.4 <i>Viral Nervous Necrosis</i> (VNN) .....                                     | 15        |
| 2.4.1 Klasifikasi dan Morfologi.....  | 15        |
| 2.4.2 Habitat dan Distribusi .....  | 17        |
| 2.4.3 Mekanisme Infeksi VNN .....   | 17        |
| <b>3. METODE PENELITIAN .....</b>   | <b>19</b> |
| 3.1 Materi Penelitian.....  | 19        |
| 3.1.1 Alat-alat Penelitian .....  | 19        |
| 3.1.2 Bahan-bahan Penelitian .....  | 20        |
| 3.2 Metode Penelitian.....  | 21        |
| 3.3 Teknik Pengumpulan Data.....  | 21        |
| 3.3.1 Data Primer .....   | 21        |
| 3.3.2 Data Sekunder .....   | 21        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 3.4       | Prosedur Penelitian .....                        | 22        |
| 3.4.1     | Penelitian Pendahuluan .....                     | 22        |
| 3.4.2     | Penelitian Utama.....                            | 23        |
| 3.4.3     | Maserasi .....                                   | 24        |
| 3.4.4     | Repeletting.....                                 | 25        |
| 3.4.5     | Isolasi Virus.....                               | 25        |
| 3.4.6     | Persiapan Ikan Penelitian.....                   | 26        |
| 3.5       | Pelaksanaan Penelitian .....                     | 26        |
| 3.5.1     | Pemberian Pakan.....                             | 26        |
| 3.5.2     | Uji Tantang.....                                 | 27        |
| 3.5.3     | Pengamatan Gejala Klinis Patologis.....          | 27        |
| 3.5.4     | Pengamatan Lesi Anatomi .....                    | 27        |
| 3.5.5     | Deteksi VNN dengan PCR .....                     | 27        |
| 3.5.6     | SDS-PAGE .....                                   | 28        |
| 3.5.7     | Pengambilan Organ Mata Ikan Kerapu Cantang ..... | 29        |
| 3.5.8     | Uji Ekspresi NFkB.....                           | 30        |
| 3.6       | Parameter Uji.....                               | 31        |
| 3.6.1     | Parameter Utama.....                             | 31        |
| 3.6.2     | Parameter Penunjang .....                        | 31        |
| 3.7       | Analisis Data .....                              | 32        |
| <b>4.</b> | <b>PEMBAHASAN .....</b>                          | <b>33</b> |
| 4.1       | Parameter Utama .....                            | 33        |
| 4.1.1     | Gejala Klinis Patologis.....                     | 33        |
| 4.1.2     | Lesi Anatomi .....                               | 37        |
| 4.1.3     | SR ( <i>Survival Rate</i> ).....                 | 39        |
| 4.1.4     | Uji PCR .....                                    | 40        |
| 4.1.5     | Uji SDS-PAGE .....                               | 41        |
| 4.1.6     | Uji NFkB .....                                   | 42        |
| 4.2       | Parameter Penunjang.....                         | 49        |
| 4.2.1     | Kualitas Air.....                                | 49        |
| <b>5.</b> | <b>KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>                | <b>51</b> |
| 5.1       | Kesimpulan.....                                  | 51        |
| 5.2       | Saran.....                                       | 51        |
|           | <b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>                       | <b>52</b> |
|           | <b>LAMPIRAN.....</b>                             | <b>59</b> |

## DAFTAR GAMBAR

| Daftar Gambar   | Halaman |
|---|---------|
| 1. Ikan Kerapu Cantang ( <i>Epinephelus</i> sp.).....                 | 6       |
| 2. Aktivasi NFKB ( <i>Nuclear Factor Kappa Beta</i> ).....            | 9       |
| 3. Ekspresi NFKB .....  | 11      |
| 4. <i>Dunaliella salina</i> .....                                     | 12      |
| 5. Struktur VNN ( <i>Viral Nervous Necrosis</i> ) .....               | 16      |
| 6. Prosedur Penelitian Pendahuluan.....                               | 22      |
| 7. Prosedur Kerja Penelitian Utama.....                               | 23      |
| 8. Gejala Klinis Patologis Ikan Kerapu Cantang Pasca Infeksi VNN..... | 37      |
| 9. Lesi Anatomi Ikan Kerapu Cantang 96 Jam Pasca Infeksi .....        | 38      |
| 10. Hasil Elektroforesis Ikan Kerapu Cantang Positif VNN.....         | 40      |
| 11. Hasil Analisa SDS-PAGE.....                                       | 41      |
| 12. Uji NFKB.....   | 47      |

## DAFTAR TABEL

| Daftar Tabel  | Halaman |
|---|---------|
| 1. Kandungan Bioaktif <i>D. salina</i> .....                        | 15      |
| 2. Gejala Klinis Patologis Pasca Infeksi VNN.....                   | 33      |
| 3. Hasil Uji NFKB.....  | 43      |
| 4. Hasil Pengukuran Parameter Kualitas Air Selama Pemeliharaan..... | 49      |



## DAFTAR LAMPIRAN

| Daftar Lampiran  | Halaman |
|--|---------|
| 1. Alat dan Bahan .....                                | 59      |
| 2. Data Hasil Uji SDS-PAGE.....                        | 67      |
| 3. Data Kualitas Air .....                             | 68      |
| 4. Data SR Ikan Kerapu Cantang Selama Penelitian ..... | 70      |



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Di Indonesia ikan kerapu merupakan salah satu ikan konsumsi yang digemari oleh masyarakat. Pemeliharaan ikan kerapu membutuhkan waktu yang lama untuk mencapai ukuran konsumsi. Pengembangan tentang ikan kerapu dengan melakukan beberapa perkawinan silang antar jenis kerapu. Salah satu ikan yang berhasil di dapatkan yaitu jenis ikan kerapu cantang. Menurut Sutarmat dan Yudha (2013), ikan kerapu cantang yang memiliki nama latin *Epinephelus* sp. merupakan ikan hasil persilangan antara ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dengan ikan kerapu kertang (*Epinephelus lanceolatus*). Perekayasaan ikan kerapu macan betina dengan ikan kerapu kertang jantan menghasilkan suatu varietas baru yang secara morfologis mirip dengan kedua spesies induknya. Pengembangan usaha budidaya kerapu ini juga perlu memperhatikan beberapa aspek pendukung seperti benih, pakan, lingkungan perairan, manajemen kesehatan serta sistem dan teknologi budidaya. Nursyifani (2017), menambahkan bahwa produksi ikan kerapu sepanjang Januari-Oktober 2017 mencapai 46.504 ton, naik lebih dari 300% dari tahun 2016 yang hanya 11.504 ton.

Budidaya kerapu cantang tidak lepas dari faktor penyakit yang dapat menyerang dan menggagalkan hasil budidaya. Menurut Sudaryatma, *et al.* (2012), salah satu penyakit yang telah dilaporkan oleh para peneliti adalah *Viral Nervous Necrosis* (VNN) yang dapat menyebabkan kematian massal pada ikan kerapu, terutama pada stadia larva dan juvenil. Di Indonesia kejadian penyakit VNN ditemukan pertama kali di daerah Banyuwangi pada budidaya kakap putih dan ikan kakap tersebut tampak lesu, berenang berputar dengan posisi perut di permukaan dan sering muncul ke permukaan dengan berenang secara vertikal. Gejala klinis

yang tampak pada ikan kakap tersebut memiliki kesamaan dengan gejala klinis ikan yang terinfeksi VNN. Penyakit VNN dapat menyerang otak sehingga menyebabkan ikan berenang berputar, mengambang di permukaan dengan perut menghadap ke atas dan pigmentasi warna yang lebih gelap pada ikan.

Salah satu pencegahan yang dapat dilakukan untuk mengurangi dampak dari virus VNN yaitu menggunakan pakan alami. Pakan alami yang dapat digunakan yaitu *Dunaliella salina*, pemilihan alga ini dikarenakan *D. salina* mempunyai kandungan  $\beta$ -karoten yang cukup tinggi. Menurut Astrid, *et al.* (2013), *D. salina* mempunyai kandungan  $\beta$ -karoten dan kandungan gizi yang tinggi. *D. salina* memiliki kandungan nutrisi yaitu kandungan protein 25,67 g, karbohidrat 40,21g, lemak 18,02 g dan memiliki kandungan serat 2,10 g. Pada analisis proksimat nutrisi biomassa *D. salina* untuk 100 g/g berat kering. Alga yang mempunyai kandungan  $\beta$ -karoten tinggi mempunyai manfaat sebagai antioksidan, antibakteria, meningkatkan imunitas serta pengganti sel-sel yang rusak. Menurut Abd El-Baky, *et al.* (2007), *D. salina* mengakumulasi jumlah karotenoid yang tinggi (12,6% berat kering), termasuk  $\beta$ -karoten (60,4% dari karotenoid total), *astaxantin* (17,7%), *zeaxantin* (13,4%), *lutein* (4,6%) dan *kriptoxantin* (3,9%). *D. salina* menghasilkan  $\beta$ -karoten sebesar 14% dari berat kering yang kaya akan protein dan asam lemak esensial sebesar 1-83% dalam berperan sebagai antimikroba. Menurut Morais, *et al.* (2017), *D. salina* selain menghasilkan  $\beta$ -karoten termasuk juga dalam golongan *microbial polysaccharides* yang selain berperan sebagai antivirus, juga berperan sebagai antioksidan yang mampu menghambat penetrasi virus ke dalam sel inang. Pemberian *D. salina* dengan dosis 300 mg/kg pakan pada penelitian Supamattaya, *et al.* (2005), mampu menghambat kematian ikan atau udang karena menghasilkan SR tertinggi sebesar 33,3 %.

Ikan mempunyai sistem imun non spesifik dan sistem imun spesifik. Sistem imun non spesifik merupakan pertahanan tubuh paling awal dalam menghadapi

serangan berbagai mikroorganisme. Respon imun non-spesifik disebut demikian karena tidak ditunjukkan terhadap mikroorganisme tertentu. Ikan juga memiliki sistem imun spesifik, yang mempunyai kemampuan untuk mengenal antigen yang dianggap benda asing bagi dirinya (Rahmaningsih, 2018).

NFKB (*Nuclear Factor Kappa Beta*) adalah suatu protein yang kompleks di dalam sitoplasma yang berperan penting di dalam tubuh seperti respon imun, inflamasi, stress oksidatif, sitokin, radikal bebas, radiasi ultraviolet, dan proses perkembangan bakteri dan virus serta proliferasi sel dan apoptosis. NFKB juga dapat mengontrol transkripsi DNA dan ditemukan hampir pada semua jenis sel. NFKB berperan dalam mengatur respon kekebalan tubuh terhadap infeksi (Gillmore, 2006). Dengan menggunakan metode NFKB diharapkan dapat mengetahui respon imun dari ikan kerapu cantang yang terinfeksi virus VNN.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, rumusan masalah yang dapat diambil dari penelitian ini adalah bagaimana ekspresi NFKB (*Nuclear Factor Kappa Beta*) pada mata ikan kerapu cantang yang diinfeksi virus VNN dengan pemberian ekstrak *Dunaliella salina*?

## 1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui hasil ekspresi NFKB (*Nuclear Factor Kappa Beta*) mata ikan kerapu cantang yang diinfeksi virus VNN dengan pemberian ekstrak *Dunaliella salina*.

## 1.4 Kegunaan Penelitian

Kegunaan dari penelitian ini terbagi menjadi dua, yakni kegunaan praktis dan kegunaan teoritis.

#### **1.4.1 Kegunaan Teoritis**

Kegunaan teoritis dari penelitian ini diharapkan menjadi referensi atau sumber informasi terhadap status NFKB (*Nuclear Factor Kappa Beta*) pada mata ikan kerapu cantang yang diinfeksi virus VNN dengan pemberian ekstrak *Dunaliella salina*.

#### **1.4.2 Kegunaan Praktis**

Kegunaan praktis dari penelitian ini yaitu digunakan sebagai salah satu cara bagi para pembudidaya ikan kerapu cantang dalam mengatasi permasalahan mengenai kesehatan ikan yang diakibatkan virus VNN.

#### **1.5 Tempat dan Waktu Pelaksanaan**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Eksplorasi Sumberdaya Perikanan dan Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Sentral Ilmu Hayati, Fakultas MIPA serta Laboratorium Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya dan Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan, Balai Perikanan Budidaya Air Payau Situbondo pada bulan Januari-Maret 2019.

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus lanceolatus*)

#### 2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi ikan kerapu cantang menurut Soemarjati, *et al.* (2015), adalah sebagai berikut:

|          |   |
|----------|---|
| Filum    | : Chordata  |
| Subfilum | : Vertebrata  |
| Kelas    | : Pisces  |
| Ordo     | : Perciformes   |
| Famili   | : Serranidae  |
| Genus    | : <i>Epinephelus</i>  |
| Spesies  | : <i>Epinephelus fuscoguttatus</i> x <i>Epinephelus lanceolatus</i> |

Ikan kerapu cantang mempunyai bentuk tubuh yang relatif bulat. Warna tubuhnya coklat kehitaman dengan 5 garis melintang. Bentuk mulutnya lebar dengan bibir bawah lebih panjang daripada bibir bagian atasnya. Ikan kerapu cantang mempunyai bintik hitam yang banyak tersebar di bagian kepala dan dekat sirip pektoral dengan jumlah yang berlainan pada setiap individu. Ikan kerapu cantang juga memiliki sirip punggung yang semakin melebar pada bagian belakangnya. Bentuk ekornya membulat dan tipe sisik *stenoid* (bergerigi) (Sutarmat dan Yudha, 2013). Soemarjati, *et al.* (2015), menambahkan bahwa ikan kerapu cantang mempunyai sirip punggung yang terdiri atas 11 jari-jari keras dan 15 jari-jari lunak, sirip pektoral terdiri atas 17 jari-jari lunak, sirip ventral terdiri dari 1 jari-jari keras dan 5 jari-jari lunak, sirip anal terdiri dari atas 13 jari-jari lunak. Ikan kerapu cantang tergolong ikan karnivora yang biasanya memakan ikan-ikan kecil

yang ada di perairan, ikan kerapu dilengkapi dengan gigi yang lancip, kuat dan mulut yang lebar. Morfologi dari ikan kerapu cantang disajikan pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.) (Sutarmat dan Yudha,2013)

### 2.1.2 Habitat

Ikan kerapu cantang merupakan salah satu ikan hasil persilangan antara ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dan kerapu kertang (*Epinephelus lanceolatus*). Menurut Oktavia, *et al.* (2015), ikan ini telah dikembangkan di Indonesia (BBAP Situbondo) sejak tahun 2009. Ikan cantang mampu mentolerasi terhadap lingkungan yang kurang layak dan ruang terbatas. Ikan kerapu cantang dapat bertahan hidup pada salinitas yang lebih tinggi dibandingkan ikan kerapu macan maupun kerapu kertang. Pertumbuhan optimum pada ikan kerapu cantang yaitu pada salinitas 15-33 ppt dengan kepadatan yang tinggi.

Kerapu biasanya hidup di perairan karang pantai dengan kedalaman 0,5-3 meter. Ikan kerapu yang sudah dewasa (buraya) akan berpindah ke perairan yang lebih dalam, yakni di kedalaman 7-40 meter. Biasanya perpindahan ini berlangsung pada siang dan sore hari. Telur dan larva kerapu bersifat pelagis (berada di kolom air), sementara kerapu muda hingga dewasa bersifat demersal atau berdiam di dasar kolam. Ikan kerapu bersifat nokturnal, yakni pada siang hari lebih banyak bersembunyi di liang-liang karang dan pada malam hari aktif bergerak di kolom air untuk mencari makanan (Subayakto dan Cahyaningsih, 2003). Razi (2013), menambahkan bahwa ikan kerapu cantang hidup diperairan

payau selama kurang lebih 2-3 tahun hingga mencapai ukuran 3-5 kg. Ikan dewasa yang umurnya 3-4 tahun akan beruaya ke muara sungai yang mempunyai salinitas 20-35 ppt untuk proses pematangan kelamin dan pemijahan. Pergerakan ke area pemijahan biasanya terjadi pada akhir musim panas dan pemijahan terjadi pada awal musim penghujan. Pemijahan pada musim penghujan terjadi karena suhu dan salinitas yang merupakan faktor penting dalam pemijahan.

### 2.1.3 Kebiasaan Makan Ikan Kerapu Cantang

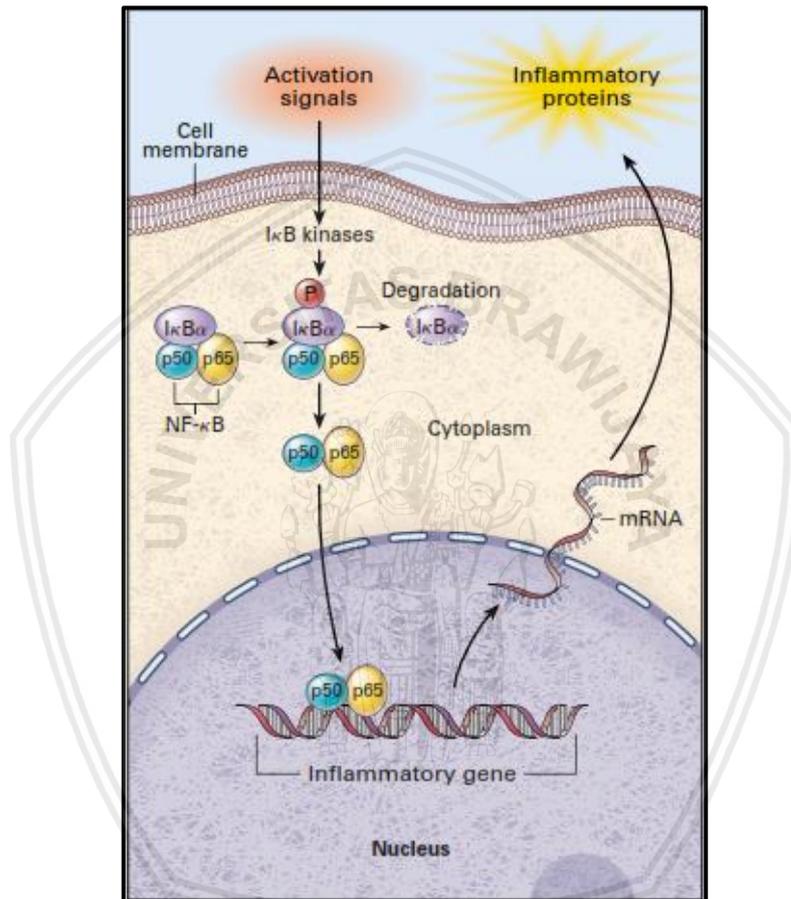
Jenis kerapu umumnya termasuk ikan buas atau predator yang aktif mencari makan pada malam hari (*nocturnal*). Aktivitas ikan *nocturnal* tidak sebanyak ikan *diurnal* (siang hari). Ikan *nocturnal* cenderung diam pada siang hari dan arah gerakannya tidak begitu luas dibandingkan ikan *diurnal*. Ikan *nocturnal* lebih banyak menggunakan indera perasa dan penciuman dibandingkan indera penglihatannya (Iskandar dan Mawardi, 1997). Jenis pakan yang paling disukai ikan kerapu berasal dari golongan crustaceae (udang-udangan) seperti rebon, dogol dan krosok, selain itu jenis ikan-ikan kecil seperti tembang, teri dan belanak. Pemberian pakan ikan kerapu cantang yaitu sebesar 10 -15 % berat badan perhari. Pertumbuhan ikan kerapu akan maksimal jika pemberian pakan diberikan sebanyak 15 %. Pemberian pakan 15 % dinilai sudah mencukupi kebutuhan ikan kerapu untuk tumbuh dengan maksimal (Rahmaningsih dan Ari, 2013). Oktavia, *et al.* (2015), menambahkan bahwa ikan kerapu cantang membutuhkan sumber asam lemak yang berbeda di dalam pakannya dan kebutuhan tersebut dipengaruhi jenis dan ukuran ikan. Ketidaktepatan sumber asam lemak pakan dapat menyebabkan pertumbuhan yang tidak maksimal. Pakan yang diberikan pada ikan kerapu cantang harus memenuhi kebutuhan yang di perlukan untuk ikan kerapu cantang tumbuh. Marzuqi dan Anjusaary (2013), menambahkan bahwa kebutuhan pakan untuk ikan kerapu cantang yaitu protein 45-55%, lemak 8-14%.

#### 2.1.4 Sistem Pertahanan Tubuh Ikan Kerapu Cantang

Ikan kerapu memiliki sistem pertahanan tubuh ketika tubuhnya terinfeksi oleh agen asing baik dari jenis bakteri, virus, parasit, maupun jamur. Menurut Gusman (2011), ikan kerapu memiliki dua sistem pertahanan yaitu sistem pertahanan alamiah (*innate immunity*) dan sistem pertahanan adaptif (*adaptive immunity*). Sistem imun pada ikan kerapu belum selengkap pada vertebrata tingkat tinggi tetapi jauh lebih berkembang dibandingkan sistem imun invertebrata. Kemampuan sistem imun non spesifik (*innate immunity*) terdiri dari mekanisme pertahanan seluler dan humoral. Pertahanan seluler non spesifik diperankan oleh monosit/makrofag, neutrophil/granulosit dan sel *cytotoxic* non spesifik atau sel NK (*natural killer*). Sedangkan pertahanan humoral non spesifik melibatkan *lectins*, enzim *lytic* (*lysozyme*, *complement*), *transferrin*, *ceruloplasmin*, *c-reactive protein* dan *interferon*. Baratawidjaya (2006), menambahkan bahwa sistem imun spesifik seluler yaitu limfosit T atau sel T yang berperan melawan mikroorganisme intraseluler dengan cara meningkatkan kemampuan makrofag sehingga dapat memfagositosis sel bakteri, virus dan partikel asing lainnya yang masuk ke dalam tubuh ikan kerapu cantang.

Upaya yang dilakukan oleh tubuh ikan dalam mempertahankan diri terhadap serangan benda asing adalah dengan menghancurkan benda asing secara non-spesifik dengan proses fagositosis. Sistem imun non-spesifik merupakan salah satu pertahanan tubuh yang mampu memberikan respon langsung terhadap antigen, sedangkan sistem imun spesifik membutuhkan waktu untuk mengenal antigennya sebelum melakukan respon (Baratawidjaya, 2006). Aktivitas respon imunitas dapat distimulasi oleh imunostimulator. Respon imun dibentuk oleh jaringan limfoid. Produk jaringan ini yaitu sel-sel darah dan respon imunitas baik seluler maupun humoral. Leukosit merupakan jenis sel yang aktif dalam sistem pertahanan tubuh, leukosit dihasilkan di organ timus dan ginjal

kemudian diangkut dalam darah menuju seluruh tubuh (Irianto, 2005). Sistem imun ikan kerapu cantang berhubungan dengan NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B berperan dalam mengatur respon kekebalan tubuh terhadap infeksi (Gillmore, 2006). Selain mengatur respon kekebalan tubuh NF- $\kappa$ B juga berperan mengatur kadar gen TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, NO dan COX-2. Aktivasi NF- $\kappa$ B disajikan pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Aktivasi NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor Kappa Beta*) (Barnes dan Karin, 1997)

Berdasarkan gambar diatas menurut Barnes dan Karin (1997), NF- $\kappa$ B merupakan salah satu protein kompleks yang terdapat di sitoplasma, NF- $\kappa$ B akan aktif setelah menerima sinyal yang disebabkan oleh stres lingkungan, virus dan bakteri. Salah satu yang dapat menyebabkan yaitu virus VNN, infeksi virus VNN yang masuk ke dalam membran sel akan mengaktifkan I $\kappa$ B kinase. I $\kappa$ B kinase akan mendegradasikan I $\kappa$ B $\alpha$  yang merupakan protein penghambat pada NF- $\kappa$ B sehingga NF- $\kappa$ B akan bebas. NF- $\kappa$ B yang bebas (p50 dan p65) akan menuju

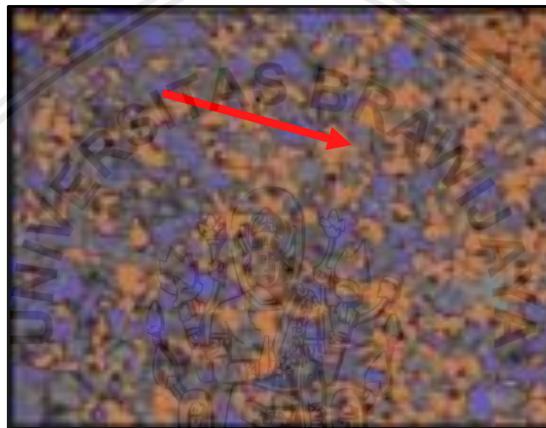
inflammatory gen yang berada pada nukleus. mRNA akan membantu menterjemahkan p50 dan p65 dengan melanjutkan proses ke inflammatory protein.

## 2.2 NFKB

NFKB (*Nuclear Factor Kappa Beta*) mulai diidentifikasi sekitar 20 tahun yang lalu sebagai faktor transkripsi yang mengikat gen kappa dalam sel B. NFKB berperan penting dalam mengatur sistem peradangan, sistem imun (kekebalan tubuh), proliferasi sel, dan apoptosis. Menurut Vandemark, *et al.* (2012), NFKB juga berperan penting dalam limfosit, diferensiasi myeloid, sel T, dan sel *natural killer* (NK) serta pengembangan sel B. Aktivasi fisiologis NFKB selama pematangan limfosit dan aktivasi memediasi ekspresi gen yang terlibat dalam proliferasi, dan kelangsungan hidup serta gen yang terlibat dalam kekebalan tubuh hingga terjadi infeksi. Aktivasi NFKB yang tidak teregulasi menghasilkan ekspresi gen target yang menyimpang dalam mengatur proliferasi atau kelangsungan hidup sel, termasuk *cyclin*, dan sitokin yang mengatur pertumbuhan dan proliferasi limfosit. Li Wang, *et al.* (2009), menambahkan bahwa NFKB ditemukan di sitoplasma sebagai heterodimer yang terkait dengan protein I $\kappa$ B untuk mencegah NFKB dari translokasi ke nukleus. Setelah menerima sinyal yang tepat, seperti sitokin, tumor necrosis factor (TNF), interleukin-1 (IL-1), lipopolisakarida (LPS), radiasi UV, faktor pertumbuhan, atau infeksi virus, NFKB dilepaskan dari I $\kappa$ B protein dan mentranslokasi ke dalam nukleus. NFKB pada nukleus dapat meningkatkan transkripsi gen spesifik.

Peran NFKB yang paling penting terletak pada kemampuan untuk mengaktifkan banyak gen yang terlibat dalam respons kumulatif terhadap infeksi. Sel dendritik, makrofag, dan sel epitel mukosa mengekspresikan sel reseptor yang merupakan bagian penting dari sistem imun yang bertanggung jawab untuk

mendeteksi molekul mikroba (asam nukleat dan dinding sel bakteri). Setelah distimulasi, TLR (*Toll-Like Receptors*) mengaktifkan faktor transkripsi NFKB. TLR merupakan suatu protein yang berperan penting dalam sistem kekebalan tubuh bawaan (*innate*). Aktivasi ini memicu ekspresi sel T yang disekresi. Peran NFKB berlanjut melalui respon imun adaptif, mengaktifkan reseptor antigen dan menstimulasi limfosit T dan B serta faktor aktivasi sel B untuk kelangsungan hidup (Serasanambati dan Chilakapati, 2016). Ekspresi NFKB pada bagian mata ikan kerapu disajikan pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Ekspresi NFKB (Mashita, *et al.*, 2019)

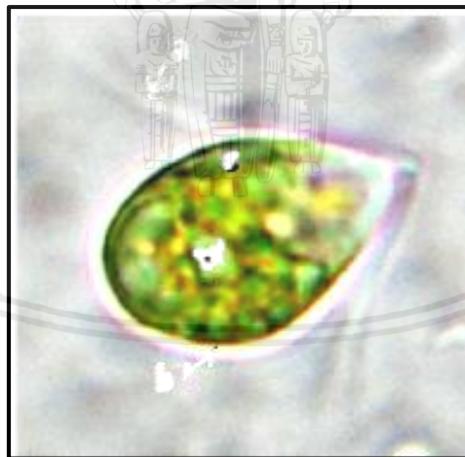
## 2.3 *Dunaliella salina*

### 2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi *Dunaliella salina* menurut Borowitzka dan Siva (2007), adalah sebagai berikut:

|         |                     |
|---------|---------------------|
| Phylum  | : Chlorophyta       |
| Class   | : Chlorophyceae     |
| Order   | : Dunaliellales     |
| Family  | : Dunaliellaceae    |
| Genus   | : <i>Dunaliella</i> |
| Species | : <i>D. salina</i>  |

*Dunaliella salina* adalah salah satu dari mikro alga hijau yang halotolerant meskipun dinding selnya agak kaku. *D. salina* tetap dapat tumbuh di perairan yang bersalinitas dari 0,5-50 mg/l. *D. salina* merupakan mikroalga yang bersifat uniseluler, mempunyai sepasang flagellata yang sama panjangnya. Kloroplast berbentuk cangkir dan bentuk selnya tidak stabil dan beragam. Kebanyakan berbentuk lonjong, bulat silindris dan elips (Djunaedi, *et al.*, 2017). Borowitzka (2013), menambahkan bentuk sel *D. salina* adalah oval hampir bulat dengan flagella panjang dibagian anterior, biasanya berbentuk simetris radial, pada kondisi suhu rendah *D. salina* dapat berubah bentuk menjadi bilateral dorsiventral. *D. salina* memiliki ukuran sel 5-29  $\mu\text{m}$  dengan ketebalan 3,8-20,3  $\mu\text{m}$ . Masing-masing sel *D. salina* mempunyai satu kloroplas yang berbentuk cawan dengan pirenoid yang berbeda dan dapat berubah warna dari hijau menjadi merah, tergantung pada kandungan karotenoidnya. Morfologi *D. salina* disajikan pada Gambar 4.



**Gambar 4.** *Dunaliella salina* (Tran, *et al.*, 2013)

### 2.3.2 Habitat

Habitat atau lingkungan yang dapat menunjang pertumbuhan *D. salina* adalah intensitas cahaya, selain salinitas, pH dan suhu. Menurut Padang, *et al.* (2018), Cahaya menjadi salah satu faktor pembatas bagi keberlangsungan hidup *D. salina*. Cahaya yang bersumber dari energi matahari dibutuhkan oleh *D. salina*

dalam proses fotosintesis. Proses fotosintesis mengalami peningkatan apabila intensitas cahaya meningkat dan mengalami penurunan apabila intensitas cahaya berkurang. Pigmen yang menyerap cahaya pada *D. salina* adalah klorofil a, disamping pigmen lain seperti karotenoid dan xantofil.

Habitat dari *D. salina* merupakan daerah yang bersalinitas tinggi. Menurut Oren (2014), *D. salina* mempunyai satu sel atau uniseluler dengan warna merah. Kebanyakan *D. salina* ditemukan pada perairan hipersalin dengan kadar garam yang tinggi. *D. salina* merupakan salah satu produsen primer utama yang dapat tumbuh dengan lingkungan seperti itu. *D. salina* mampu hidup dengan salinitas yang *range* atau jaraknya tinggi yakni berkisar 5-28 ppt. *D. salina* juga mampu mentolerir pH pada kisaran 4-9. Kondisi pH 9 *D. salina* masih mampu untuk tetap hidup dengan baik.

### 2.3.3 Siklus Hidup

Masa pertumbuhan *D. salina* dapat diukur berdasarkan biomas, maupun jumlah sel dalam mediumnya. Menurut Hadiyanto dan Azim (2012), fase pertumbuhan *D. salina* dapat digambarkan dengan grafik dalam keadaan *D. salina* homogen, sistem batch (terakumulasi), dengan kondisi supply nutrient yang ditentukan di awal pembibitan. Fase *D. salina* diawali dari fase lag. Fase lag adalah fase adaptasi *D. salina* dalam medium baru. Fase selanjutnya yaitu fase eksponensial, fase ini kecepatan pertumbuhan *D. salina* dapat dihitung berdasarkan kenaikan biomassa dan selisih waktu yang dibutuhkan. Kecepatan pertumbuhan (*growth rate*) adalah salah satu indikasi penting suatu sel berhasil melalui fase adaptasi. Fase stasioner adalah fase di mana tidak ada lagi pertumbuhan *D. salina*, atau kecepatan pertumbuhan (*growth rate*) menjadi nol dan fase terakhir adalah fase kematian, dimana pada fase ini jumlah sel *D. salina* yang mati lebih banyak dari jumlah sel yang hidup.

### 2.3.4 Kandungan *Dunaliella salina*

*D. salina* merupakan kelompok alga hijau yang mempunyai kandungan protein, lemak, dan karbohidrat sebagai sumber pangan yang baik. *D. salina* menghasilkan pigmen (klorofil, karotenoid,  $\beta$ -karoten), asam amino, asam lemak dan gliserol. Menurut Zainuddin (2017), pigmen umum yang sering ditemukan adalah klorofil, dan karotenoid. Klorofil a dapat digunakan sebagai pewarna pada bidang farmasi, senyawa turunan dari klorofil juga dapat digunakan sebagai produk kesehatan. Metabolisme *D. salina* dipengaruhi oleh faktor fisika, kimia dan biologi lingkungan. Diantaranya adalah intensitas cahaya, nitrogen, nutrient dan suhu. Kandungan *D. salina* yaitu karbohidrat (25,67%), protein (40,21%) dan lipid (18,02%). *D. salina* juga mampu mengakumulasi jumlah karotenoid yang tinggi (12,6% berat kering), termasuk  $\beta$ -karoten (60,4% dari karotenoid total), astaxantin (17,7%), Zeaxantin (13,4%), lutein (4,6%) dan kriptoxantin (3,9%).

*D. salina* merupakan salah satu jenis fitoplankton yang dimanfaatkan sebagai pakan alami. Menurut Mahardani, *et al.* (2017), *D. salina* ini juga dapat digunakan sebagai pakan rotifera dan pakan Artemia pada budidaya Artemia. Kandungan nutrisi *D. salina* yang ditunjukkan dalam bahan kering adalah protein (57%), karbohidrat (32%) dan lemak (6%). *D. salina* merupakan salah satu mikroalga yang menghasilkan karotenoid, salah satu jenis karotenoid yang dihasilkan adalah  $\beta$ -karoten yang mampu diakumulasi dalam jumlah sangat tinggi pada beberapa kondisi stress seperti keterbatasan nitrogen, terkena intensitas cahaya tinggi dan salinitas yang tinggi. Salinitas mempengaruhi peningkatan kandungan karotenoid *D. salina* dari 2 pg/sel menjadi 5,5 pg/sel.

Kandungan *D. salina* selain dari betakaroten yang mampu digunakan sebagai senyawa antivirus yaitu beberapa dari golongan fenol, *Napthaline* dan juga tetradekana. Senyawa fenol mempunyai beberapa turunan, termasuk flavonoid dan tanin yang berfungsi dalam menghambat pertumbuhan virus.

*Napthaline* telah teridentifikasi sebagai senyawa antimikroba yang dapat untuk melawan patogen. Senyawa ini juga dapat digunakan untuk toksisitas akut, anti inflamasi dan anti analgesik (Rokade dan Sayyed, 2009), sedangkan senyawa fenol dapat digunakan dalam pencegahan penyakit yang melibatkan radikal bebas dengan mengurangi stres dan menghambat oksidasi makromolekul seperti yang di laporkan Pereira, *et al.* (2007). Senyawa tetradekana sebanyak 34,61% ditemukan sebagai antibakteri dalam *Spirulina platensis* yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji (Ozdemir, *et al.*, 2004). Berikut disajikan kandungan bioaktif dari *D. salina* pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Kandungan Bioaktif *D. salina*

| Parameter    | Kandungan Bioaktif       |                                       |
|--------------|--------------------------|---------------------------------------|
|              | Menurut Zainuddin (2017) | Menurut Mahardani, <i>et al.</i> 2017 |
| Karbohidrat  | 25,67%                   | 32 %                                  |
| Lipid        | 18,02 %                  | 6 %                                   |
| Protein      | 40,21 %                  | 57 %                                  |
| Karotenoid   | 60,4%                    | 5 pg/sel                              |
| Astaxantin   | 17,7%                    | -                                     |
| Zeaxantin    | 13,4%                    | -                                     |
| Lutein       | 4,6%                     | -                                     |
| kriptoxantin | 3,9%                     | -                                     |

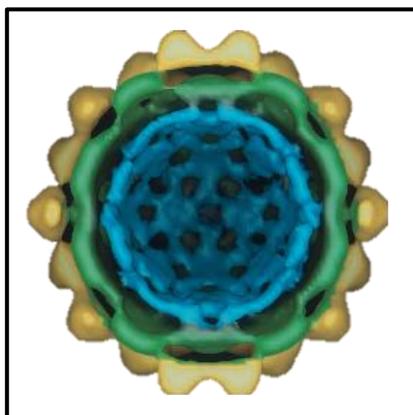
## 2.4 Viral Nervous Necrosis (VNN)

### 2.4.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi dari Viral Nervous Necrosis (VNN) menurut Chien, *et al.* (2017) adalah sebagai berikut:

|         |                                 |
|---------|---------------------------------|
| Kingdom | : Virus                         |
| Divisi  | : RNA                           |
| Grup    | : Single stranded RNA (+)       |
| Family  | : Nodaviridae                   |
| Genus   | : Betanodavirus                 |
| Spesies | : <i>Viral Nervous Necrosis</i> |

VNN merupakan jenis virus yang disebabkan oleh virus Betanoda, virus RNA ini mempunyai satu untai positif. Menurut Toffan, *et al.* (2017), ukuran virus VNN ini berkisar antara 50-100 nm. Gen RNA1 memiliki panjang sekitar 3,1 kb dalam mengkode replikasi virus dan segmen RNA2 sepanjang 1,4 kb mengkodekan protein kapsid. Transkrip ketiga, yang dikenal sebagai RNA3 (0,4 kb), dibelah dari ujung RNA1 selama replikasi virus dan mengkodekan protein non-struktural B2, menghambat pertumbuhan RNA sel. Yanuhar (2011), menambahkan VNN termasuk keluarga *Nodaviridae* yang menginfeksi ikan termasuk genus *Betanodavirus*. Genus *Betanodavirus* dapat menginfeksi ikan budidaya baik ikan air laut maupun ikan air tawar. Penyakit ini pertama kali diketahui pada tahun 1990 di pembenihan dan pembesaran *Oleganathus fasciatus* di Jepang dan ikan kakap putih di Australia, ikan kerapu dan ikan guppy. Infeksi VNN dapat terjadi di berbagai sistem budidaya baik pada suhu hangat maupun dingin di laut maupun tawar. Menurut Sudaryatma, *et al.* (2012), kejadian penyakit VNN di Indonesia pertama kali ditemukan di daerah Banyuwangi pada budidaya ikan kakap putih. Ikan kakap tersebut terlihat lesu, berenang berputar dengan perut di permukaan dan sering muncul ke permukaan dengan berenang secara vertikal. Struktur VNN disajikan pada Gambar 5.



**Gambar 5.** Struktur VNN (*Viral Nervous Necrosis*) (Tang, *et al.* 2012)

#### 2.4.2 Habitat dan Distribusi

Budidaya kerapu tidak lepas dari faktor penyakit yang dapat menyerang dan merugikan kegiatan budidaya. Menurut Lestari dan Sudaryatma (2014), *Viral nervous necrosis* (VNN) merupakan salah satu virus yang dapat menyebabkan kematian massal pada ikan kerapu terutama pada stadia larva dan juvenil. Penyakit ini dapat menyebar melalui banyak perantara seperti air, media pembawa penyakit dan pakan budidaya. Virus ini dapat ditularkan melalui air dari ikan yang terinfeksi ke ikan yang sehat dalam waktu 4 hari kontak. Dengan demikian, induk kerapu dapat menjadi sumber virus untuk larvanya sendiri.

Infeksi virus penyebab VNN sangat cepat menyebar dan menginfeksi inang melalui saraf perifer yang ada di otot. Virus VNN masuk ke dalam sistem saraf pusat dan mata dan mengakibatkan ikan kehilangan orientasi berenang dan disfungsi visual. Larva dan juvenil kerapu yang terserang VNN berkisar pada suhu 24,5°C – 26° C yang merupakan suhu optimal dalam proses infeksi VNN. Infeksi virus ini dapat menyebabkan kematian pada umur 7-45 hari karena sistem saraf yang masih sederhana (Sudaryatma, *et al.* 2012).

#### 2.4.3 Mekanisme Infeksi VNN

Infeksi VNN dapat melalui dua bagian tubuh yaitu pada bagian mata dan otak. Menurut Putri, *et al.* (2013), VNN menginfeksi organ mata maupun otak ikan terjadi secara seketika/secara langsung menyerang reseptor ikan karena VNN adalah virus yang tidak mempunyai envelope. VNN secara langsung menempel pada reseptor dimana penempelan pada inang, virus memasukkan materi genetik dalam sel inang atau infeksi intraseluler dengan meninggalkan mantel protein di luar sel. Mantel protein merupakan protein konstituen virion dari VNN dan merupakan salah satu struktur yang penting. Mantel protein tidak hanya berperan di dalam asam nukleat VNN akan tetapi pada waktu yang bersamaan, protein juga memiliki peranan penting dalam proses infeksi pada sel sasaran.

VNN merupakan salah satu virus yang berantai tunggal positif, ss (+) *Ribonucleid Acid* (RNA), Mekanisme infeksi VNN yaitu melalui ikatan antara VNN adhesin dan molekul reseptor dalam organ kerapu. Viral adhesin dapat terbentuk dari komponen dasar viral yaitu coat protein dan asam nukleat. Coat protein VNN merupakan faktor utama dalam mekanisme virus menginfeksi inang (ikan kerapu) dimana protein memiliki peran dalam menempelnya virus pada reseptor inang (Yanuhar, 2011).

Virus VNN pada awal infeksi hanya memasukkan protein atau materi genetik pada retina (mata) khususnya bagian sitoplasma, kemudian akan bertahap sampai ke nukleus. Infeksi virus VNN dapat terjadi secara vertikal maupun horizontal, secara vertikal virus akan terbawa oleh induk atau ikan lain yang bersifat pembawa pada beberapa organ yang sudah terinfeksi seperti hati, ginjal, perut dan usus. Infeksi secara horizontal terjadi melalui badan air pada media hidup ikan. Virus yang sudah berhasil masuk ke inang akan mereplikasi diri pada tempat yang dianggapnya sesuai. Hasil replikasi virus akan menyebar melalui sumsum tulang belakang menuju otak, kemudian ke retina (Cozta dan Kim, 2016).

### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Alat-alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

| No. | Alat                               | Fungsi   |
|-----|------------------------------------|--|
| 1.  | Bak Kontainer                      | Sebagai wadah untuk ikan hidup   |
| 2.  | Selang aerator                     | Sebagai perantara penyuplai oksigen untuk ikan   |
| 3.  | Batu aerasi                        | Untuk memecah gelembung oksigen  |
| 4.  | Seser                              | Untuk membantu mengambil ikan  |
| 5.  | Drum                               | Sebagai wadah penampungan air laut   |
| 6.  | Thermometer                        | Untuk mengukur suhu selama pemeliharaan  |
| 7.  | DO meter                           | Untuk mengukur kadar DO selama pemeliharaan  |
| 8.  | Pipa paralon                       | Untuk mengalirkan oksigen dari blower ke seluruh bak kontainer.  |
| 9.  | Blower                             | Sebagai sumber energi untuk suplai oksigen.  |
| 10. | Autoklaf                           | Untuk mensterilisasi alat-alat yang digunakan.   |
| 11. | Botol sprayer                      | Sebagai wadah alkohol 70%.   |
| 12. | Timbangan digital                  | Untuk menimbang pakan dan kebutuhan <i>D. salina</i> dengan ketelitian $10^{-2}$   |
| 13. | Cetakan pellet                     | Untuk membantu dalam pembentukan hasil <i>repelleting</i>  |
| 14. | Nampan                             | Sebagai wadah untuk mencampur pellet dan <i>D. salina</i> pada saat <i>repelleting</i>                                     |
| 15. | Oven                               | Untuk membantu mengeringkan pellet   |
| 16. | Sectio Set                         | Untuk membantu membedah ikan   |
| 17. | Botol film                         | Untuk menyimpan organ setelah ikan dibedah   |
| 19. | Coolbox                            | Untuk menyimpan botol film yang berisi organ dalam waktu sementara dan sebagai wadah sementara pada saat transportasi ikan |
| 20. | Blender                            | Untuk menghaluskan pellet dan <i>D. salina</i>   |
| 22. | Mikroskop binokuler                | Untuk membantu melihat dan menganalisis hasil NFKB   |
| 23. | Freezer suhu $-80^{\circ}\text{C}$ | Untuk menyimpan isolat VNN   |
| 24. | Tissue prosesor                    | Sebagai wadah larutan alkohol bertingkat, <i>xylol</i> serta parafin pada proses dehidrasi dan <i>clearing</i>             |
| 25. | Slide drying                       | Untuk membantu mengeringkan slide setelah ditemplei potongan sediaan   |
| 26. | Pisau mikrotom                     | Untuk memotong sediaan jaringan yang telah diparafin   |
| 27. | Cassette                           | Sebagai tempat untuk meletakkan organ pada proses pembuatan sediaan NFKB   |
| 28. | Objek glass                        | Untuk meletakkan sediaan yang telah dipotong-potong  |

| No. | Alat                                | Fungsi  |
|-----|-------------------------------------|---|
| 29. | <i>Waterbath</i>                    | Sebagai wadah air panas yang berfungsi untuk melekatkan hasil potongan sediaan pada objek glass |
| 30. | Wax dispenser                       | Sebagai wadah parafin pada saat proses <i>blocking</i> .  |
| 31. | Sentrifus                           | Sebagai alat untuk menghomogenkan isolat virus.   |
| 32. | Chamber Pengecatan                  | Sebagai tempat dilakukannya pengecatan.   |
| 33. | <i>Cover glass</i>                  | Untuk menutup objek glass   |
| 34. | Sput                                | Sebagai alat untuk menyalurkan isolate ke <i>miliopore</i>                                      |
| 35. | Saringan <i>miliopore</i> no. 45 um | Sebagai alat untuk menyaring virus agar tidak tercampur dengan bakteri                          |

### 3.1.2 Bahan-bahan Penelitian

Bahan-bahan yang dipakai dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

| No  | Bahan                             | Fungsi   |
|-----|-----------------------------------|--|
| 1   | Ikan kerapu cantang ukuran 7-8 cm | Sebagai bahan yang diamati selama penelitian                                     |
| 2   | Air laut                          | Sebagai media hidup ikan kerapu cantang  |
| 3   | Kaporit                           | Sebagai bahan untuk mensterilisasi air, drum dan bak kontainer.                  |
| 4.  | Na-thiosulfat                     | Sebagai bahan untuk menetralkan kaporit  |
| 5.  | Alkohol 70%                       | Sebagai bahan untuk pengkondisian aseptis.                                       |
| 6.  | Tisu                              | Sebagai bahan untuk membersihkan alat-alat yang telah digunakan                  |
| 7.  | Tepung <i>D. salina</i>           | Sebagai bahan untuk perlakuan  |
| 8.  | Pellet <i>Stella</i> No. 2        | Sebagai pakan ikan dan bahan untuk <i>repelleting</i>                            |
| 9.  | Isolat VNN                        | Sebagai bahan untuk uji tantang.   |
| 10. | Tube                              | Sebagai wadah isolat VNN   |
| 11. | PBS                               | Untuk mempertahankan konsistensi pH pada isolat virus                            |
| 12. | Formalin 10%                      | Sebagai bahan untuk mengawetkan organ setelah dinekropsi                         |
| 13. | Sampel mata                       | Sebagai bahan yang akan diamati NFKB nya   |
| 14. | <i>Dry Ice</i>                    | Untuk membantu menurunkan suhu pada <i>coolbox</i> saat transportasi isolate VNN |
| 15. | Kertas label                      | Untuk memberi tanda perlakuan.   |
| 16. | Tepung kanji                      | Sebagai bahan perekat antara pellet dan tepung <i>D. salina</i>                  |
| 17. | Lem entelan                       | Sebagai perekat <i>cover glass</i> pada objek <i>glass</i>                       |
| 18. | pH paper                          | Sebagai pengukur pH air  |
| 19. | Hematoksilin                      | Untuk mengikat cat yang bersifat basa.   |
| 20. | Eosin                             | Untuk mengikat cat yang bersifat asam.   |

### **3.2 Metode Penelitian**

Metode penelitian yang digunakan yaitu metode deskriptif kuantitatif. Penelitian menggunakan metode deskriptif yaitu dengan mencari fakta dengan interpretasi yang tepat, mempelajari masalah dan proses yang sedang berlangsung dan pengaruhnya dari suatu fenomena atau kegiatan yang sedang kita jadikan variabel penelitian (Linarwati, *et al.*, 2016).

### **3.3 Teknik Pengumpulan Data**

Data adalah bahan keterangan dalam suatu objek penelitian yang diperoleh. Teknik pengumpulan data bertujuan untuk mendapatkan data sebagai bahan untuk menganalisa hasil penelitian. Penelitian ini menggunakan dua jenis dan sumber data yang digunakan yaitu data primer dan data sekunder.

#### **3.3.1 Data Primer**

Data primer adalah data yang diperoleh secara langsung melalui pencatatan hasil observasi, wawancara dan partisipasi aktif. Menurut Hasan (2002), data primer merupakan data yang diperoleh secara langsung di lapangan oleh orang yang melakukan penelitian. Data dapat diperoleh secara langsung setelah melakukan pengamatan dan pencatatan dari observasi, partisipasi aktif dan wawancara.

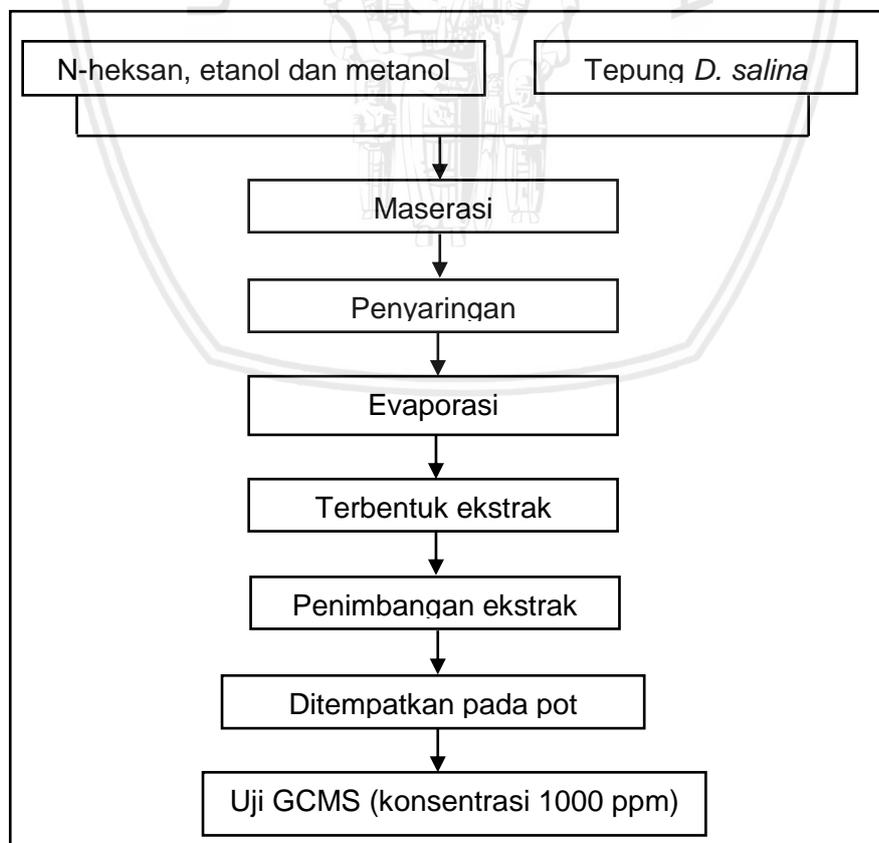
#### **3.3.2 Data Sekunder**

Data sekunder merupakan data atau informasi yang diperoleh secara tidak langsung dari obyek penelitian yang bersifat publik, yang terdiri atas: struktur organisasi dan kearsipan, dokumen, laporan-laporan serta buku-buku. Dengan kata lain data sekunder diperoleh penelitian secara tidak langsung, melalui perantara atau diperoleh dan dicatat dari pihak lain. Data sekunder pada penelitian ini digunakan untuk mendukung penemuan atau hasil dari penelitian (Purhantara, 2010).

### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan yaitu tahap awal dalam pembuatan ekstrak *D. salina* menggunakan tiga pelarut n-heksana, etanol, dan metanol. Maserasi dilakukan dengan merendam 30 gram tepung *D. salina* dan 150 ml untuk masing-masing pelarut selama 24 jam, setelah direndam, filtrat di saring dan pelarut n-heksan menghasilkan filtrat sebanyak 80 ml, etanol 120 ml dan metanol 130 ml. Hasil filtrat kemudian dilakukan evaporasi menggunakan rotator evaporator dengan suhu 50°C akan terbentuk ekstrak sebanyak 0,13 gram untuk n-heksan, 0,39 gram etanol dan 0,92 gram metanol. Hasil ekstrak selanjutnya diuji kandungannya menggunakan metode GCMS (*Gas Chromatography and Mass Spectroscopy*). Prosedur penelitian pendahuluan yang mengacu pada Agustini dan Kusmiati (2012), disajikan pada Gambar 6.

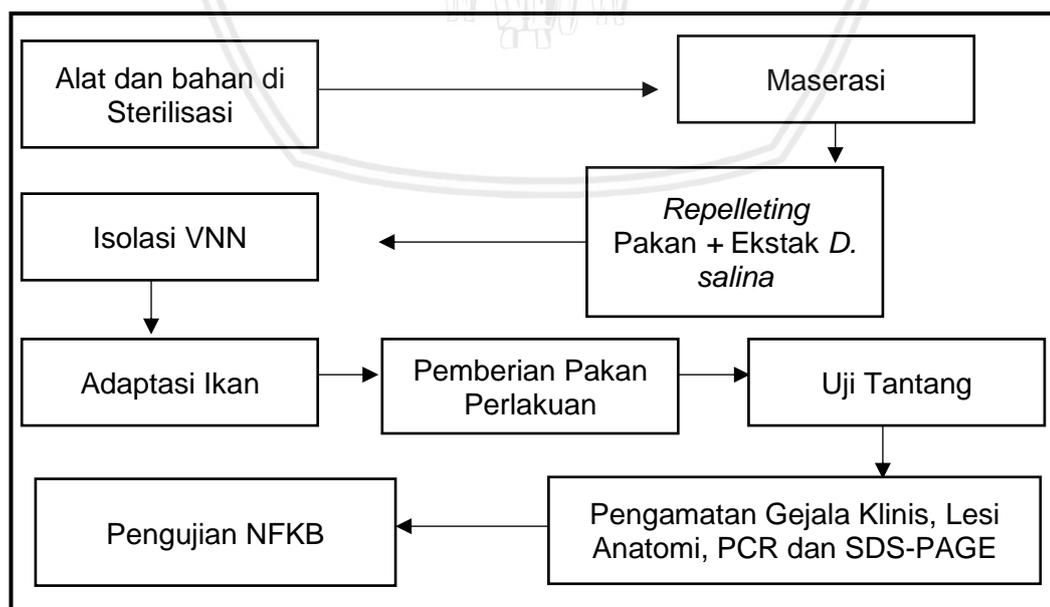


**Gambar 6.** Prosedur Penelitian Pendahuluan

Berdasarkan dari penelitian pendahuluan diperoleh pelarut yang terbaik yaitu n-heksan karena senyawa n-heksana mengandung *naphthaline*, fenol dan tetradekana (Yuwanita *et al.*, 2019 belum dipublikasikan). *Naphthaline* telah teridentifikasi sebagai senyawa antimikroba yang dapat untuk melawan patogen. Senyawa ini juga dapat digunakan untuk toksisitas akut, anti inflamasi dan anti analgesik (Rokade dan Sayyed, 2009), sedangkan senyawa fenol dapat digunakan dalam pencegahan penyakit yang melibatkan radikal bebas dengan mengurangi stres dan menghambat oksidasi makromolekul seperti yang di laporkan Pereira, *et al.* (2007). Senyawa *tetradekana* sebanyak 34,61% ditemukan sebagai antibakteri dalam *Spirulina platensis* yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji (Ozdemir, *et al.*, 2004).

### 3.4.2 Penelitian Utama

Penelitian utama yaitu tahap lanjutan dari hasil penelitian pendahuluan yang nantinya akan dicampur dengan pelet sebagai pakan ikan kerapu cantang guna mencegah infeksi VNN, lalu akan dilakukan uji NFKB yang mengacu pada Logan, *et al.*, (2007), prosedur penelitian utama disajikan pada Gambar 7.



**Gambar 7.** Prosedur Kerja Penelitian Utama

**a. Persiapan Alat dan Bahan**

Wadah pemeliharaan yang digunakan adalah bak kontainer sebanyak 5 buah dengan kapasitas air 16 liter. Bak kontainer sebelum digunakan di cuci terlebih dahulu dengan sabun kemudian direndam dengan kaporit 100 ppm selama 24 jam dan dinetralsisir dengan menggunakan *Na-Thiosulfat* 50 ppm. Bak kontainer dikeringkan selama 2 hari lalu siap untuk digunakan sebagai tempat pemeliharaan. Air pemeliharaan ikan sebanyak 16 liter untuk kepadatan 10 ekor dengan ukuran 7-9 cm. *Aerator set* dipasang pada bak kontainer untuk suplai oksigen.

**b. Sterilisasi Alat dan Bahan**

Alat-alat dicuci menggunakan sabun dan air mengalir kemudian dikeringkan dan dibungkus dengan koran, lalu disterilisasi menggunakan oven dengan suhu 167-177°C selama 1 jam. Bahan yang akan digunakan seperti akuades dimasukkan ke dalam botol *shot* dan dibungkus dengan alumunium foil. Bahan yang sudah dibungkus alumunium foil disterilisasi menggunakan *autoclave*. *Autoclave* di *setting* ke mode p2 yaitu suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Tekan tombol off dan buka klep penutup setelah alarm berbunyi.

**3.4.3 Maserasi**

Proses ekstraksi *D. salina* menggunakan metode maserasi dengan pelarut dari hasil terbaik uji GCMS yaitu n-heksana dengan perbandingan 1:5 (g/ml) (Agustini dan Kusmiati, 2012). Biomasa kering kemudian direndam selama 24 jam dengan kondisi gelap. Filtrat yang dihasilkan ditampung dan dikumpulkan kemudian di evaporasi menggunakan vakum rotaryvapor dengan suhu 50°C hingga filtratnya mengental. Ekstrak *D. salina* ditimbang sesuai dengan dosis yang telah ditentukan.

#### 3.4.4 Repeletting

*Repeletting* pakan dengan *D. salina* mengacu pada Yuwanita, *et al.* (2018), pakan buatan yang digunakan untuk *repeletting* adalah pelet dengan merek Stella No.2 dan tepung *D. salina*, keduanya ditimbang terlebih dahulu untuk menentukan dosis yang akan digunakan. Dosis tepung *D. salina* yang digunakan yaitu 250 mg, 300 mg, 350 mg dan 400 mg dalam 1 kilogram pakan. Pelet yang digunakan sebanyak 4 kg untuk 50 ekor ikan kerapu cantang. Pelet kemudian dihancurkan sampai halus dan disaring dengan saringan teh untuk mendapatkan tekstur yang lebih halus. Tepung *D. salina* ditambahkan ke dalam pelet yang sudah lembut dan ditambah tepung kanji sebagai bahan perekat sebesar 10 gram secara sedikit demi sedikit sambil diaduk-aduk. Bahan yang telah tercampur rata, pellet kemudian dicetak ulang dengan menggunakan cetakan manual agar tidak merusak kandungan bioaktif *D. salina*. Pelet yang telah di cetak, dikeringkan hingga benar-benar kering dan harus segera diberikan ke ikan atau disimpan di ruang kedap udara agar tidak mengurangi kandungan yang terdapat di *D. salina*.

#### 3.4.5 Isolasi Virus

VNN diisolasi dari organ otak atau mata ikan kerapu cantang yang terinfeksi VNN. Pembuatan inokulum virus menggunakan organ target VNN yaitu organ mata dan otak diambil kemudian digerus dan ditambahkan 200 ml larutan 10 mM *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,2. Fungsi dari PBS yaitu PBS merupakan cairan yang bersifat isotonic dan tidak toksik terhadap sel, dapat membantu mempertahankan pH dan dapat melarutkan substansi. Sampel yang sudah tercampur selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Supernatan kemudian disaring menggunakan membran filter ukuran 0,45 µm. Hasil isolasi kemudian disimpan untuk digunakan sebagai inokulum saat uji tantang (Jhonny, *et al.*, 2007).

### 3.4.6 Persiapan Ikan Penelitian

Ikan uji yang digunakan adalah ikan kerapu cantang yang diperoleh dari BPBAP Situbondo, Jawa Timur. Ikan kerapu cantang yang dipilih adalah ikan yang sehat sebanyak 50 ekor dengan ukuran 7-9 cm. Pemeliharaan menggunakan 5 bak kontainer dengan kepadatan 10 ekor/bak kontainer dan diberi aerasi. Empat bak kontainer digunakan sebagai wadah ikan yang diinfeksi VNN dan pemberian *D. salina* sesuai perlakuan, sedangkan satu bak kontainer digunakan sebagai kontrol negatif yaitu ikan kerapu cantang yang diinfeksi VNN tanpa pemberian *D. salina*. Ikan kemudian diadaptasi selama 7 hari agar ikan tidak *stress* saat dilakukan uji penelitian. Selama adaptasi ikan diberi pakan pelet merk *Stella* no 2 sebanyak 2 kali sehari yaitu pagi hari pukul 08.00 WIB dan sore hari pukul 16.00 WIB. Penyiponan dilakukan setiap pagi apabila air telah kotor karena feses dan sisa pakan yang mengedap di dasar jika dibiarkan akan menyebabkan meningkatnya kadar amonia. Apabila ikan sudah mampu adaptasi dan respon terhadap pakan maka ikan kerapu cantang siap untuk diberikan perlakuan.

## 3.5 Pelaksanaan Penelitian

### 3.5.1 Pemberian Pakan

Pelet hasil pencampuran dengan dosis *D. salina* yang sudah ditetapkan yaitu 250 mg, 300 mg, 350 mg dan 400 mg dalam 1 kilogram pakan diberikan pada ikan kerapu cantang dengan frekuensi pemberian pakan mengacu pada Yanuhar (2011), yaitu 2 kali sehari pada pagi hari pukul 08.00 WIB dan 15.00 WIB. Pemberian pakan dilakukan selama 10 hari sebelum dilakukan uji tantang VNN. Pakan diberikan secara *adlibitum* dengan *Feeding Rate* (FR) 5% (Arief, *et al.*, 2011) sebesar 7,5 gram/akuarium/hari dari berat biomassa 10 ekor ikan sebesar 150 gr/ekor.

### 3.5.2 Uji Tantang

Metode ujiantang yang digunakan pada penelitian ini dengan menyuntikkan berdasar Mahardika, *et al.* (2017), ujiantang dilakukan pada masing-masing 10 ekor ikan uji dengan menyuntikkan sebanyak 0,2 mL virus VNN/ekor ikan dengan konsentrasi  $10^4$  yang sebelumnya telah dibius dengan 100 ppm eugenol, selanjutnya ikan-ikan tersebut dipelihara dalam bak kontainer dengan pemberian aerasi.

### 3.5.3 Pengamatan Gejala Patologi Klinik

Pengamatan gejala klinis yang dilakukan yaitu selama 4 hari dengan interval waktu 12 jam yakni 12 jam, 24 jam, 36 jam, 48 jam, 60 jam, 72 jam, 84 jam dan 96 jam paska infeksi (*Lethal Dose*) (Yuwanita, *et al.*, 2018).

### 3.5.4 Pengamatan Lesi Anatomi

Pengamatan lesi anatomi yang mengacu pada prosedur Lestari dan Sudaryatma (2014), pengamatan dilakukan setelah ujiantang VNN ke ikan kerapu cantang pada waktu interval 96 jam pasca infeksi. Perubahan anatomi yang diamati meliputi insang, sirip, mulut dan organ bagian dalam tubuh ikan kerapu cantang. Pengamatan organ bagian dalam dilakukan dengan membedah tubuh ikan

### 3.5.5 Deteksi VNN dengan PCR

Uji PCR dilakukan untuk mengkonfirmasi ikan kerapu cantang positif terinfeksi VNN setelah dilakukan pengamatan gejala klinis dan lesi anatomi. Proses dari PCR berpedoman pada metode BPBAP Situbondo yaitu sebagai berikut:

1. RNA diekstraksi menggunakan RNA *Extraction Solution*
2. RNA di amplifikasi dalam reaksi RT-PCR menggunakan sepasang primer yaitu F2 (5'-CGT-GTC-AGT-CAT-GTC-TCG-CT-3') dan R3 (5'-CGA-GTC-AAC-ACG-GGT-GAA-GA-3') dengan reagen dari *GoTaq PCR Core*

*System (Promega)* (OIE, 2019). Pengaturan suhu pada *thermocycler* adalah transkripsi balik 48°C selama 45 menit, denaturasi awal 94°C selama 2 menit, amplifikasi pertama 95°C selama 40 detik, amplifikasi kedua 55°C selama 40 detik, amplifikasi ketiga 72°C selama 40 detik, ekstraksi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit dan *hold* dengan suhu 4°C yang dilakukan sebanyak 40 siklus.

3. Proses dilanjutkan dengan nested PCR menggunakan *GoTaq Green Master Mix*, sepasang primer yang digunakan yaitu NF2 (5'-GTT-CCC-TGT-ACA-ACG-ATT-CC-3') dan NR3 (5'-GGA-TTT-GAC-GGG-GCT-GCT-CA-3') (OIE, 2019). Pengaturan suhu pada *thermocycler* adalah denaturasi awal 94°C selama 2 menit, amplifikasi pertama 94°C selama 40 detik, amplifikasi kedua 50°C selama 40 detik, amplifikasi ketiga 72°C selama 40 detik, ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit dan *hold* dengan suhu 4°C yang dilakukan sebanyak 40 siklus.
4. Produk PCR dielektroforesis pada 1,5% *agarose gel* selama 30 menit dengan larutan TAE 1X sebanyak 500 mL dengan voltase 100-150 V
5. Proses setelah elektroforesis, dilakukan pewarnaan menggunakan larutan *Ethidium Bromide* (EtBr) 0,05% selama 10 menit.
6. Langkah terakhir yaitu pembacaan hasil menggunakan *UV Gel Documentation*. Hasil positif VNN apabila terlihat garis perpendaran pita DNA (*band*) dengan 294 bp (*nested*), apabila hasil negatif tidak terlihat garis perpendaran pita DNA.

### **3.5.6 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)**

Pembuatan ekstrak protein pada otak ikan kerapu cantang yang akan diuji SDS-PAGE yaitu dengan cara mengambil organ otak ikan, kemudian organ ditimbang berat dan dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali ulangan. Selanjutnya

organ dimasukkan ke dalam tube dan digerus hingga halus. Organ yang telah halus ditambahkan buffer ekstrak (PBS) dengan perbandingan 1:3 dan dihomogenkan. Setelah itu disentrifuse dengan kecepatan 11000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit. *Pellet* atau *whole cell* yang mengendap di dasar tube dibuang, kemudian supernatan diambil dan dimasukkan ke dalam tube untuk diuji SDS-Page (Ode, 2011).

Analisis protein menggunakan metode SDS-PAGE yang mengacu pada Yanuhar dan Khumaidi (2017), yaitu gel elektroforesis yang digunakan adalah gel sodium dodesil sulfat poliakrilamida dengan konsentrasi 12,5%. Analisis dilakukan dengan menambahkan buffer sampel ke dalam sampel protein (rasio 1: 1) dalam tabung eppendorf, dipanaskan pada suhu 100°C selama lima menit dalam 5 mm pelarut Tris HCl pada pH 6,8; 5% 2-merkaptto etanol; 2,5% w/v sodium dodesil sulfat, dan 10% v/v gliserol. Langkah selanjutnya sampel didinginkan dan disimpan pada suhu 20°C. Analisis dilakukan pada kecepatan konstan 20 mA selama 40-50 menit atau *tracking dye* 0,5 cm dari dasar gel, setelah itu sampel protein diwarnai dengan *commasie brilliant blue*. Langkah terakhir adalah destaining yang digunakan untuk menghilangkan *gel colorant* dan menekan *band protein*.

### 3.5.7 Pengambilan Organ Mata Ikan Kerapu Cantang

Ikan kerapu cantang yang telah mati diambil pada tahapan setelah injeksi VNN. Ikan diambil pada bagian organ mata, dibedah menggunakan pisau atau gunting yang tajam agar hasil yang didapatkan baik. Menurut Umasugi dan Burhanuddin (2015), pengambilan sampel dalam penelitian ini dilakukan dengan memeriksa tubuh bagian dalam dengan cara terlebih dahulu dilakukan pembedahan terhadap sampel ikan. Pembedahan dilakukan dengan menggunakan gunting/ pisau yang tajam agar hasil yang didapatkan baik. Setelah selesai dibedah, mata ikan diambil dan diamati. Organ mata kerapu cantang yang telah diambil ditempatkan pada wadah seperti *tube* dan diberi formalin 10 %.

Organ yang disimpan di dalam formalin akan mampu bertahan 2-3 hari untuk dilanjutkan ke proses selanjutnya.

### 3.5.8 Uji Ekspresi NFkB

Prosedur kerja NFkB mengacu pada Laboratorium Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Tujuan uji NFkB untuk mengetahui ada tidaknya infeksi virus VNN yang menyerang organ mata ikan kerapu cantang. Langkah kerja uji NFkB adalah sebagai berikut:

- Organ mata ikan kerapu cantang difiksasi dengan formalin 10%.
- Mata yang telah difiksasi dipotong sempurna dengan ketebalan 2-3 mm.
- Potongan organ tersebut dimasukkan dalam kaset yang dilabel dan ditutup.
- Dilakukan proses dehidrasi, pembersihan (*clearing*), pembersihan (*impregnasi/embedding*) lalu didinginkan pada lempeng pendingin.
- Pemotongan (*sectioning*) dengan mikrotom, hasil pemotongan berupa pita tipis.
- Dimasukkan ke dalam *waterbath* berisi air hangat lalu diambil dengan *object glass* yang diolesi *albumin gliserin*.
- Dilakukan inkubasi *over night* (semalam) di inkubator dan dilakukan tahapan pewarnaan (*staining*).
- Prosedur pewarnaan diawali dengan memanaskan sediaan yang dilekatkan pada *object glass* yang tercoating *Poly L-Lysine* dalam inkubator suhu 80 °C selama 1 jam
- *Deparafinasi* dengan *xilol* I, II III masing-masing 15 menit. Slide dimasukkan ke dalam *ethanol absolut*, alkohol 90%, 80% masing-masing 15 menit.
- Direndam akuades selama 15 menit.
- Sampel dimasukkan dalam H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,6% dalam *methanol* selama 20 menit.
- Sampel dilakukan antigen retrieval dengan cara direndam dan dipanaskan dalam *Decloaking Chamber*, selanjutnya didinginkan pada suhu ruang 30 menit dan dibilas dengan akuades.

- Sampel direndam dalam *Phosphat Buffer Saline* selama 15 menit.
- Slide ditetesi anti bodi primer dan diinkubasi selama semalam atau *overnight*, setelah itu dicuci dengan *Phosphat Buffer Saline* selama 15 menit.
- Slide ditetesi *Simple Stain Max PO* dan diinkubasi selama 1 jam.
- Slide ditetesi DAB dan diinkubasi 10 menit (1 ml *Betazoid Dab Substrate Buffer* ditambah 1 – 2 tetes *DAB Chromogen*), kemudian dicuci dengan air mengalir 5 – 7 menit. Selanjutnya di counterstain dengan mayer *haematoxilin* 2 – 3 menit.
- Slide di rendam dalam *Lithum Carbonat* jenuh 3 menit.
- Slide dicuci dengan air mengalir 5-7 menit.
- Slide didehidrasi dengan alkohol 80%, 96%, alkohol absolut sampai dengan *xylol* I, II, III masing-masing 15 menit, dilanjutkan proses *mounting*.
- *Mounting* yaitu dengan entellan lalu dilanjutkan dengan pengamatan langsung melalui mikroskop.

### **3.6 Parameter Uji**

#### **3.6.1 Parameter Utama**

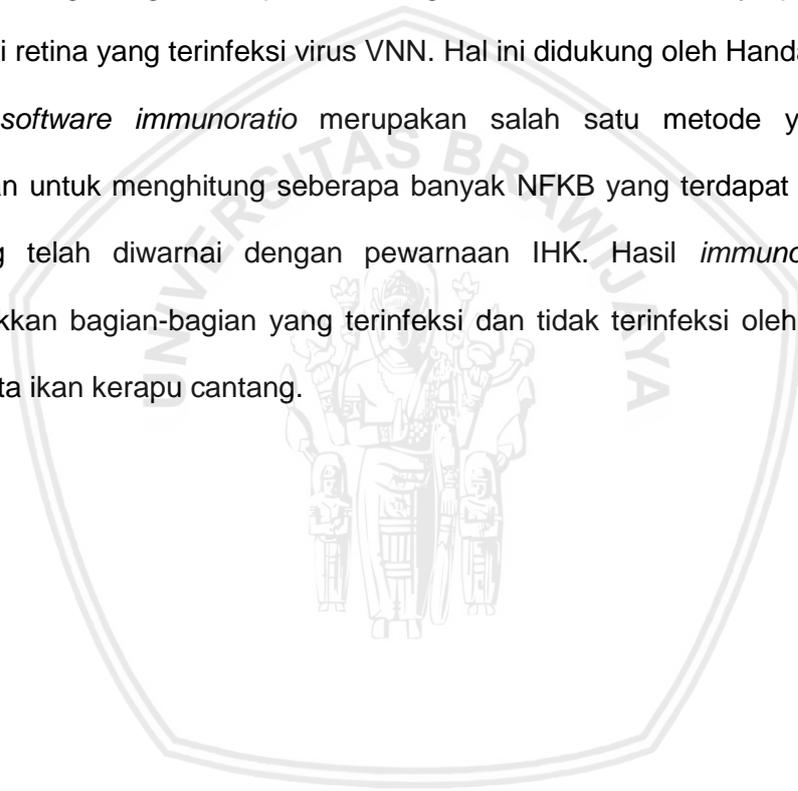
Parameter utama pada penelitian ini adalah uji NFKB pada mata ikan kerapu cantang, uji PCR, Uji SDS-PAGE, pengamatan gejala klinis patologis, lesi anatomi dan SR (*Survival Rate*). Pengamatan NFKB dilakukan dengan membandingkan ikan kerapu cantang yang telah diberikan perlakuan *D. salina*. Uji NFKB dilakukan untuk mengetahui respon dalam inflamasi dan proliferasi ikan kerapu cantang. Pengamatan NFKB juga di lihat dari metode *immunoratio* untuk mengetahui seberapa besar infeksi dari virus VNN.

#### **3.6.2 Parameter Penunjang**

Parameter penunjang yang diamati dalam penelitian ini meliputi kualitas air pada bak kontainer penelitian meliputi suhu, pH, oksigen terlarut, salinitas.

### 3.7 Analisis Data

Data yang telah didapatkan dianalisa dengan menggunakan metode deskriptif kuantitatif. Metode deskriptif kuantitatif yaitu suatu cara yang digunakan untuk mengumpulkan informasi suatu kejadian atau variabel dengan apa adanya (Alwan, *et al.* 2017). Hasil NFKB yang telah didapatkan berdasarkan setiap perlakuan dilanjutkan dengan menggunakan metode *immunoratio*, dimana metode ini dapat menghitung seberapa besar bagian dari mata khususnya pada bagian lapisan di retina yang terinfeksi virus VNN. Hal ini didukung oleh Handayani, *et al.* (2018), *software immunoratio* merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk menghitung seberapa banyak NFKB yang terdapat dalam satu sel yang telah diwarnai dengan pewarnaan IHK. Hasil *immunoratio* akan menunjukkan bagian-bagian yang terinfeksi dan tidak terinfeksi oleh virus VNN pada mata ikan kerapu cantang.



## 4. PEMBAHASAN

### 4.1 Parameter Utama

#### 4.1.1 Gejala Patologi Klinik

Gejala klinis merupakan suatu indikasi yang menunjukkan ikan terjangkit penyakit. Begitu juga halnya dengan ciri-ciri ikan yang terserang VNN dapat dilihat berdasarkan gejala klinisnya. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan didapatkan pengamatan hasil gejala klinis patologis pada ikan kerapu cantang pasca infeksi VNN yang disajikan pada Tabel 2, sedangkan ciri-ciri dan kondisi gejala klinis ikan kerapu cantang pasca diinfeksi VNN disajikan pada Gambar 8.

**Tabel 2.** Gejala Klinis Patologis Pasca Infeksi VNN

| Waktu Pengamatan (Jam) | Dosis (mg/kg) | Gejala Klinis |                                  |               |
|------------------------|---------------|---------------|----------------------------------|---------------|
|                        |               | Nafsu Makan   | Tingkah Laku                     | Warna Tubuh   |
| 12                     | 0             | Normal        | Berenang aktif                   | Normal        |
|                        | 250           | Normal        | Berenang aktif                   | Normal        |
|                        | 300           | Normal        | Berenang aktif                   | Normal        |
|                        | 350           | Normal        | Berenang aktif                   | Normal        |
|                        | 400           | Normal        | Berenang aktif                   | Normal        |
| 24                     | 0             | Normal        | Berenang aktif                   | Normal        |
|                        | 250           | Normal        | Berenang aktif                   | Normal        |
|                        | 300           | Normal        | Berenang aktif                   | Normal        |
|                        | 350           | Normal        | Berenang aktif                   | Normal        |
|                        | 400           | Normal        | Berenang aktif                   | Normal        |
| 36                     | 0             | Normal        | Berenang aktif                   | Normal        |
|                        | 250           | Normal        | Berenang aktif                   | Normal        |
|                        | 300           | Normal        | Berenang aktif                   | Normal        |
|                        | 350           | Normal        | Berenang aktif                   | Normal        |
|                        | 400           | Normal        | Berenang aktif                   | Normal        |
| 48                     | 0             | Menurun       | Berenang pasif                   | 50% menghitam |
|                        | 250           | Menurun       | Berenang pasif                   | Normal        |
|                        | 300           | Menurun       | Berenang pasif                   | Normal        |
|                        | 350           | Normal        | Berenang aktif                   | Normal        |
|                        | 400           | Normal        | Berenang aktif                   | Normal        |
| 60                     | 0             | Menurun       | Berenang pasif                   | 50% menghitam |
|                        | 250           | Menurun       | Berenang pasif, berdiam di dasar | 50% menghitam |
|                        | 300           | Menurun       | Berenang pasif, beberapa miring  | Normal        |

| Waktu Pengamatan | Dosis | Gejala Klinis |  |               |
|------------------|-------|---------------|--|---------------|
|                  |       | Nasfu makan   | Tingkah Laku   | Warna Tubuh   |
| 72               | 350   | Normal        | Berenang pasif                                       | Normal        |
|                  | 400   | Normal        | Berenang aktif, beberapa berdiam di dasar            | Normal        |
|                  | 0     | Menurun       | Berenang pasif dengan tubuh miring                   | 50% menghitam |
|                  | 250   | Menurun       | Berenang pasif, berdiam di dasar dengan tubuh miring | 50% menghitam |
|                  | 300   | Menurun       | Berenang pasif, beberapa miring                      | 50% menghitam |
|                  | 350   | Menurun       | Berenang pasif, berdiam di dasar                     | 50% menghitam |
| 84               | 400   | Normal        | Berenang aktif, beberapa berdiam di dasar            | 50% menghitam |
|                  | 0     | Menurun       | Mayoritas berdiam di dasar dengan tubuh miring       | 50% menghitam |
|                  | 250   | Menurun       | Mayoritas berenang pasif dengan tubuh miring         | 50% menghitam |
|                  | 300   | Menurun       | Mayoritas berenang pasif dengan tubuh miring         | 50% menghitam |
|                  | 350   | Menurun       | Mayoritas berenang pasif dan berdiam di dasar        | 50% menghitam |
|                  | 400   | Menurun       | Mayoritas berenang pasif, beberapa berdiam di dasar  | 50% menghitam |

Berdasarkan tabel diatas dapat diketahui bahwa setiap perlakuan pada interval waktu pengamatan 12 jam menunjukkan gejala yang berbeda-beda. Gejala klinis 12 jam pasca infeksi pada semua perlakuan menunjukkan nafsu makan, gerakan tubuh dan warna tubuh ikan kerapu cantang yang terlihat normal. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Nguyen, *et al.* (1996), pasca infeksi VNN 12 jam belum menunjukkan tanda atau gejala VNN. Ikan yang diinfeksi VNN masih

terlihat gesit dengan nafsu makan yang tinggi. Ikan akan terlihat gejala ketika memasuki 48-72 jam setelah infeksi VNN.

Pengamatan gejala klinis 24-36 jam pasca infeksi, menunjukkan nafsu makan ikan kerapu cantang normal dan gerakan aktif dengan warna tubuh normal pada semua perlakuannya, walaupun belum terdapat tanda-tanda gejala akibat penyuntikan VNN. Hal ini sesuai dengan pendapat Roza, *et al.* (2006), ikan kerapu pasca infeksi VNN 1-2 hari belum menunjukkan tanda-tanda VNN. Ikan kerapu masih terlihat aktif dalam pergerakannya, dan nafsu makan ikan juga belum mengalami penurunan.

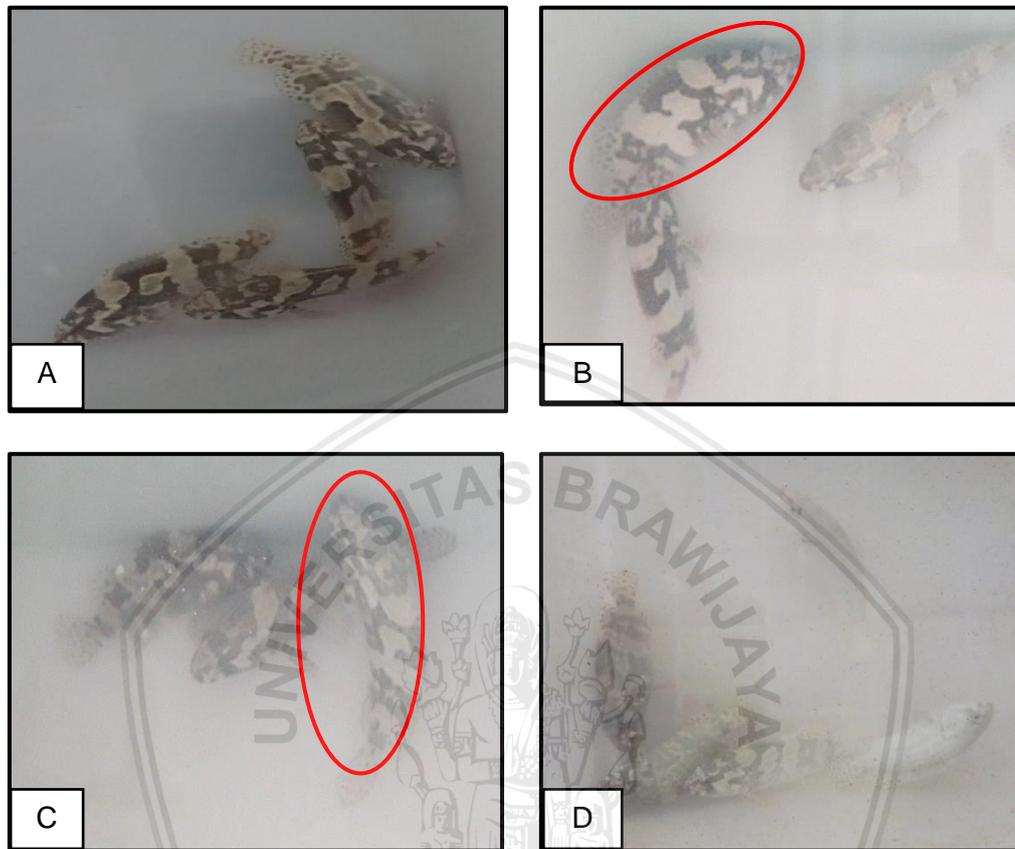
Pengamatan 48-60 jam pasca infeksi mulai menunjukkan gejala yang berbeda dari sebelumnya yaitu pada dosis 0 mg/kg, 250 mg/kg dan 300 mg/kg mengalami penurunan nafsu makan, gerakan berenang yang pasif dan beberapa ikan kerapu cantang berdiam di dasar serta warna tubuh yang menggelap (Gambar 8a), sedangkan pada dosis 350 mg/kg dan 400 mg/kg nafsu makan, gerakan berenang dan warna tubuh masih dalam keadaan normal. Hal ini sesuai dengan pendapat Sembiring, *et al.* (2018), ikan kerapu yang diinfeksi VNN akan mengalami penurunan nafsu makan ketika 2-3 hari pasca infeksi. Perilaku renang dari ikan mengalami perubahan, gerakan ikan terlihat tidak stabil dengan berenang ke bagian dasar.

Gejala yang terdapat pada ikan kerapu cantang 72-84 jam pasca infeksi hampir menunjukkan tingkah laku yang sama di semua perlakuan, kecuali dosis 400 mg/kg. Pada dosis 0, 250, 300 dan 350 mg/kg, ikan kerapu cantang terus mengalami penurunan nafsu makan, gerakan yang pasif dan mayoritas berdiam di dasar dengan tubuh miring (Gambar 8b) dan 50% dari total ikan kerapu cantang berwarna gelap, sedangkan dosis 400 mg/kg pada 72 jam pasca infeksi masih menunjukkan nafsu makan yang normal, walaupun beberapa ikan kerapu cantang

ada yang berdiam diri di dasar dan tubuh mulai menggelap. Dosis 400 mg/kg baru menunjukkan penurunan nafsu makan dan tingkah laku pada 84 jam pasca infeksi. Hal ini sesuai dengan pendapat Yuwanita, *et al.* (2018), gejala klinis yang terlihat dari ikan kerapu cantang pasca infeksi 72-84 jam yaitu nafsu makan ikan menurun drastis dengan melihat respon ikan ketika diberikan pakan. Ikan kerapu cantang terlihat bergerombol didasar perairan dengan pola berenang yang miring. Ikan kerapu beberapa ditemukan dengan ciri warna tubuh yang mulai menghitam dan beberapa berwarna pucat. Pada perlakuan dosis 400 mg/kg menunjukkan beberapa ikan kerapu masih terlihat dengan pergerakan yang normal. Hal ini sesuai dengan pendapat Saparuddin, *et al.* (2017), *D. salina* dapat menghambat replikasi virus VNN. Penghambatan terjadi karena *D. salina* mengandung senyawa antivirus seperti fenol dan flavonoid yang mampu mengurangi jumlah sel yang terinfeksi dan jumlah dari VNN.

Pengamatan gejala klinis 96 jam - 108 jam pasca infeksi telah menimbulkan kematian pada ikan kerapu cantang. Beberapa ikan kerapu cantang yang masih hidup pada pengamatan ini bila diberi gerakan refleks, sudah tidak memberikan perlawanan yang gesit seperti saat keadaan normal hal ini dikarenakan infeksi VNN telah mempengaruhi sistem keseimbangan ikan kerapu cantang. Selain itu, nafsu makan terus menurun dan ikan kerapu cantang lebih sering berdiam diri di dasar (Gambar 8c). Hal ini sesuai dengan pendapat Novriadi, *et al.* (2014), ikan kerapu cantang yang terinfeksi VNN dapat dilihat dari perilaku berenang yang tidak normal (berenang miring), nafsu makan ikan menurun, warna tubuh mengalami perubahan yang lebih gelap (menghitam). Hal ini diperkuat oleh pendapat Yuasa, *et al.* (2001), yang menjelaskan bahwa VNN dapat menyerang sistem organ

bagian saraf mata dan otak yang menyebabkan tingkah laku ikan tidak normal dan umumnya hanya berdiam diri di dasar.

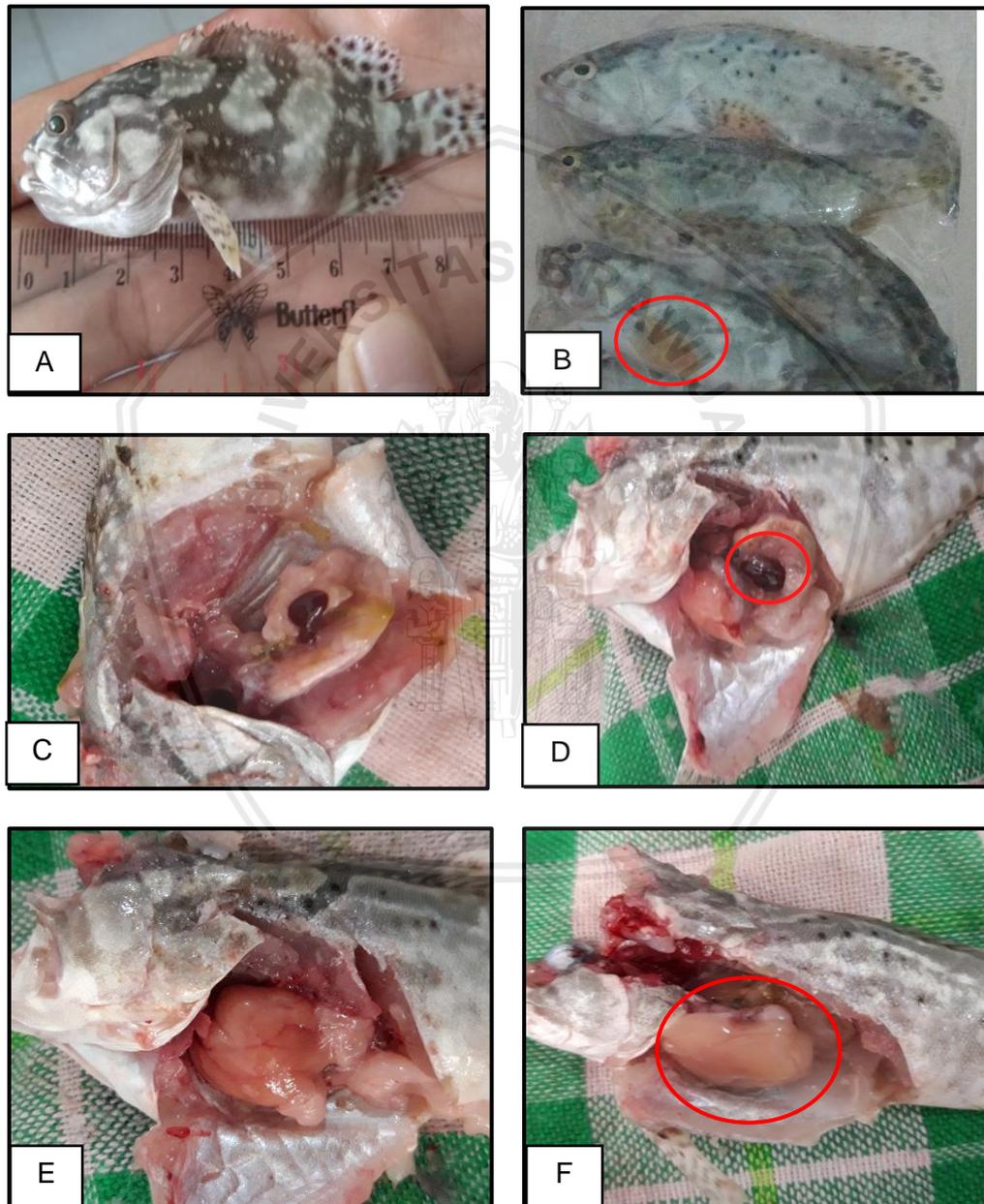


**Gambar 8.** Gejala Klinis Patologis Ikan Kerapu Cantang Pasca Infeksi VNN. Keterangan: (A) Ikan Kerapu Cantang Normal, (B) Warna Tubuh Ikan Menggelap, (C) Ikan Berenang Miring dan (D) Ikan Berdiam di Dasar Bak (Dokumentasi Pribadi, 2019)

#### 4.1.2 Lesi Anatomi

Lesi anatomi merupakan salah satu parameter yang digunakan untuk mendeteksi infeksi dari VNN. Lesi anatomi yang diamati yaitu 96 jam pasca infeksi. Berdasarkan hasil pembedahan, ikan kerapu cantang menunjukkan kondisi sirip pectoral pucat, limpa yang membengkak dan warna hati memucat. Perubahan organ internal tersebut, sesuai pernyataan Gilda dan Leobert (2011), hati dan limpa akan rusak, jika ditemukannya viremia pada ikan yang positif terinfeksi VNN. Menurut Lestari dan Sudaryatma (2014), limpa ikan yang terserang VNN akan membengkak karena pada organ tersebut mendapatkan aliran darah langsung

dari jantung dan pembuluh darah balik dari otak. Darah dari jantung dan pembuluh darah mengandung bahan genetik replikasi dari virus VNN yang dapat menyebar melalui aliran darah. Hal tersebut mengakibatkan terjadinya pembengkakan pada organ internal terutama hati dan limpa yang dilewati oleh aliran darah. Kondisi lesi anatomi ikan kerapu cantang 96 jam pasca infeksi VNN disajikan pada Gambar 9.



**Gambar 9.** Lesi Anatomi Ikan Kerapu Cantang 96 Jam Pasca Infeksi. Keterangan: (A) Sirip Normal, (B) Sirip Pektoral Memerah, (C) Limpa Normal, (D) Limpa Membengkak, (E) Hati Normal dan (F) Hati Memucat

#### 4.1.3 SR (*Survival Rate*)

*Survival Rate* (SR) merupakan tingkat kelulushidupan ikan mulai awal pemeliharaan sampai akhir pemeliharaan. Data SR akan menunjukkan seberapa besar pengaruh *D. salina* terhadap penghambatan virus VNN. Data SR yang didapatkan pada 5 bak perlakuan selama penelitian disajikan pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Data SR (*Survival Rate*)

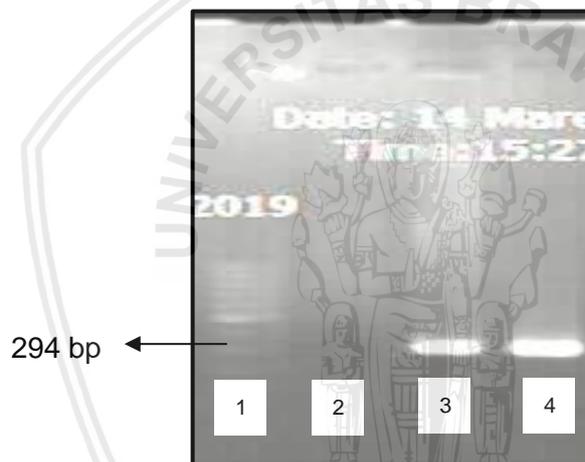
| Dosis (mg/kg pakan) | Jumlah Awal (Ekor) | Jumlah Akhir pada 108 jam (Ekor) | SR (%) |
|---------------------|--------------------|----------------------------------|--------|
| 0                   | 10                 | 3                                | 30     |
| 250                 | 10                 | 4                                | 40     |
| 300                 | 10                 | 4                                | 40     |
| 350                 | 10                 | 5                                | 50     |
| 400                 | 10                 | 6                                | 60     |

Dari tabel diatas dapat diketahui bahwa penggunaan ekstrak *D. salina* dapat meningkatkan nilai SR. Dosis ekstrak *D. salina* yang digunakan semakin banyak akan meningkatkan juga nilai SR. Nilai SR yang terbaik didapatkan pada dosis ekstrak *D. salina* 400 mg/kg dengan nilai SR yaitu 60%. Nilai SR yang semakin meningkat ini diakibatkan karena pengaruh *D. salina* yang dapat menghambat pertumbuhan dari virus VNN. Beberapa kandungan *D. salina* yang mampu untuk menghambat dari pertumbuhan virus VNN yaitu senyawa fenol, yang mana setelah dilakukan uji GCMS diketahui bahwa ekstrak *D. salina* mengandung senyawa fenol (Yuwanita *et al.*, 2019 belum dipublikasikan). Hal ini sesuai dengan pendapat Rijayanti, *et al.* (2014), fenol merupakan salah satu senyawa yang dapat digunakan sebagai antivirus maupun antibakteri. Mekanisme antivirus maupun antibakteri pada senyawa fenol dalam membunuh mikroorganisme (virus VNN) yaitu dengan mendenaturasi protein sel. Ikatan hidrogen yang terbentuk antara fenol dan protein mengakibatkan struktur protein akan menjadi rusak. Ikatan hidrogen tersebut akan mempengaruhi permeabilitas

dinding sel dan membran sitoplasma sebab keduanya tersusun atas protein. Permeabilitas dinding sel dan membran sitoplasma yang terganggu dapat menyebabkan ketidakseimbangan makromolekul dan ion dalam sel, sehingga sel menjadi lisis.

#### 4.1.4 Uji PCR

Data yang digunakan untuk memperkuat suatu ikan kerapu cantang selain menggunakan gejala klinis patologis dan lesi anatomi yaitu menggunakan uji PCR. Hasil elektroforesis PCR pada ikan kerapu cantang pasca diinfeksi VNN disajikan pada Gambar 10 seperti berikut.



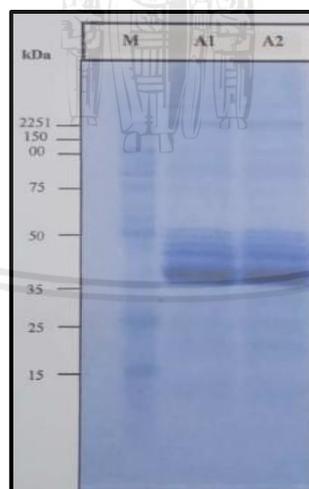
**Gambar 10.** Hasil Elektroforesis Ikan Kerapu Cantang Positif VNN. Keterangan: 1. Marker, 2. Kontrol Positif, 3. Kontrol negatif, 4. Sampel 1 Positif VNN

Berdasarkan gambar di atas, hasil uji PCR yang dilakukan di BPBAP Situbondo yang dimulai dari fragmen 100 *base pair* (bp) menunjukkan hasil positif (+) VNN, hal ini dapat dilihat dari adanya *band* yang sejajar dengan ukuran marker yang digunakan yakni pada kontrol negatif VNN dan sampel ikan yang terinfeksi VNN. Marker yang digunakan berukuran 294 bp, sementara pada kontrol positif VNN di line 2 tidak ditemukan adanya *band* yang sejajar dengan marker 294 bp, hal ini menunjukkan uji PCR yang dilakukan akurat karena tidak terkontaminasi ketika sedang melakukan prosedur pengujian PCR. Hal ini sesuai dengan

pendapat Helmi, *et al.* (2014), metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi virus secara akurat yakni menggunakan uji PCR. PCR merupakan metode yang dapat digunakan dalam penentuan kandungan materi genetik baik DNA maupun RNA. Hasil PCR yang positif terinfeksi VNN ini sesuai dengan hasil gejala klinis patologi dan lesi anatomi yang menunjukkan tanda tanda VNN setelah dilakukan penyuntikkan virus VNN ke tubuh ikan kerapu cantang. Hasil PCR yang aktif akan ditunjukkan dengan adanya pita yang berpendar. Semakin tebal pita yang berpendar menunjukkan infeksi virus VNN semakin banyak juga.

#### 4.1.5 Uji SDS-PAGE

Uji SDS-PAGE merupakan salah satu metode yang digunakan untuk mengetahui Berat Molekul (BM) dengan memisahkan protein muatannya. Tujuan dari uji SDS-PAGE yaitu untuk memastikan adanya virus VNN pada ikan kerapu cantang yang diuji dilihat dari BM nya. Hasil Uji SDS-PAGE disajikan pada Gambar 11.



**Gambar 11.** Hasil Analisa SDS-PAGE, Keterangan: A1 (otak), A2 (mata)

Konsentrasi protein sampel VNN yang didapatkan yaitu sebesar 15,56 mg/ml. Uji SDS-PAGE menggunakan *separating gel* 15 % dan *stacking gel* 3 % yang diwarnai dengan menggunakan *Commassie Brilliant Blue* (CBB). Menurut Atma (2018), *Stacking gels* memiliki fungsi sebagai media pada protein yang telah

terdenaturasi dan masuk ke dalam *separating gel*. *Separating gel* yang mempunyai pori lebih kecil akan memisahkan protein berdasarkan ukuran. Denaturasi protein pada proses pemanasan tidak mengubah jumlah panjang dan susunan asam amino dari protein itu.

Pita (*band*) yang didapat dari hasil SDS-PAGE menunjukkan pita yang tebal karena dipengaruhi oleh konsentrasi dari protein sampel VNN. Hal ini sesuai dengan pendapat Rachmania, *et al.* (2017), bahwa tebal tipisnya pita protein yang terbentuk pada hasil SDS-PAGE menunjukkan kandungan atau banyaknya protein yang mempunyai BM yang sama, yang berada pada posisi pita yang sama..

Data dari hasil SDS-PAGE yang telah disajikan dapat diketahui BM protein pada marker terdapat 8 *bands* yang diawali dari 15 kDa, 25 kDa, 35 kDa, 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 150 kDa dan 225 kDa. Marker merupakan protein standar yang telah diketahui BM-nya melalui perbandingan nilai mobilitas relatif (*Rf*) yang berfungsi untuk membandingkan BM pada sampel VNN. Perpendaran yang terlihat pada gambar antara marker dan sampel VNN terjadi pada BM 35 kDa sampai 50 kDa. Nilai BM yang didapatkan pada sampel VNN A2 (mata) didapatkan BM yaitu 37,31 kDa, 42,8 kDa, 44,80 kDa, 47,55 kDa dan 50 kDa. Hal ini sesuai dengan pendapat Yanuhar, *et al.* (2012), bahwa protein yang berperan dalam melekatnya virus VNN pada reseptor inang adalah mantel protein (bagian terluar) dengan BM VNN berkisar antara 37,18 kDa dan 42 kDa. Proses infeksi virus VNN selalu dimulai dengan melekatnya protein pada patogen terhadap inangnya (*host*). Hal ini yang menyebabkan tidak semua bagian organ dapat terinfeksi oleh patogen, hanya bagian target khusus yang merupakan bagian masuknya patogen ke dalam tubuh inang (bagian mata dan otak ikan kerapu cantang).

#### **4.1.6 Uji NFKB**

##### **a. Hasil Ekspresi NFKB**

Uji ekspresi NFKB merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi suatu sel terinfeksi virus. Ekspresi NFKB yang terinfeksi virus

akan menunjukkan warna coklat, sedangkan yang tidak terinfeksi akan berwarna ungu (Gambar 12). Semakin banyak warna coklat yang didapat, menunjukkan seberapa besar infeksi virus pada ikan kerapu cantang. Bagian yang akan dilihat ekspresi NFkB yaitu pada bagian retina mata ikan kerapu cantang. Persentase ekspresi di retina mata melalui uji NFkB disajikan pada Tabel 4.

**Tabel 4.** Hasil Ekspresi NFkB

| Dosis (mg/kg) | Ekspresi (%) |
|---------------|--------------|
| 0             | 63,5         |
| 250           | 62,0         |
| 300           | 59,2         |
| 350           | 58,8         |
| 400           | 50,4         |
| Ikan Normal   | 25,3         |

Berdasarkan hasil uji NFkB yang telah dilakukan, dapat diperoleh hasil bahwa perlakuan dosis ekstrak *D. salina* 400 mg/kg merupakan perlakuan yang paling sedikit terinfeksi virus VNN dengan persentase ekspresi NFkB yaitu 50,4%. Ekspresi NFkB juga ditemukan pada ikan kerapu cantang yang normal, NFkB yang didapatkan pada ikan normal sebesar 25,3%. Hal ini sesuai dengan pendapat Barnes dan Karin (1997), bahwa NFkB yang terdapat pada ikan normal merupakan NFkB yang belum teraktifasi oleh virus (bagian sitoplasma). NFkB akan teraktifasi apabila I $\kappa$ B $\alpha$  (protein penghambat aktivasi NFkB) mengalami degradasi yang menyebabkan p50 dan p65 bebas. P50 dan p65 yang bebas selanjutnya akan menuju ke nukleus (inti sel). Bagian inti sel (nukleus) terdapat bagian *inflammatory gen* dimana terdapat mRNA yang berfungsi untuk membantu menerjemahkan p50 dan p65 dan proses selanjutnya yaitu ke bagian *inflammatory proteins*. P50 dan p65 merupakan protein yang mempengaruhi respon imun yang dibutuhkan dalam tubuh dengan bantuan penerjemahan dari mRNA.

Pada perlakuan dosis 0 mg/kg pakan ditemukan infeksi yang terbanyak dengan 63,5%, hal ini dikarenakan pada dosis 0 mg/kg hanya diinfeksi VNN tanpa

adanya pemberian *D. salina*. Ikan tanpa adanya perlakuan akan lebih mudah terinfeksi karena tidak adanya sistem imun tambahan yang distimulasi oleh *D. salina*. Hal ini sesuai dengan pendapat Kopp dan Ghosh (1995), NFKB akan aktif apabila terjadi suatu infeksi dari virus maupun bakteri. NFKB yang aktif akan menstimulasi respon imun pada tubuh untuk bekerja terhadap virus yang masuk ke dalam tubuh. Aktivasi NFKB berlangsung dengan cepat, semakin banyak jumlah NFKB yang ditemukan menunjukkan besarnya suatu infeksi yang masuk ke dalam tubuh ikan.

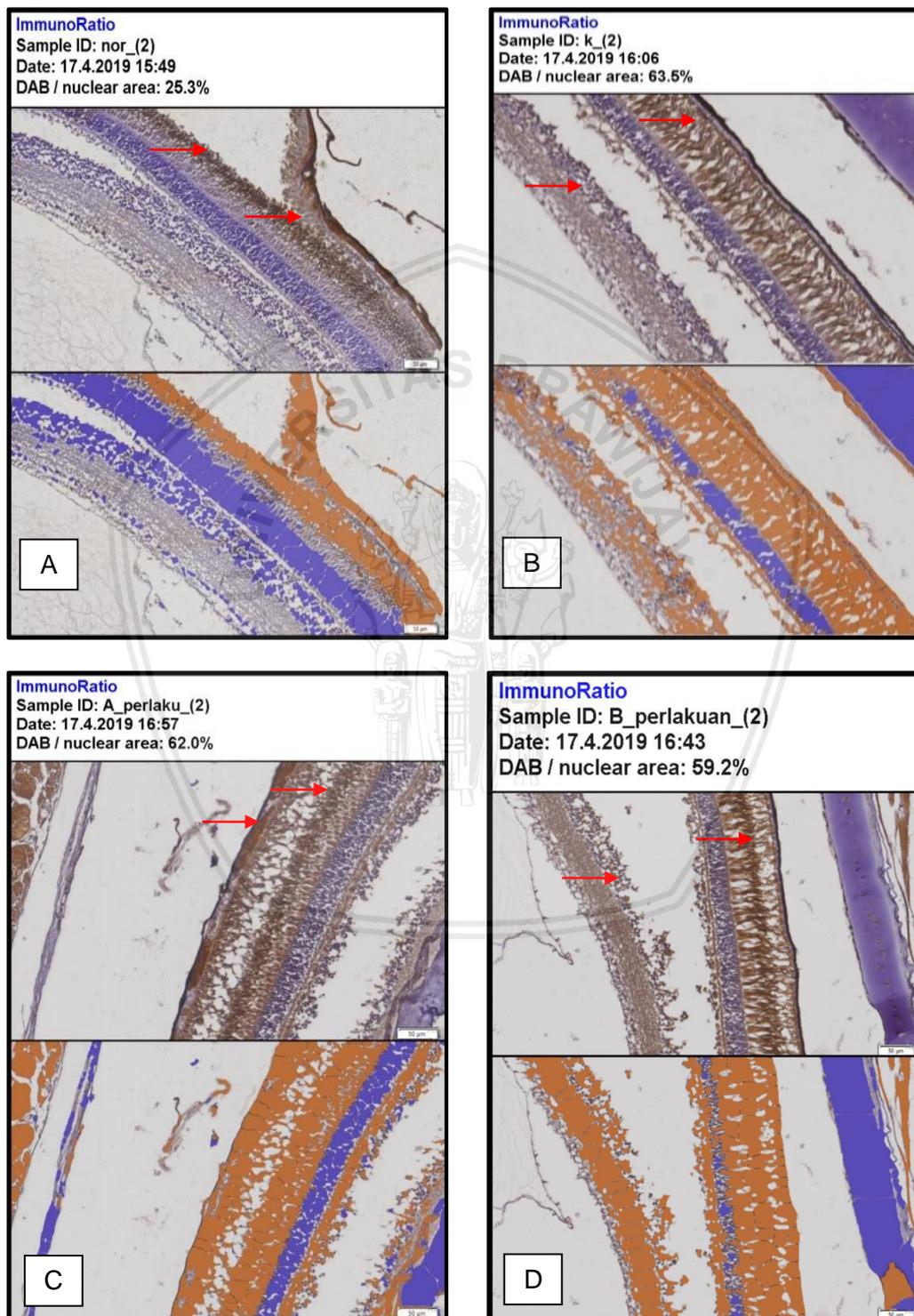
Pemberian *D. salina* dengan dosis 250 mg/kg pakan masih banyak terdapat infeksi virus VNN dengan persentase ekspresi NFKB sebesar 62,0%. Perlakuan dengan dosis 250 mg/kg tidak terjadi perubahan yang terlalu signifikan dibandingkan dengan perlakuan dosis 0 mg/kg, hal ini mengindikasikan dosis pemberian *D. salina* yang diberikan jumlahnya terlalu sedikit. Sistem pertahanan tubuh ikan kerapu cantang masih belum dapat menghambat virus VNN yang menginfeksi ikan kerapu cantang. Perlakuan *D. salina* dengan dosis 300 mg/kg pakan mulai terlihat adanya penurunan jumlah infeksi pada ikan kerapu cantang yaitu sebesar 59,2%. Hal ini menunjukkan *D. salina* yang telah diberikan pada ikan kerapu cantang mulai dapat menghambat dari infeksi virus yang masuk ke dalam tubuh. Perlakuan *D. salina* dengan dosis 350 mg/kg pakan, infeksi dari virus VNN terhadap ikan kerapu cantang terjadi penurunan persentase lagi, pada perlakuan dosis 350 mg/kg pakan didapatkan persentase ekspresi NFKB yaitu 58,8%. Pemberian dosis *D. salina* yang semakin ditingkatkan akan semakin mengurangi persentase virus VNN yang masuk ke dalam tubuh ikan kerapu cantang. Dosis *D. salina* untuk menghambat VNN terbaik dilihat berdasarkan hasil NFKB ditunjukkan pada perlakuan dosis 400 mg/kg pakan dengan persentase ekspresi NFKB 50,4%.

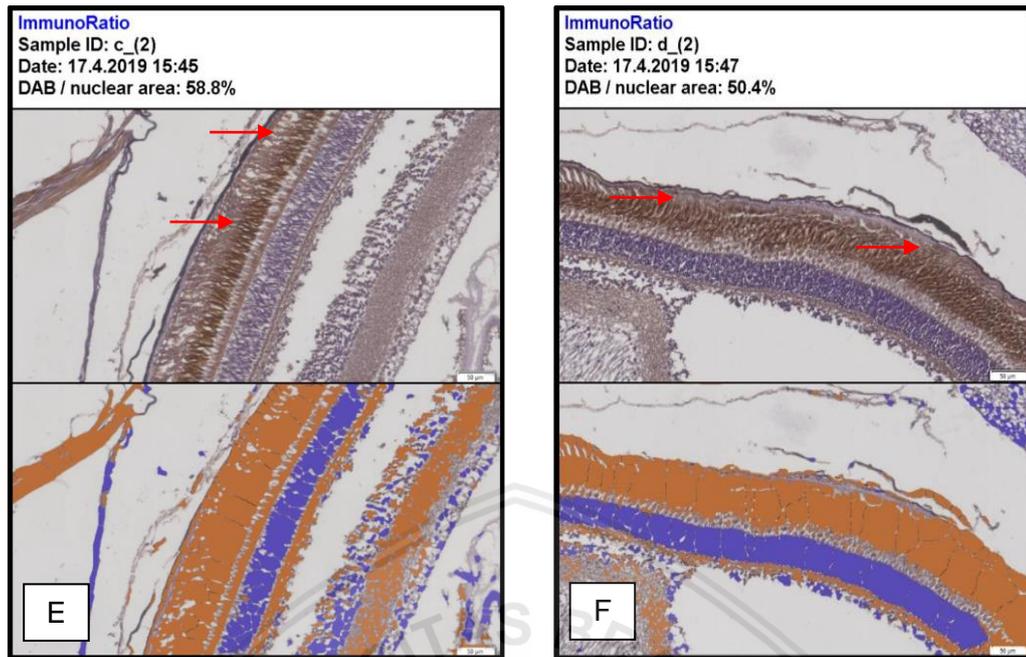
Persentase ini sudah dapat dikatakan baik karena persentase NFkB sudah hampir mendekati persentase NFkB ikan normal yaitu 25,3%. Hal ini sesuai dengan pendapat Fithriani, *et al.* (2015), bahwa senyawa aktif yang mampu menghambat dari pertumbuhan virus VNN yaitu dari golongan senyawa fenol. Senyawa fenol mempunyai beberapa senyawa bioaktif turunan yaitu seperti flavonoid dan tanin. Rijayanti, *et al.* (2014), menambahkan bahwa mekanisme kerja flavonoid sebagai antivirus maupun antibakteri dapat dibagi menjadi 3 yaitu menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel dan menghambat metabolisme energi. Mekanisme antivirus flavonoid dalam menghambat sintesis asam nukleat adalah dengan terjadinya proses interkelasi (ikatan hidrogen) dengan menumpuk basa asam nukleat yang menghambat pembentukan DNA dan RNA. Flavonoid menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri atau virus, mikrosom dan lisosom. Mekanisme kerja flavonoid dalam menghambat fungsi membran sel adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri atau virus dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler. Flavonoid dapat menghambat metabolisme energi dengan cara menghambat penggunaan oksigen pada virus.

Senyawa turunan fenol lainnya yang mampu menghambat pertumbuhan virus VNN yaitu tanin. Menurut Rahman, *et al.* (2018), tanin merupakan senyawa polifenol yang dapat berikatan dengan protein seperti selulosa, hemiselulosa dan *pectin* untuk membentuk suatu senyawa kompleks yang stabil. Tanin dalam konsentrasi rendah mampu menghambat pertumbuhan virus, tanin berfungsi sebagai antibakteri maupun antivirus dengan cara mengganggu fungsi dari mikroorganisme, termasuk bakteri dan virus.

Penentuan persentase ekspresi NFkB yaitu menggunakan *software Immunoratio*. Menurut Touminen, *et al.* (2010), cara penggunaan *software* dengan

cara memasukkan gambar yang telah dipilih dan disesuaikan dengan ukuran sel yang akan diamati. Ekspresi NFKB yang telah dihitung menggunakan *software Immunoratio* disajikan pada Gambar 12.





**Gambar 12.** Gambar Uji NFκB. Keterangan: (A) Ikan Normal, (B) Perlakuan Dosis 0 mg/kg, (C) Perlakuan dosis 250 mg/kg, (D) Perlakuan Dosis 300 mg/kg, (E) Perlakuan dosis 350 mg/kg dan (F) Perlakuan dosis 400 mg/kg. Tanda panah menunjukkan daerah yang terkekspresi NFκB.

**b. Mekanisme *D. salina* dalam Menghambat VNN pada Ikan Kerapu Cantang**

VNN dapat menginfeksi ikan melalui 3 cara yakni melalui sel epitel, saluran pencernaan dan melalui axon yang ada pada peredaran darah. Virus VNN akan masuk melalui permukaan tubuh seperti lendir, sirip dan otot, termasuk via oral. Virus yang masuk melalui permukaan tubuh dapat langsung bereplikasi di epitel permukaan saluran pencernaan dan masuk ke dalam sistem saraf pusat melalui sistem saraf perifer (Korsnes, 2008). Virus mengembangkan diri dengan mensintesis protein-protein penyusunnya di dalam sitosol. VNN yang ada pada intramuskular kemudian melewati sistem saraf perifer di jaringan otot tepi lalu dibawa oleh axon menuju jaringan spina pada tulang belakang. VNN menyerang sistem saraf pusat yang berada di tulang belakang dan melalui saraf menuju organ mata (retina) ikan (Gomez, et al., 2006).

NFKB akan aktif setelah menerima sinyal yang disebabkan oleh stress lingkungan, virus dan bakteri. Salah satu yang dapat menyebabkan yaitu virus VNN, infeksi virus VNN yang masuk ke dalam membran sel akan mengaktifkan I $\kappa$ B kinase. I $\kappa$ B kinase akan mendegradasikan I $\kappa$ Ba yang merupakan protein penghambat pada NFKB sehingga NFKB akan bebas. NFKB yang bebas (p50 dan p65) akan menuju *inflammatory gen* yang berada pada nukleus. mRNA akan membantu menterjemahkan p50 dan p65 dengan melanjutkan proses ke *inflammatory protein* (Tunon, *et al.*, 2003).

Semakin banyak persentase ekspresi NFKB menunjukkan semakin banyak infeksi virus VNN pada ikan kerapu cantang. Dilihat dari ekspresi NFKB pada mata ikan kerapu cantang, persentase ekspresi NFKB semakin menurun sebanding dengan peningkatan dosis yang diberikan. Hal ini menunjukkan bahwa *D. salina* mampu menghambat pertumbuhan dari virus VNN yang dilihat dari ekspresi NFKB yang semakin mendekati NFKB pada ikan normal. *D. salina* mempunyai beberapa kandungan senyawa yang dapat digunakan sebagai antivirus sehingga mampu menghambat pertumbuhan virus VNN. Beberapa senyawa yang mampu menghambat berdasarkan hasil uji GCMS (Yuwanita *et al.*, 2019 belum dipublikasikan) yang telah dilakukan yaitu antara lain *Napthaline*, tetradekana dan fenol (flavonoid dan tanin). Hal ini sesuai dengan pendapat Rijayanti, *et al.* (2014), fenol merupakan salah satu senyawa yang dapat digunakan sebagai antivirus maupun antibakteri. Mekanisme antivirus maupun antibakteri pada senyawa fenol dalam membunuh mikroorganisme (virus VNN) yaitu dengan mendenaturasi protein sel. Ikatan hidrogen yang terbentuk antara fenol dan protein mengakibatkan struktur protein akan menjadi rusak. Ikatan hidrogen tersebut akan mempengaruhi permeabilitas dinding sel dan membran sitoplasma sebab keduanya tersusun atas protein. Permeabilitas yang terganggu dapat

menyebabkan ketidakseimbangan makromolekul dan ion dalam sel, sehingga sel menjadi lisis.

## 4.2 Parameter Penunjang

### 4.2.1 Kualitas Air

Pada waktu pemeliharaan ikan kerapu cantang dilakukan pengukuran kualitas air sebelum ujiantang. Kualitas air yang diamati pada penelitian ini meliputi suhu, derajat keasaman (pH), oksigen terlarut (DO) dan salinitas. Pengukuran kualitas air dilakukan pada pagi (08.00 WIB) dan sore hari (15.00 WIB) selama pengamatan berlangsung. Data mengenai pengamatan kualitas air selama pemeliharaan disajikan pada lampiran 3. Hasil pengamatan kualitas air selama penelitian disajikan pada Tabel 5.

**Tabel 5.** Hasil Pengukuran Parameter Kualitas Air Selama Pemeliharaan

| Parameter                   | Nilai     | Literatur (Wiwi, <i>et al.</i> , 2015) |
|-----------------------------|-----------|--|
| Suhu (°C)                   | 27-30     | 24-32                                  |
| Derajat Keasaman (pH)       | 7,11-7,82 | 7,0-8,5                                |
| Oksigen Terlarut (DO) (ppm) | 5,1-8,2   | 5,0-8,2                                |
| Salinitas (ppt)             | 31-34     | 28-35                                  |

Berdasarkan hasil pengukuran kualitas air selama pemeliharaan didapatkan bahwa nilai suhu berkisar antara 27-30°C yang masih berada dalam kisaran normal bagi kehidupan ikan kerapu cantang. Nilai suhu selama pemeliharaan tidak menunjukkan perubahan yang signifikan. Hal ini sesuai dengan pernyataan Fadhil, *et al.* (2011), suhu dapat mempengaruhi proses fisiologis ikan, meliputi respirasi, nafsu makan, pertumbuhan, metabolisme, reproduksi dan tingkah laku. Nilai suhu optimal untuk pemeliharaan kerapu cantang yaitu 24-32°C.

Nilai derajat keasaman (pH) menunjukkan bahwa kisaran 7,11-7,82 masih tergolong kisaran yang optimal bagi pemeliharaan ikan kerapu cantang. Hal ini sesuai dengan pernyataan Kordi (2010), bahwa nilai kisaran pH normal perairan

laut tanpa bahan pencemar berkisar 7-9, namun kisaran yang optimal untuk pertumbuhan ikan kerapu cantang 7,0-8,5.

Oksigen terlarut merupakan faktor terpenting dalam menentukan kelangsungan hidup ikan. Hasil pengukuran oksigen terlarut berdasarkan hasil pemeliharaan yaitu berkisar 5,1-8,2 ppm. Kisaran tersebut masih dalam kondisi optimal, namun terdapat media pemeliharaan yang memiliki kisaran DO lebih tinggi. Menurut Wiwi, *et al.* (2015), kisaran optimal DO untuk pemeliharaan ikan kerapu cantang yaitu 5,0-8,2. Rendahnya oksigen terlarut dapat mempengaruhi metabolisme dari ikan tidak berjalan dengan normal, hal ini akan mempengaruhi nafsu makan ikan dan proses pencernaan ikan.

Pengukuran salinitas selama pemeliharaan yaitu berkisar 31-34 ppt yang merupakan batas optimal bagi ikan kerapu cantang. Hal ini sesuai pernyataan Kordi (2010), bahwa ikan kerapu cantang dapat hidup pada kisaran salinitas 30-35 ppt. ikan kerapu merupakan ikan air laut yang bersifat euryhaline dimana ikan mampu hidup dalam kisaran salinitas yang luas.

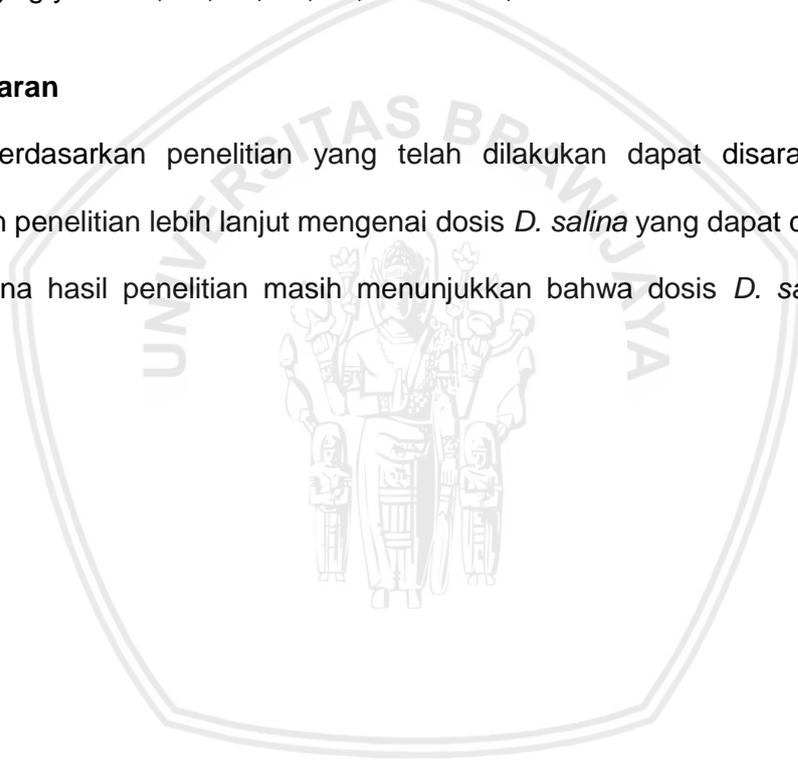
## 5 KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa perlakuan terbaik setelah dilakukan ujiantang yaitu didapat pada perlakuan dosis 400 mg/kg pakan dengan persentase ekspresi NFKB sebesar 50,4%. Adapun persentase NFKB yang didapatkan pada perlakuan 250, 300, 350 dan 0 mg/kg yaitu 62,0%, 59,2%, 58,8% dan 63,5%.

### 5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disarankan agar dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis *D. salina* yang dapat ditingkatkan lagi karena hasil penelitian masih menunjukkan bahwa dosis *D. salina* masih linear.



## DAFTAR PUSTAKA

- Abd El-Baky, H., F. K. El Baz and G. S. El-Baroty. 2007. Production of carotenoid from Marine Microalgae and its evaluation as safe food colorant and lowering cholesterol agent. *Journal Agriculture and Environment*. **2** (6):792-800.
- Agustini, N. W. S dan Kusmiati. 2012. Identifikasi dan uji aktivitas antibakteri senyawa aktif secara aktif secara maserasi dan digesti dalam berbagai pelarut dari mikroalga *Dunaliella salina*. *Jurnal FPIK UNS*. 544-551.
- Alwan., M. Hendri, dan Darmaji. 2017. Faktor-faktor yang mendorong siswa MIA SMAN mengikuti bimbingan belajar luar sekolah di kecamatan Telanaipura Kota Jambi. *EduFisika*. **2**(1): 25-37.
- Amar, R. C., V. Kiron. S dan T. Watanabe. 2012. Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. *Fish and Shellfish Immunology*. **16**: 527-537.
- Arief, M., D. K. Pertiwi dan Y. Cahyoko. 2011. Pengaruh pemberian pakan buatan, pakan alami dan kombinasinya terhadap pertumbuhan, rasio konservasi pakan dan tingkat kelulushidupan ikan sidat (*Anguilla bicolor*). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. **3**(1): 61-65.
- Astrid, T., B. S. Rahardja dan E. D. Masithah. 2013. Pengaruh konsentrasi pupuk *Lemna minor* terhadap populasi *Dunaliella salina*. **5**(1):61-66.
- Atma, Y. 2018. Prinsip Analisis Komponen Pangan: Makro dan Mikro Nutrien. Deepublish. Yogyakarta. 128 hlm.
- Baratawidjaja, K. G. 2006. Imunologi Dasar Edisi 7. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 588 hlm.
- Barnes and Karin. 1997. Nuclear Factor- $\kappa$ B pivotal transcription factor in chronic inflammation diseases. *The New England Journal of Medicine*. **336** (15): 1066-1071.
- Borowitzka, M. 2013. *Dunaliella*: Biology, production and markets. *Applied Phycology and Biotechnology*. **25** (3): 743-756.
- Borowitzka, M. A. and C. J. Siva. 2007. The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *J. Appl Phycol*. **19**: 567-590.
- Chien, M. H., T. T. M. Vo, S. Y. Wo and C. H. Lin. 2017. Complete genome sequence of nervous necrosis virus isolated from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) in taiwan. *Genome Announcements*. **5**(37): 2-17.
- Costa, J. Z. and Kim D. Thompson. 2016. Understanding the interaction between *Betanodavirus* and its host for the development of prophylactic measures

for viral encephalopathy and retinopathy. *Fish and Shellfish Immunology*. **53**: 35-49.

- Djunaedi, A., C. A. Suryono dan Sardjito. 2017. Kandungan pigmen polar dan biomassa pada mikroalga *Dunaliella salina* dengan salinitas berbeda. *Jurnal Kelautan Tropis*. **20**(1):1-6.
- Fadhil, R. J., F. Endan, S. Taip dan M. Salih. 2011. Kualitas air dalam sistem resirkulasi untuk budidaya ikan lele/keli (*Claria Batrachus*). *J. Aceh*. **1** (1): 1-10.
- Farghaly, A.A., Hassan, Z.M. 2012. Methanolic extract of Lupinus Termis ameliorates DNA damage in alloxan-induced diabetic mice. *Eur Rev Med Pharmacol. Sci*. **16**(3): 126-132.
- Fatimah. 2006. Respon imunitas yang rendah pada tubuh manusia lanjut usia. *Jurnal Makara Kesehatan*. **10** (1): 47-53.
- Fithriani, D. , S. Amini, S. Melani dan R. Susilowati. 2015. Uji fitokimia, kandungan total fenol dan aktivitas antioksidan mikroalga Spirulina sp., Chlorella sp., dan Nannochloropsis sp. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. **10**(2): 101-109.
- Gilda, D. Lio-Po and Leobert, D. P. 2006. Viral Disease Chapter 1: Aquaculture. 161 hlm.
- Gilmore, T. D. 2006. Introduction to NF-κB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. **25**(51): 6680.
- Gomez, D. K., D. J. Lim, G. W. Baeck and S. C. Park. 2006. Detection of betanodaviruses in apparently healthy aquarium fishes and invertebrates. *Journal of Veterinary Science*. **7**(4): 369-374.
- Gropper, S. S., J.L. Smith and J. L. Groof. 2005. Advanced Nutrition and Human Metabolism Edisi 4. Belmont. USA. 84-98.
- Gusman. E. 2011. Sistem Pertahanan Tubuh Ikan : Respon Pertahanan Adaptif, *Major Histocompatibility Complex (MHC)*, Reseptor Sel T, Sitokin. *Jurnal Universitas Borneo Tarakan*. Hlm 54-61.
- Hadiyanto dan M. Azim. 2012. Mikroalga Sumber Pangan dan Energi Masa Depan. UNDIP Press: Semarang.
- Handayani, R., L. Sawitri, S. Winarsih, R. Ratnawati, E. Norahmawati dan K. W. Anita. 2018. Ekstrak teh hijau meningkatkan ekspresi er-alfa pada endometrium dan tuba falopi tikus betina yang dipapar sipermetrin. *Jurnal Kebidanan*. **7**(2): 103-110.
- Hasan, M. I. 2002. Pokok-Pokok Materi Metodologi Penelitian dan Aplikasinya. Ghalia Indonesia. Bogor. 260 Hlm.
- Helmi, T. Z., R. Widayanti dan A. Haryanto. 2014. Penentuan subtype virus *Avian influenza* dengan metode *single step multiplex reverse transcriptase-72*

- polymerase chain reaction (rt-pcr)* isolat asal provinsi Aceh. *Jurnal Kedokteran Hewan*. **8**(1): 72-75.
- Irianto, A. 2005. Patologi Ikan Teleostei. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 320 hlm.
- Iskandar, B. H. dan W. Mawardi. 1997. Studi perbandingan keberadaan ikan-ikan karang nocturnal dan diurnal tujuan penangkapan terumbu karang pulau pari Jakarta Utara. *Bulletin PSP*. **6** (1): 17-27.
- Jhonny, F., K. Mahardika, I.N.A. Giri dan D. Roza. 2007. Penambahan vitamin c dalam pakan untuk meningkatkan imunitas benih ikan kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus* terhadap infeksi *Viral Nervous Necrosis*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. **6** (1): 43 – 53.
- Kordi, K. M. G. H. 2010. Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan. Rineka Cipta dan Bina Adiaksara. Jakarta. 190 hlm.
- Kopp, E. B. and S. Ghosh. 1995. NFKB and Real Proteins In Innate Immunity. Academic Press: London. 471 pages.
- Lestari, A. T dan P. E. Sudaryatma. 2014. Studi imunositokimia darah dan suspensi organ kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) yang diinfeksi virus isolate lapang penyebab *Viral Nervous Necrosis*. *Studi Imunositokimia Darah dan Suspensi Organ Kerapu Macan*. **32**(1): 85-92.
- Lin HH, Chen JH, Huang CC, Wang CJ. 2007. Apoptotic effect of 3,4-dihydroxybenzoic acid on human gastric carcinoma cells involving JNK/p38 MAPK signaling activation. *International Journal of Cancer*. **120** (11): 2306–2316.
- Linarwati, M., A. Fathoni dan M. M. Minarsih. 2016. Studi deskriptif pelatihan dan pengembangan sumberdaya manusia serta penggunaan metode *behavioral event interview* dalam merekrut karyawan baru di bank mega cabang kodus. *Journal of Management*. **2** (2): 5-10.
- Li Wang, S., K. M. Ahmed, M. E. Degnan, M. Fan, and J. J. Li. 2009. NF-κB-mediated HER2 overexpression in radiation-adaptive resistance. *Radiation research*. **171**(1): 9-21.
- Logan, R. M., R. J. Gibson, S. T. Sonis dan D. M. Keefe. 2007. Nuclear factor-κB (NF-κB) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in the oral mucosa following cancer chemotherapy. *Oral oncology*. **43**(4): 395-401.
- Mahardani, D., B. Putri dan S. Hudaidah. 2017. Pengaruh salinitas berbeda terhadap pertumbuhan dan kandungan karotenoid *Dunaliella* sp. dalam media ekstrak daun lamtoro (*Leucaena leucocephala*). *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. **7**(1): 50-58.
- Mahardika, K., I. Mastuti dan Zafran. 2017. Pencegahan infeksi *viral nervous necrosis* (VNN) penyebab black body disease pada kerapu hibrid dengan vaksin sederhana. Seminar Nasional Kelautan XII. Fakultas Teknik dan Ilmu Kelautan Universitas Hang Tuah Surabaya.

- Marzuqi, M dan D. N. Anjusary. 2013. Kecernaan nutrisi pakan dengan kadar protein dan lemak berbeda pada juvenil ikan kerapu pasir (*Epinephelus corallicola*). *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. **5** (2): 311-323.
- Morais, M. G., B. S. Vaz, E. G. Morais dan J. A. V. Costa. 2017. Biologically active metabolites synthesized by microalgae. *Biomed Research international*. **1**(1): 1-15.
- Nguyen, H. D., T. Mekuchi, K. Imura, T. Nakai, T. Nizshizawa, and K. Muroga. 1996. Occurrence of Viral Nervous Necrosis (VNN) in Hatchery-Reared Juvenile Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Sains*. **60**(5): 551-554.
- Nursiyfani, B. C. A. 2017. Produksi Ikan Kerapu. Bisnis. Yogyakarta. 3 hlm.
- Novriadi, R., S. Agustatik dan O. N. T. Dwi. 2014. Identifikasi keberadaan *Nervous Necrosis Virus* dan *VNN* pada budidaya ikan laut di wilayah kerja Balai Perikanan Budidaya Laut Batam. *Omni-Akuatika*. **14**(20): 54-62.
- Ode, I. 2013. Kajian sistem imunitas untuk pengendalian penyakit pada ikan dan udang. *Agrikan: Jurnal Agribisnis Perikanan*. **6**(2): 41-43.
- Oktavia, W., K. Sukarti dan H. Kusdianto. 2005. Pengaruh kombinasi sumber lemak yang berbeda pada pakan terhadap pertumbuhan ikan kerapu cantang (*Epinephelus* sp.). *Jurnal Ilmu Perikanan Tropis*. **20**(2): 1-7.
- Oren, A. 2014. The ecology of *Dunaliella* in high-salt environments. *Journal of Biological Research Thessaloniki*. **21**(23):1-8.
- Ozdemir, G., N. U. Karabay, M. C. Dalay dan B. Pazarbasi. 2004. Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*. *Phytother. Res*. **18**: 754-757.
- Padang, A., A. Lestaluhu dan R. Siding. 2018. Pertumbuhan fitoplankton *Dunaliella* sp. dengan cahaya berbeda pada skala laboratorium. *Agrikan: Jurnal Agribisnis Perikanan*. **11**(1): 1-7.
- Pereira, J. A., I. Oliviera, A. Sousa, P. Valentao, P. B. Andrade, I. C. F. R. Ferreira, F. Ferreres, A. Bento, R. Seabra dan L. Estevinho. 2007. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food and Chemical Toxicology*. **45**: 2287-2295.
- Purhantara, W. 2010. Metode Penelitian Kualitatif untuk Bisnis. Graha ilmu. Yogyakarta. 178 Hlm.
- Putri, R. R., U. Yanuhar dan A. M. Suryanto. 2013. Perubahan struktur jaringan mata dan otak pada larva ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) yang terinfeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN) dengan pemeriksaan *Scanning Electron Microscope* (SEM). *Jurnal Mahasiswa Manajemen Sumberdaya Perairan*. **1**(1):1-10.

- Rachmania, R. A., P. Wahyudi, A. M. Wardani dan D. R. Insani. 2017. Profil berat molekul enzim protease buah nanas (*Ananas comosus* L.merr) dan pepaya (*Carica papaya* L.) menggunakan metode sds-page. *Jurnal Penelitian Kimia*. **13**(1): 52-65.
- Rahman, I. S., Maftuch dan E. Sanoesi. 2018. Efektivitas imunostimulan ekstrak kasar daun jambu biji (*Psidium guajava*) terhadap histopatologi hati ikan patin (*Pangasius* sp.) yang diuji tantang bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fisheries and Marine science*. **2**(2): 47-55.
- Rahmaningsih, S. 2018. Hama dan Penyakit Ikan. Deepublish. Yogyakarta. 352 hlm.
- Rahmaningsih, S. dan A. I. Ari. 2013. Pakan dan pertumbuhan ikan kerapu cantang. *Ekologia*. **13**(2): 25-30.
- Razi, F. 2013. Penanganan Hama dan Penyakit pada Ikan Kerapu. Kementerian Perikanan dan Kelautan Pusat Penyuluhan Kelautan dan Perikanan Press. Jakarta. 23 hlm.
- Rijayanti, R. P., S. Luliana dan H. F. Trianto. 2014. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun manga bacang (*Mangifera foetida* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* secara in vitro. *Jurnal Mahasiswa PSPD FK Universitas Tanjungpura*. **1**(1): 1-18.
- Rizeki, M. F., H. Fatmawati dan P. Wulandari. 2012. Efek pemberian ekstrak buah pare (*Momordica charantia*) terhadap kadar NF-kB (*Nuclear Factor Kappa Beta*) pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diberi diet aterogenik. *Jurnal Kedokteran*. **1**(2): 1-5.
- Rokade, Y. B dan R. Z. Sayyed. 2009. Naphthalene derivatives: a new range of antimicrobials with high therapeutic value. *Rayasan J. Chem*. **2** (4): 972-980.
- Roza, D., F. Johnny dan Tridjoko. 2006. Peningkatan Respon Imun Non-Spesifik Benih Kerapu Bebek, *Cromileptes altivelis* dengan Imunostimulan dan Bakterin terhadap Infeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN). *Jurnal Perikanan*. **8** (1): 25-35.
- Saparuddin., A. Ridwan dan Z. Arham. 2017. Efektivitas ekstrak daun *Macaranga tanarius* dalam menginaktivasi *viral nervous necrosis* ikan kerapu tikus. *Biowallacea*. **4** (1):519-526.
- Sembiring, S. B. M., G. S. Wibawa, K. Mahardika, Z. Widiastuti, dan H. Haryanti, 2018. Prevalensi infeksi viral nervous necrosis (VNN) dan iridovirus pada hatcheri dan budidaya ikan laut. *Media Akuakultur*. **13**(2): 83-90.
- Serasanambati, Mamatha, and Shanmuga Reddy Chilakapati. 2016. Function of nuclear factor kappa B (NF-kB) in human diseases-a review. *South Indian Journal of Biological Sciences*. **2**(4): 368-387.

- Soemarjati, W., A. B. Muslim, R. Susiana dan C. Saparinto. 2015. *Bisnis dan Budidaya Kerapu*. Penebar Swadaya. Jakarta. 148 hlm.
- Subyakto dan Cahyaningsih. 2008. *Pembenihan Kerapu Skala Rumah Tangga*. AgroMedia. Jakarta. 63 hlm.
- Sudaryatma, P. E., A. T. Lestari dan N. L. Sunarsih. 2012. Imunositokimia *Streptavidin Biotin*: deteksi dini *Viral Nervous Necrosis virus* pada lendir ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Jurnal Sain Veteriner*. **30**(1):99-109.
- Supamattaya, K., S. Kiriratnikom, M. Boonyaratpalin, and L. Borowitzka. 2005. Effect of a *Dunaliella* extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*. **248**(4): 207-216.
- Supriyono, T., R. Murwani dan Nurrahman. 2014. Kandungan beta karoten, polifenol total dan aktifitas "merantas" radikal bebas susu kefir susu kacang hijau (*Vigna radiata*) oleh pengaruh jumlah starter (*Lactobacillus bulgaricus* dan *Candida kefir*) dan konsentrasi glukosa. *Jurnal Gizi Indonesia*. **2** (2): 65-71.
- Sutarmat, T. dan H. T. Yudha. 2013. Analisis keragaan pertumbuhan benih kerapu hibrida hasil hibridisasi kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dengan kerapu kertang (*Epinephelus lanceolatus*) dan kerapu batik (*Epinephelus microdon*). *Jurnal Riset Akuakultur*. **8**(3): 363-372.
- Tang, L., C. S. Ling, N. K. Krishna, M. Yeager, A. Schneemann, dan J. E. Johnson. 2012. Virus-Like Particles of a Fish Nodavirus Display a Capsid Subunit Domain Organization Different from That of Insect Nodaviruses. *Journal of Virology*. **76**(12): 6370-6375.
- Toffan, A., F. Pascoli, T. Preto, V. Panzarin, M. Abbadi, A. Buratin, dan F. Padrós. 2017. Viral nervous necrosis in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) caused by reassortant betanodavirus RGNNV/SJNNV: an emerging threat for Mediterranean aquaculture. *Scientific Reports*. **7**: 46755.
- Touminen, V. J., S. Ruotoistenmaki, A. Viitanen dan J. Isola. 2010. Immunoratio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptors (ER), progesterone receptors (PR) and Ki-67. *Breast Cancer Research*. **12**: 56-96.
- Tran, D., C. Louime, T. Võ, M. Giordano, S. Portilla, N. Doan, D. Tran, T. Mai, and L. Bui. 2013. Identification of *Dunaliella Viridis* Using its Markers. **3**(4). 118-126.
- Tunon, M. J., S. Sanchez-campos, B. Gutierrez, J. M. Culebras and J. Gonzalez. 2003. Effects of FK506 and rapamycin on generation of reactive oxygen species, nitric oxide production and nuclear factor kappa B activation in rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*. **66**: 439-445.
- Umasugi, S. dan A. Burhanuddin. 2015. Analisis prevalensi dan intensitas ektoparasit ikan kerapu tikus (*Cromileptes altevalis*) di keramba jaring

apung Perairan Teluk Kayeli Kabupaten Buru. *Agrikan: Jurnal Agribisnis Perikanan*. **8**(1): 13-20.

Utami, D. T., S. B. Prayitno, S. Hastuti dan A. Santika. 2013. Gambaran parameter hematologis pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang diberi vaksin DNA *Streptococcus iniae* dengan dosis yang berbeda. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. **2**(4): 7-20.

Vandermark, E. R., K. A. Deluca, C. R. Gardner, D. F. Marker, C. N. Schreiner, D. A. Strickland and C. D. Woodworth. 2012. Human papillomavirus type 16 E6 and E 7 proteins alter NF- $\kappa$ B in cultured cervical epithelial cells and inhibition of NF- $\kappa$ B promotes cell growth and immortalization. *Virology*. **425**(1): 53-60.

Wiwi, S., A. B. Muslim, R. Susiana dan C. Saparinto. 2015. *Bisnis dan Budi Daya Kerapu*. Penebar Swadaya. Jakarta Timur. 70 hlm.

Yanuhar, U. 2011. The function of receptor protein humpback grouper *Epinephelus* sp. 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): 34-67.

Yanuhar, U. dan A. Khumaidi. 2017. The application of pigment-protein fraction from *Nannochloropsis oculata* on  $\beta$ -actin response of *Cromileptes altivelis* infected with viral nervous necrosis. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. **16**(1): 22-32.

Yuasa, K., I. Koesharyani, D. Roza, K. Mahardika, F. Johnny and Zafran. 2001. Manual for PCR procedure; rapid diagnosis on *Viral Nervous Necrosis* (VNN) in grouper. Lolitkanta-JICA Booklet No. 13, 35 pp.

Yuwanita, R., N. R. Buwono, dan H. F. E. Putra. 2018. Pengaruh *Dunaliella Salina* Terhadap Polimorfonuklear Leukosit Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus lanceolatus*) Yang Diinfeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. **10**(2): 152-158.

Zafran. 2008. Studi pendahuluan pemanfaatan miselia jamur *Lagenidium* sebagai immunostimulant dalam pemeliharaan ikan kerapu. *Aquaculture Indonesiana*. **9**(2): 61-65.

Zainuddin, M. 2017. Aktivitas antioksidan biopigmen *Dunaliella salina* pada media kultur hiposlin dan hipersalin. *Jurnal Enggano*. **2**(1):25-38.

## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Alat dan Bahan

#### a. Alat

|  |  |
|--|--|
|  <p>Toples Kaca</p>         |  <p>Timbangan Digital</p>    |
|  <p>Timbangan Analitik</p> |  <p>Botol N-Heknas</p>      |
|  <p>DO Meter</p>          |  <p>Bak Alas Penimbang</p> |
|  <p>Termometer</p>        |  <p>Kontainer Plastik</p>  |



Coolbox



Sentrifuge



Timbangan



Selang Aerasi



Mikro Pipet



Seser



Botol Larutan



Toples Tepung *Dunaiella salina*



Batu Aerasi



Blower



Cetakan Pelet



Bak Fiber



Waterbath



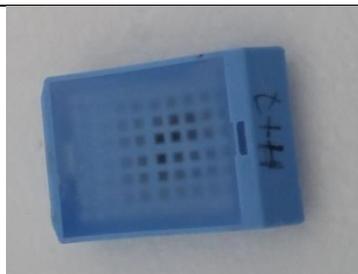
Penyimpan Sampel



Decloaking chamber



Pisau mikrotom



Cassate



Rak tube



Ice Crusher



Refratometer



Mikropipet



Pinset dan pisau bedah



Pellet pasta



Blender



Nampan



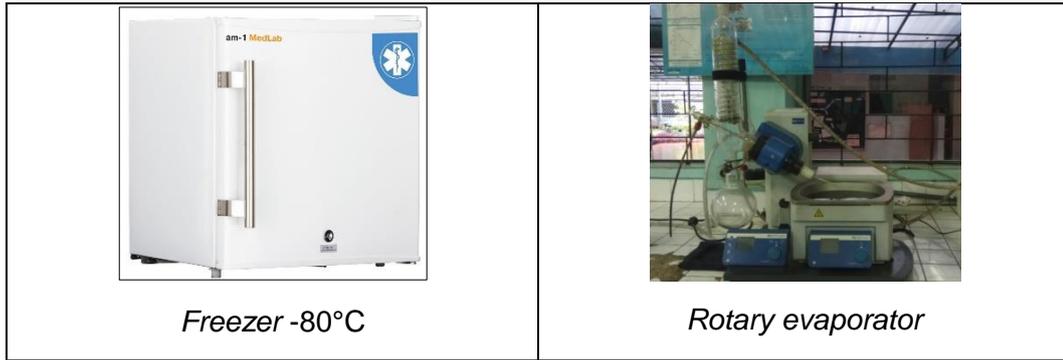
Mikroskop Olympus CX22



Botol Sprayer



Autoklaf



b. Bahan





Tepung kanji



Ekstrak *D. salina*



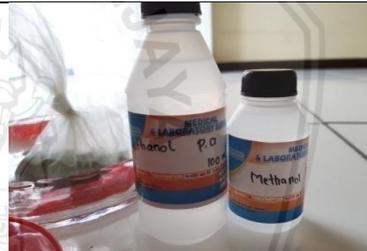
PBS



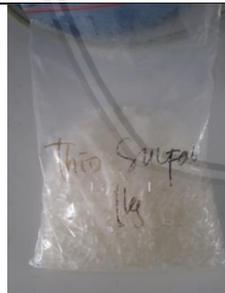
Etanol



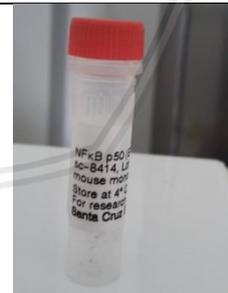
EDTA



Metanol



Na-Thiosulfat



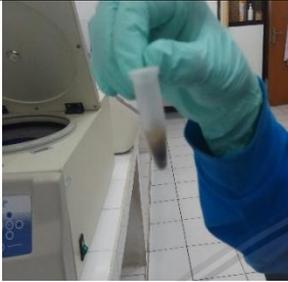
Anti mouse NF-kB



Preparat NF-kB



Air laut

|  |   |
|--|---|
|  <p>Kaporit</p>             |  <p>Alkohol 70%</p>               |
|  <p>Isolat VNN</p>          |  <p>Mikrotube</p>                 |
|  <p>Cover glass</p>        |  <p>Go Taq® Green Master Mix</p> |
|  <p>DNA Ladder 100 bp</p> |  <p>Lem entelan</p>             |
|  <p>Aquades</p>           |  <p>Primer</p>                  |





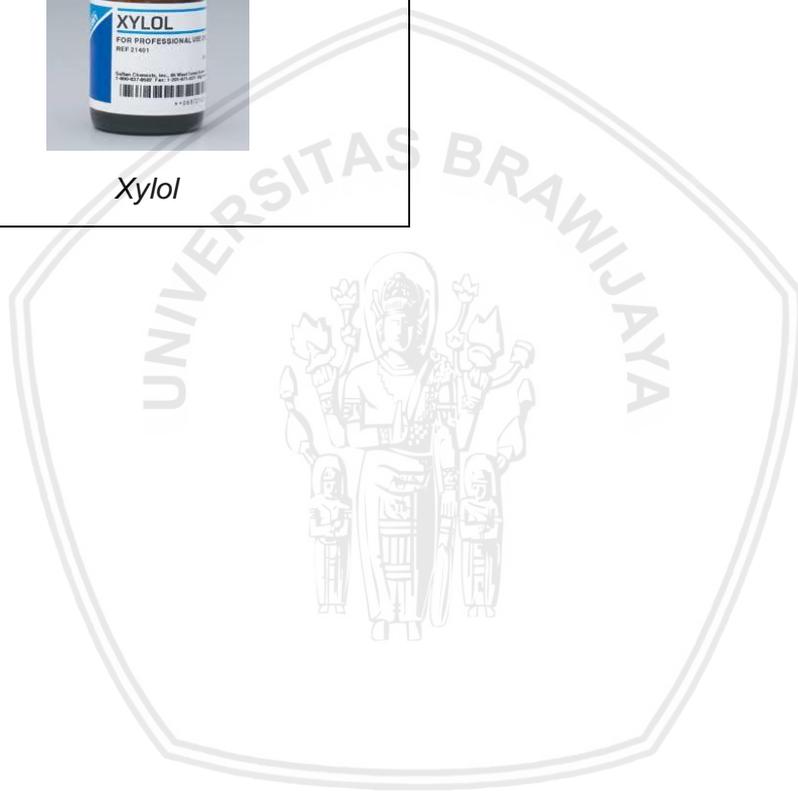
*Ethidium Bromide (EtBr)*



Agarose



*Xylol*



## Lampiran 2. Data Hasil Uji SDS-PAGE

| No. | Nama Sampel | Konsentrasi (mg/ml) |
|-----|-------------|---------------------|
| 1.  | A1          | 16.56               |
| 2.  | A2          | 16.56               |



Lampiran 3. Data Kualitas Air

| Tanggal        | Dosis<br><i>D. salina</i><br>(mg/kg) | Kualitas Air |      |          |      |      |      |           |      |
|----------------|--------------------------------------|--------------|------|----------|------|------|------|-----------|------|
|                |                                      | Suhu (C)     |      | DO (ppm) |      | pH   |      | Sal (ppt) |      |
|                |                                      | Pagi         | Sore | Pagi     | Sore | Pagi | Sore | Pagi      | Sore |
| 18 Feb<br>2019 | 0                                    | 28           | 28   | 5,6      | 6,9  | 7,58 | 7,73 | 34        | 33   |
|                | 250                                  | 28           | 29   | 5,7      | 5,9  | 7,62 | 7,32 | 34        | 33   |
|                | 300                                  | 28           | 29   | 5,9      | 6,6  | 7,49 | 7,41 | 34        | 33   |
|                | 350                                  | 27           | 28,5 | 5,2      | 6,1  | 7,19 | 7,48 | 34        | 33   |
|                | 400                                  | 28           | 29   | 5,7      | 7,3  | 7,48 | 7,44 | 34        | 33   |
| 19 Feb<br>2019 | 0                                    | 27           | 29   | 6,2      | 7,7  | 7,31 | 7,68 | 32        | 33   |
|                | 250                                  | 27           | 29   | 5,5      | 6,4  | 7,28 | 7,64 | 32        | 33   |
|                | 300                                  | 28           | 29   | 6,4      | 7,6  | 7,47 | 7,25 | 32        | 33   |
|                | 350                                  | 27           | 28   | 6,3      | 6,9  | 7,44 | 7,37 | 32        | 33   |
|                | 400                                  | 27,5         | 28   | 6,3      | 7,3  | 7,29 | 7,69 | 32        | 33   |
| 20 Feb<br>2019 | 0                                    | 28           | 29   | 5,6      | 6,7  | 7,29 | 7,38 | 33        | 34   |
|                | 250                                  | 27,5         | 29   | 6,3      | 6,8  | 7,48 | 7,24 | 33        | 34   |
|                | 300                                  | 28           | 29,5 | 5,9      | 6,9  | 7,23 | 7,73 | 33        | 34   |
|                | 350                                  | 28           | 28   | 5,7      | 7,3  | 7,28 | 7,36 | 33        | 34   |
|                | 400                                  | 28           | 29   | 5,8      | 7,4  | 7,32 | 7,49 | 33        | 34   |
| 21 Feb<br>2019 | 0                                    | 28           | 29   | 5,1      | 6,8  | 7,49 | 7,38 | 31        | 32   |
|                | 250                                  | 28           | 29   | 6,1      | 7,2  | 7,46 | 7,63 | 31        | 32   |
|                | 300                                  | 27,5         | 29   | 6,4      | 6,9  | 7,51 | 7,39 | 31        | 32   |
|                | 350                                  | 27,5         | 28   | 6,1      | 6,9  | 7,58 | 7,48 | 31        | 32   |
|                | 400                                  | 27           | 29   | 6,1      | 7,3  | 7,66 | 7,39 | 31        | 32   |
| 22 Feb<br>2019 | 0                                    | 28           | 29   | 6,2      | 6,9  | 7,55 | 7,43 | 33        | 33   |
|                | 250                                  | 28,5         | 30   | 5,7      | 6,3  | 7,63 | 7,48 | 33        | 33   |
|                | 300                                  | 28           | 29   | 5,8      | 6,5  | 7,47 | 7,19 | 33        | 33   |
|                | 350                                  | 28           | 30   | 5,9      | 6,8  | 7,56 | 7,57 | 33        | 33   |
|                | 400                                  | 28           | 30   | 5,6      | 7,3  | 7,46 | 7,55 | 33        | 33   |
| 23 Feb<br>2019 | 0                                    | 27,5         | 29   | 5,7      | 6,8  | 7,57 | 7,49 | 34        | 32   |
|                | 250                                  | 27,5         | 28   | 5,6      | 7,1  | 7,89 | 7,46 | 34        | 32   |
|                | 300                                  | 28           | 29   | 5,7      | 7,5  | 7,59 | 7,30 | 34        | 32   |
|                | 350                                  | 28           | 29   | 6,2      | 7,1  | 7,66 | 7,94 | 34        | 32   |
|                | 400                                  | 27           | 28,5 | 6,4      | 6,9  | 7,64 | 7,19 | 34        | 32   |
| 24 Feb<br>2019 | 0                                    | 28           | 29   | 5,5      | 7,2  | 7,75 | 7,79 | 32        | 34   |
|                | 250                                  | 28           | 28   | 5,5      | 6,6  | 7,54 | 7,48 | 32        | 34   |
|                | 300                                  | 28,5         | 29   | 6,4      | 7,4  | 7,48 | 7,29 | 32        | 34   |
|                | 350                                  | 28           | 29   | 5,9      | 6,7  | 7,79 | 7,47 | 32        | 34   |
|                | 400                                  | 27,5         | 28   | 6,2      | 7,4  | 7,73 | 7,14 | 32        | 34   |
| 25 Feb<br>2019 | 0                                    | 27,5         | 28   | 5,9      | 6,3  | 7,54 | 7,56 | 33        | 34   |
|                | 250                                  | 28           | 28,5 | 6,1      | 6,2  | 7,48 | 7,58 | 33        | 34   |
|                | 300                                  | 28           | 29   | 6,5      | 6,7  | 7,11 | 7,35 | 33        | 34   |
|                | 350                                  | 28           | 29   | 5,8      | 5,8  | 7,37 | 7,68 | 33        | 34   |
|                | 400                                  | 27,5         | 28   | 6,3      | 6,4  | 7,25 | 7,46 | 33        | 34   |
| 26 Feb<br>2019 | 0                                    | 27,5         | 28   | 5,5      | 5,1  | 7,11 | 7,42 | 33        | 32   |
|                | 250                                  | 27,5         | 28   | 7,6      | 6,5  | 7,78 | 7,54 | 33        | 32   |
|                | 300                                  | 28           | 28,5 | 6,2      | 7,1  | 7,14 | 7,25 | 33        | 32   |
|                | 350                                  | 27           | 28   | 6,1      | 6,5  | 7,49 | 7,69 | 33        | 32   |
|                | 400                                  | 28           | 29   | 6,3      | 6,6  | 7,39 | 7,75 | 33        | 32   |

| Tanggal        | Dosis<br><i>D. salina</i><br>(mg/kg) | Kualitas Air |      |          |      |      |      |           |      |
|----------------|--------------------------------------|--------------|------|----------|------|------|------|-----------|------|
|                |                                      | Suhu (C)     |      | DO (ppm) |      | pH   |      | Sal (ppt) |      |
|                |                                      | Pagi         | Sore | Pagi     | Sore | Pagi | Sore | Pagi      | Sore |
| 27 Feb<br>2019 | 0                                    | 28           | 28,5 | 6,3      | 6,6  | 7,49 | 7,71 | 32        | 31   |
|                | 250                                  | 27,5         | 29   | 6,3      | 6,9  | 7,29 | 7,60 | 32        | 31   |
|                | 300                                  | 28           | 29   | 7,4      | 7,6  | 7,54 | 7,18 | 32        | 31   |
|                | 350                                  | 27,5         | 28   | 7,4      | 7,2  | 7,40 | 7,56 | 32        | 31   |
|                | 400                                  | 28,5         | 29   | 6,6      | 6,5  | 7,26 | 7,49 | 32        | 31   |
| 28 Feb<br>2019 | 0                                    | 28           | 29   | 6,9      | 6,5  | 7,79 | 7,65 | 32        | 33   |
|                | 250                                  | 27           | 28,5 | 7,0      | 6,5  | 7,47 | 7,60 | 32        | 33   |
|                | 300                                  | 28           | 29   | 6,7      | 7,5  | 7,60 | 7,24 | 32        | 33   |
|                | 350                                  | 28           | 29   | 7,6      | 5,7  | 7,28 | 7,56 | 32        | 33   |
|                | 400                                  | 27,5         | 28   | 7,4      | 7,2  | 7,50 | 7,63 | 32        | 33   |
| 1 Mar<br>2019  | 0                                    | 27           | 30   | 6,4      | 7,8  | 7,47 | 7,67 | 34        | 33   |
|                | 250                                  | 28           | 28,5 | 6,4      | 6,5  | 7,67 | 7,65 | 34        | 33   |
|                | 300                                  | 28,5         | 29   | 6,4      | 7,5  | 7,36 | 7,68 | 34        | 33   |
|                | 350                                  | 28           | 29,5 | 7,1      | 7,0  | 7,42 | 7,44 | 34        | 33   |
|                | 400                                  | 28           | 28,5 | 7,4      | 7,2  | 7,68 | 7,37 | 34        | 33   |
| 2 Mar<br>2019  | 0                                    | 27           | 29   | 5,6      | 5,6  | 7,36 | 7,31 | 33        | 33   |
|                | 250                                  | 27,5         | 29   | 7,2      | 6,2  | 7,18 | 7,67 | 33        | 33   |
|                | 300                                  | 27           | 27,5 | 7,6      | 5,8  | 7,66 | 7,61 | 33        | 33   |
|                | 350                                  | 28           | 29   | 5,7      | 4,9  | 7,52 | 7,47 | 33        | 33   |
|                | 400                                  | 29           | 29   | 5,4      | 5,2  | 7,57 | 7,65 | 33        | 33   |
| 3 Mar<br>2019  | 0                                    | 28           | 29   | 6,0      | 6,6  | 7,62 | 7,39 | 33        | 32   |
|                | 250                                  | 28           | 28,5 | 6,4      | 6,7  | 7,37 | 7,27 | 33        | 32   |
|                | 300                                  | 27,5         | 29   | 6,2      | 6,7  | 7,25 | 7,57 | 33        | 32   |
|                | 350                                  | 27           | 29   | 6,1      | 6,0  | 7,74 | 7,45 | 33        | 32   |
|                | 400                                  | 27           | 29   | 6,4      | 6,7  | 7,44 | 7,29 | 33        | 32   |
| 4 Mar<br>2019  | 0                                    | 27,5         | 29   | 6,4      | 7,7  | 7,38 | 7,49 | 34        | 33   |
|                | 250                                  | 28           | 30   | 7,6      | 7,9  | 7,58 | 7,58 | 34        | 33   |
|                | 300                                  | 27,5         | 28   | 8,1      | 7,7  | 7,12 | 7,26 | 34        | 33   |
|                | 350                                  | 28           | 29,5 | 8,2      | 7,1  | 7,29 | 7,19 | 34        | 33   |
|                | 400                                  | 27           | 29   | 7,3      | 8,1  | 7,56 | 7,38 | 34        | 33   |
| 5 Mar<br>2019  | 0                                    | 27           | 28   | 6,7      | 6,3  | 7,58 | 7,25 | 33        | 34   |
|                | 250                                  | 27,5         | 29   | 6,5      | 6,3  | 7,65 | 7,29 | 33        | 34   |
|                | 300                                  | 28           | 29   | 6,5      | 6,7  | 7,47 | 7,58 | 33        | 34   |
|                | 350                                  | 28           | 29   | 6,7      | 6,7  | 7,54 | 7,68 | 33        | 34   |
|                | 400                                  | 28           | 29   | 6,6      | 6,8  | 7,68 | 7,14 | 33        | 34   |
| 6 Mar<br>2019  | 0                                    | 27           | 29   | 6,5      | 6,4  | 7,39 | 7,44 | 34        | 33   |
|                | 250                                  | 28           | 29   | 6,4      | 6,3  | 7,12 | 7,38 | 34        | 33   |
|                | 300                                  | 27           | 29,5 | 6,4      | 6,8  | 7,45 | 7,31 | 34        | 33   |
|                | 350                                  | 27           | 29   | 6,9      | 6,9  | 7,28 | 7,37 | 34        | 33   |
|                | 400                                  | 28           | 29   | 7,1      | 7,0  | 7,64 | 7,25 | 34        | 33   |
| 7 Mar<br>2019  | 0                                    | 27,5         | 28   | 6,9      |      | 7,82 |      | 34        |      |
|                | 250                                  | 28           | 28,5 | 7,1      |      | 7,57 |      | 34        |      |
|                | 300                                  | 27           | 28   | 7,5      |      | 7,46 |      | 34        |      |
|                | 350                                  | 27           | 28   | 7,6      |      | 7,45 |      | 34        |      |
|                | 400                                  | 28           | 28   | 7,4      |      | 7,14 |      | 34        |      |

Lampiran 4. Data SR Ikan Kerapu Cantang Selama Penelitian

| Tanggal              | Dosis <i>D. salina</i> (mg/kg) | Jumlah Ikan Hidup (ekor) | Jumlah Ikan Mati (ekor) | SR (%)                         |
|----------------------|--------------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| Senin, 25 Feb 2019   | 0                              | 10                       | 0                       | 100%<br>sebelum uji<br>tantang |
|                      | 250                            | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 300                            | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 350                            | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 400                            | 10                       | 0                       |                                |
| Selasa, 26 Feb 2019  | 0                              | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 250                            | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 300                            | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 350                            | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 400                            | 10                       | 0                       |                                |
| Rabu, 27 Feb 2019    | 0                              | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 250                            | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 300                            | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 350                            | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 400                            | 10                       | 0                       |                                |
| Kamis, 28 Feb 2019   | 0                              | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 250                            | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 300                            | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 350                            | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 400                            | 10                       | 0                       |                                |
| Jumat, 1 Maret 2019  | 0                              | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 250                            | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 300                            | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 350                            | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 400                            | 10                       | 0                       |                                |
| Sabtu, 2 Maret 2019  | 0                              | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 250                            | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 300                            | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 350                            | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 400                            | 10                       | 0                       |                                |
| Minggu, 3 Maret 2019 | 0                              | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 250                            | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 300                            | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 350                            | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 400                            | 10                       | 0                       |                                |
| Senin, 4 Maret 2019  | 0                              | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 250                            | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 300                            | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 350                            | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 400                            | 10                       | 0                       |                                |
| Selasa, 5 Maret 2019 | 0                              | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 250                            | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 300                            | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 350                            | 10                       | 0                       |                                |
|                      | 400                            | 10                       | 0                       |                                |

| Tanggal                  | Dosis <i>D. salina</i> (mg/kg) | Jumlah Ikan Hidup (ekor) | Jumlah Ikan Mati (ekor) | SR (%)                          |
|--------------------------|--------------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| Rabu, 6<br>Maret 2019    | 0                              | 10                       | 0                       | 100 %<br>setelah uji<br>tantang |
|                          | 250                            | 10                       | 0                       |                                 |
|                          | 300                            | 10                       | 0                       |                                 |
|                          | 350                            | 10                       | 0                       |                                 |
|                          | 400                            | 10                       | 0                       |                                 |
| Kamis, 7<br>Maret 2019   | 0                              | 10                       | 0                       |                                 |
|                          | 250                            | 10                       | 0                       |                                 |
|                          | 300                            | 10                       | 0                       |                                 |
|                          | 350                            | 10                       | 0                       |                                 |
|                          | 400                            | 10                       | 0                       |                                 |
| Jumat, 8<br>Maret 2019   | 0                              | 10                       | 0                       |                                 |
|                          | 250                            | 10                       | 0                       |                                 |
|                          | 300                            | 10                       | 0                       |                                 |
|                          | 350                            | 10                       | 0                       |                                 |
|                          | 400                            | 10                       | 0                       |                                 |
| Sabtu, 9<br>Maret 2019   | 0                              | 10                       | 0                       |                                 |
|                          | 250                            | 10                       | 0                       |                                 |
|                          | 300                            | 10                       | 0                       |                                 |
|                          | 350                            | 10                       | 0                       |                                 |
|                          | 400                            | 10                       | 0                       |                                 |
| Minggu, 10<br>Maret 2019 | 0                              | 4                        | 6                       | 40                              |
|                          | 250                            | 6                        | 4                       | 60                              |
|                          | 300                            | 7                        | 3                       | 70                              |
|                          | 350                            | 8                        | 2                       | 80                              |
|                          | 400                            | 9                        | 1                       | 90                              |
| Senin, 11<br>Maret 2019  | 0                              | 3                        | 1                       | 30                              |
|                          | 250                            | 4                        | 2                       | 40                              |
|                          | 300                            | 4                        | 3                       | 40                              |
|                          | 350                            | 5                        | 3                       | 50                              |
|                          | 400                            | 6                        | 3                       | 60                              |