

**EKSTRAK KASAR MIKROALGA LAUT *Chlorella vulgaris* SEBAGAI
INDUCER ANTI-INFLAMASI CLUSTER *Heat Shock Protein* PADA IKAN
KERAPU CANTANG (*Epinephelus* sp.) YANG DIINFEKSI *Viral Nervous
Necrosis* (VNN)**

TESIS



Oleh :

**AMIRA MASITHA
166080100111021**

**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIARAN
BIOTEKNOLOGI**

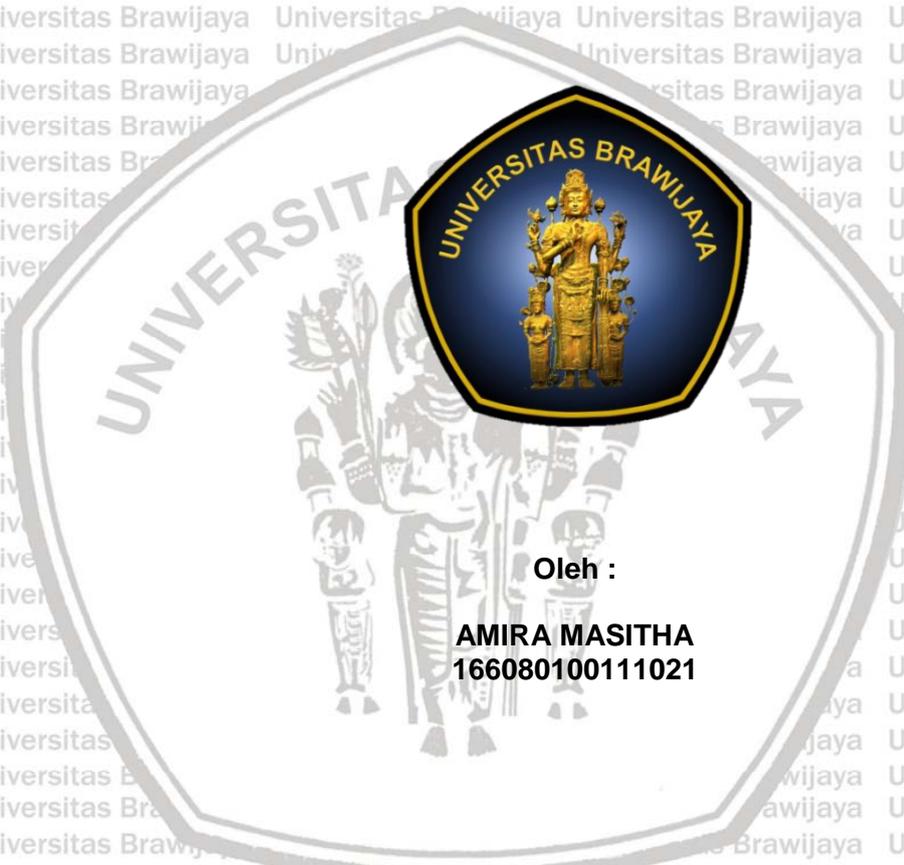
**PROGRAM PASCA SARJANA
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**



**EKSTRAK KASAR MIKROALGA LAUT *Chlorella vulgaris* SEBAGAI
INDUCER ANTI-INFLAMASI CLUSTER *Heat Shock Protein* PADA IKAN
KERAPU CANTANG (*Epinephelus* sp.) YANG DIINFEKSI *Viral Nervous
Necrosis* (VNN)**

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister**



Oleh :

**AMIRA MASITHA
166080100111021**

**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIARAN
BIOTEKNOLOGI**

**PROGRAM PASCA SARJANA
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG
2018**



**EKSTRAK KASAR MIKROALGA LAUT *Chlorella vulgaris* SEBAGAI
INDUCER ANTI-INFLAMASI CLUSTER *Heat Shock Protein* PADA IKAN
KERAPU CANTANG (*Epinephelus* sp.) YANG DIINFEKSI *Viral Nervous
Necrosis* (VNN)**

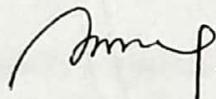
Oleh :

**AMIRA MASITHA
NIM.166080100111021**

**Telah dipertahankan di depan penguji
Pada tanggal 23 Juli 2018
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat**

Menyetujui,

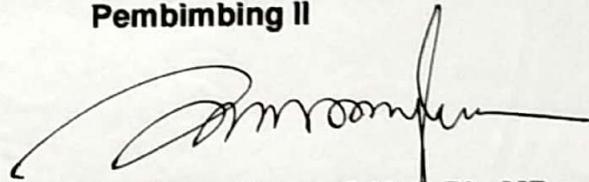
Pembimbing I



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

Tanggal : 24 JUL 2018

Pembimbing II



**Dr. Agus Maizar S.H., S.Pi., MP
NIP.19720529 20032 1 001**

Tanggal : 24 JUL 2018

Mengetahui,



**Dekan
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan**

**Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS
NIP. 19600322 198601 1 001**

Tanggal : 24 JUL 2018

JUDUL TESIS :

EKSTRAK KASAR MIKROALGA LAUT *Chlorella vulgaris* SEBAGAI INDUCER ANTI-INFLAMASI CLUSTER *Heat Shock Protein* PADA IKAN KERAPU CANTANG (*Epinephelus* sp.) YANG DIINFEKSI *Viral Nervous Necrosis* (VNN)

Nama Mahasiswa : Amira Masitha

NIM : 166080100111021

Program Studi : Budidaya Perairan

Minat Ilmu Studi : Bioteknologi

KOMISI PEMBIMBING

Ketua : Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.Si

Anggota : Dr. Asus Maizar S.H, S.Pi., MP

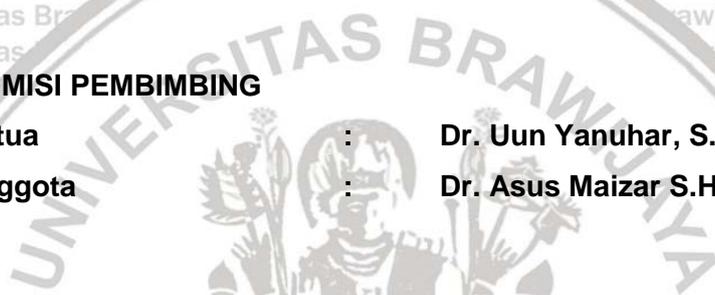
KOMISI PENGUJI

Dosen Penguji I : Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS

Dosen Penguji II : Andi Kurniawan, S.Pi, M.Eng, D.Sc.

Tanggal Ujian Tesis : 23 Juli 2018

SK Penguji :



PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan tesis ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia sanksi atas perbuatan tersebut, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 25 ayat 2 dan asal 70).

Malang, 16 Juli 2018



AMIRA MASITHA

NIM. 166080100111021

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

AMIRA MASITHA, lahir Bondowoso, Provinsi Jawa Timur pada tanggal 21 Februari 1993, dari pasangan suami-istri bapak Slamet Rijadi dan Ibu Nurul Hidayati.

Adapun riwayat pendidikan penulis yaitu pada tahun 1999 lulus dari TK At-Taqwa Bondowoso. Tahun 2005 lulus dari SD Negeri Dabasah 1 Bondowoso. Tahun 2008 lulus dari SMP Negeri 1 Bondowoso. Pada tahun

2011 lulus dari SMA Negeri 2 Bondowoso. Pada tahun 2015 lulus dari Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang. Pada tahun 2016

penulis melanjutkan pendidikan di Program Pendidikan Strata Dua (S2)

Magister Budidaya perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang. Saat menempuh program S1 penulis membuat tugas akhir

(Skripsi) dengan judul "Pemanfaatan *Fragmen Pigmen Protein* Mikroalga *Chlorella vulgaris* Yang Diuji Secara In Vivo Pada Ikan Kerapu Tikus

(*Cromileptes altivelis*)". Saat menempuh program S2 penulis membuat tugas akhir (Tesis) yang berjudul "Ekstrak Kasar Mikroalga Laut *Chlorella vulgaris*

Sebagai Inducer Anti-inflamasi Cluster *Heat Shock Protein* Pada Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp) yang Diinfeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN)".

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Terimakasih yang dalam penulis persembahkan Kedua orang tua yaitu ayahanda Slamet Rijadi dan Ibu Nurul Hidayati, kakak tersayang Iqbal Rizqhie Yustisi dan Mbak Erfin Yuliani serta seluruh keluarga besar terima kasih atas do'a, semangat, kasih sayang dan dukungannya.
2. Ibu Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si dan Dr. Asus Maizar S.H. S.Pi, MP. selaku dosen pembimbing yang telah membimbing dan mengarahkan penulis dalam menyelesaikan laporan Skripsi ini.
3. Ibu Prof. Dr. Ir. Sri Andayani MS dan Bapak Andi Kurniawan S.Pi, M. Eng, D.Sc selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan masukan yang bermanfaat dan membangun bagi penulis.
4. Teman-teman tim Alga 2018, Yovan Endik, Feri Setiawan, Nico R. Caesar, Muhamad Sumsanto, Ilham Alhamidy, Raden Qonitah, Miftaql R., Fahrizal V., Kurnia Rifki, Ayu N., Nur Hasna, dan fadhilah H. yang sabar dan luar biasa yang saling memberi memotivasi kepada penulis.
5. Teman-teman *private group*, Dikla Jatayu, Gede Angga, Rusmawanto, dan Hadi Prasetyo yang luar biasa saling memberi motivasi kepada penulis.
6. Teman-teman Ciliped, Erlita, Vina, Fitri, Lisa, Novi, Bunga, Shinta, Ima, Elsa yang luar biasa saling memberi motivasi kepada penulis.
7. Muhammad N.H. Ridlo yang selalu mendukung, dan memberikan semangat kepada penulis.
8. Rekan-rekan Paska Sarjana FPIK UB yang banyak memberikan bantuan ikut berperan dalam memperlancar dalam menyelesaikan laporan praktek kerja lapang ini.
9. Kepada berbagai pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu per satu yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan laporan Studi Lapangan ini.

Malang, 16 Juli 2018

Amira Masitha

RINGKASAN

AMIRA MASITHA (166080100111021). Program Studi Magister Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang, 22 Februari 2018. Ekstrak Kasar Mikroalga Laut *Chlorella vulgaris* Sebagai Inducer Anti-Inflamasi Cluster *Heat Shock Protein* Pada Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.) yang Diinfeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN). Komisi Pembimbing, **Dr. Uun Yanuhar., S.Pi., M.Si., dan Dr. Asus Maizar S.H. S.Pi, MP.**

Budidaya ikan kerapu saat ini masih menjadi pilihan karena ikan jenis ini memiliki nilai ekonomis di pasar internasional. Salah satu kerapu yang dibudidayakan di Indonesia adalah kerapu cantang. Kerapu cantang merupakan hasil persilangan antara ikan kerapu macan dengan ikan kerapu kertang (*Epinephelus lanceolatus*). Ikan kerapu cantang saat ini memiliki nilai yang tinggi baik di Internasional dan pasar lokal. Namun, kerapu cantang hibrida ini mengalami penurunan produksi akibat beberapa tekanan lingkungan termasuk buruknya kualitas air sehingga ikan kerapu cantang dari waktu ke waktu rentan terhadap infeksi virus, bakteri, stres yang mengakibatkan buruknya pertumbuhan dan akhirnya mengalami kematian. Virus merupakan salah satu penyebab hilangnya industri budidaya kerapu. Virus yang sering menginfeksi ikan ini salah satunya adalah *Viral Nervous Necrosis* (VNN). Di Indonesia sendiri penyakit ini pertama kali ditemukan di daerah Banyuwangi pada budidaya ikan kerapu putih. Stadia larva dan juvenile merupakan stadia yang rentan terinfeksi VNN dapat menyebabkan kematian massal hingga 100%. Infeksi VNN dapat memicu inflamasi dalam jaringan ikan. Inflamasi merupakan respon penting yang diberikan oleh sistem kekebalan tubuh yang akan menjamin kelangsungan hidup selama infeksi dan cedera jaringan.

Terkait inflamasi yang diakibatkan virus, penanggulangan yang berasal dari bahan-bahan alami belum banyak dikembangkan. Salah satunya yaitu penggunaan senyawa bioaktif mikroalga. *Chlorella vulgaris* merupakan salah satu jenis mikroalga yang memiliki banyak kandungan didalamnya. Pigmen protein yang terkandung didalamnya cukup kompleks yaitu seperti protein, vitamin, mineral, karbohidrat, lemak, klorofil serta beta karoten. Protein merupakan komposisinya yang paling banyak terkandung dalam *C. vulgaris*. Asam amino yang terkandung didalamnya antara lain arginin, fenilalanin, histidin, isoleusin, leusin, lisin, metionin, treonin, triptofan, dan valin. Sedangkan pigmen yang terkandung pada mikroalga ini antara lain α -karoten, β -karoten, noexantin, lutein, violaxantin, anteraxantin dan zeaxantin.

Berkaitan dengan proses inflamasi akibat infeksi virus seperti VNN, saat ini mulai diteliti salah satu molekul anti-inflamasi yaitu *heat shock protein* (Hsp). Hsp adalah keluarga protein yang dinyatakan sebagai respons terhadap berbagai macam pemicu biotik dan abiotik. Mereka juga disebut sebagai protein stres. Protein ini telah dikelompokkan menjadi beberapa keluarga berdasarkan berat molekulnya seperti Hsp90 (85-90 kDa), Hsp70 (68-73 kDa), Hsp60, Hsp47, dan Hsps kecil (12-43 kDa). Reaksi inflamasi juga dapat ditandai dengan terekspresinya Hsp. Hsp secara alami terdapat dalam tubuh ikan yang secara fisiologis merupakan sarana adaptasi bagi ikan untuk menghadapi stress. Hsp memiliki peran dalam kekebalan tubuh terhadap infeksi yang berfungsi sebagai antigen penting dalam pertahanan melawan agen infeksius. Penelitian ini akan memanfaatkan ekstrak kasar *C. vulgaris* untuk dijadikan sebagai inducer anti-inflamasi pada ikan kerapu cantang (*Epinephelus* sp) yang diinfeksi VNN.

Harapannya adalah penginduksian ekstrak kasar *C. vulgaris* mampu meningkatkan ekspresi Hsp sebagai bentuk respon anti-inflamasi akibat serangan VNN.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui manfaat ekstrak kasar *C. vulgaris* terhadap ekspresi dari Hsp sebagai inducer anti-inflamasi akibat infeksi VNN pada ikan kerapu cantang (*Epinephelus sp*). Metode yang digunakan adalah metode eksperimental. Metode analisis yang digunakan antara lain uji Fitokimia, Uv-Vis, FTIR, RT-PCR dan Imunohistokimia (IHK). Pengamatan dilakukan pada penelitian ini dalam pengamatan pada ikan kontrol positif, ikan kontrol negatif (pemberian VNN), ikan perlakuan ekstrak kasar *C. vulgaris* dengan dosis 17 µg/mL (C1), ikan dengan perlakuan ekstrak kasar *C. vulgaris* dengan dosis 33 µg/mL (C2), ikan dengan perlakuan ekstrak kasar *C. vulgaris* dengan dosis 50 µg/mL (C3), ikan dengan perlakuan ekstrak kasar *C. vulgaris* dengan dosis 17 µg/mL dan penginfeksi VNN (CV1), ikan dengan perlakuan ekstrak kasar *C. vulgaris* dengan dosis 33 µg/mL dan penginfeksi VNN (CV2), serta ikan dengan perlakuan ekstrak kasar *C. vulgaris* dengan dosis 50 µg/mL dan penginfeksi VNN (CV3). Aktifitas ekstrak kasar *C. vulgaris* diamati pada organ otak ikan uji berdasarkan ekspresi Hsp sebagai penanda respon anti-inflamasi.

Hasil dari penelitian ini yaitu pada identifikasi senyawa yang terkandung dalam ekstrak *C. vulgaris* menggunakan skrining fitokimia adalah alkaloid, terpenoid dan tanin. Setelah dianalisa lanjutan dengan menggunakan UV-Vis dan FT-IR didapatkan bahwa senyawa yang dominan pada ekstrak *C. vulgaris* dimungkinkan adalah senyawa dari golongan terpenoid. Hasil uji in-vivo ekstrak *C. vulgaris* yang dilakukan pada ikan kerapu cantang didapatkan bahwa pada perlakuan yang diinfeksi VNN (perlakuan K-, CV1, CV2 dan CV3), setelah diuji menggunakan RT-PCR positif Hsp70 dengan munculnya band 562 bp. Setelah dianalisa lebih lanjut menggunakan IHK didapatkan hasil secara kuantitatif yaitu munculnya persentase DAB. Persentase DAB dari Hsp70 tertinggi yaitu pada perlakuan CV2 yaitu perlakuan penambahan ekstrak *C. vulgaris* sebanyak 33 µg/mL dan infeksi VNN.



SUMMARY

AMIRA MASITHA (166080100111021). Magister of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Marine Sciences, Brawijaya University, Malang. Crude Extract of *Chlorella vulgaris* as Inducer Anti-Inflammatory Cluster *Heat Shock Protein* In Cantang Grouper (*Epinephelus* sp.) Infected By *Viral Nervous Necrosis* (VNN). Supervising Commission, **Dr. Uun Yanuhar., S.Pi., M.Si., and Dr. Asus Maizar S.H. SPi, MP.**

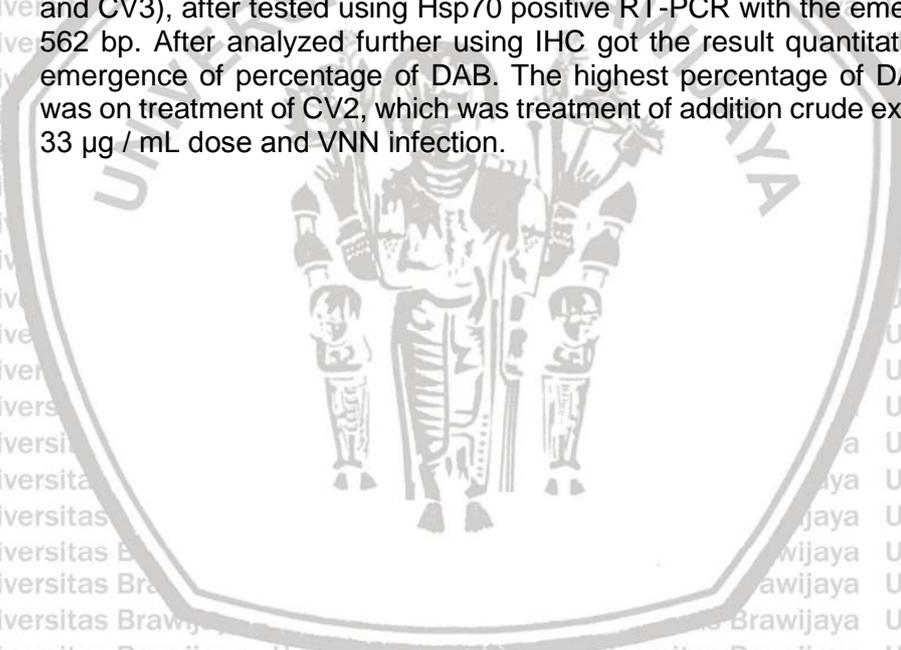
Grouper fish farming is still an option because this fish has economic value in the international market. One of grouper cultivated in Indonesia is cantang grouper. Cantang grouper is the result of a cross between tiger grouper with giant groupers (*Epinephelus lanceolatus*). Grouper fish has a high value both in the International and local markets. However, this hybrid grouper has decreased production due to some environmental pressures including poor water quality, so that grouper from time to time are susceptible to viral, bacterial infections, stress resulting in poor growth and ultimately death. Virus is one cause of loss in grouper cultivation industry. Viruses that often infect fish, one of them is *Viral Nervous Necrosis* (VNN). In Indonesia, this disease was first found in the area of Banyuwangi on the cultivation of grouper white. Stadia larvae and juveniles are susceptible stadia infected with VNN can cause 100% mass mortality. VNN infection can trigger inflammation in fish tissues. Inflammation is an important response provided by the immune system that will ensure survival during infection and tissue injury.

Associated with inflammation caused by viruses, countermeasures derived from natural ingredients have not been widely developed. One of them is the use of microalgae bioactive compounds. *Chlorella vulgaris* is one type of microalgae has many contents in it. Protein pigments contained are quite complex such as proteins, vitamins, minerals, carbohydrates, fats, chlorophyll and beta carotene. Protein is the most widely contained composition in *C. vulgaris*. Amino acids contained include arginine, phenylalanine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, threonine, tryptophan, and valine. While the pigments contained in this microalgae include α -carotene, β -carotene, noexantin, lutein, violaxanthin, anteraxanthin and zeaxanthin.

Associated with the inflammatory process due to viral infections such as VNN, currently began to be investigated one of the anti-inflammatory molecules, that is *heat shock protein* (Hsp). Hsp is a family of proteins expressed in response to various kinds of biotic and abiotic triggers. They are also referred to as stress proteins. These proteins have been grouped into several families based on their molecular weight such as Hsp90 (85-90 kDa), Hsp70 (68-73 kDa), Hsp60, Hsp47, and small Hsps (12-43 kDa). Inflammatory reactions can also be marked by Hsp expression. Hsp is naturally present in fish body which is physiologically means of adaptation for fish to deal with stress. Hsp has a role in immune to infection that serves as an important antigen in defense against infectious agents. The present study will utilize the crude extract of *C. vulgaris* to serve as an anti-inflammatory inducer in groupers (*Epinephelus* sp VNN-infected). We wished the induction of crude extract of *C. vulgaris* able to increase Hsp expression as a form of anti-inflammatory response due to VNN attack.

The aim of this research is to know the benefit of crude extract of *C. vulgaris* to expression of Hsp as anti-inflammatory inducer due to VNN infection in grouper (*Epinephelus sp*). The method that used is experimental. Analytical methods used include Phytochemical, Uv-Vis, FTIR, RT-PCR and Immunohistochemistry (IHC) tests. Observations were performed in this study in observation of positive control fish, negative control fish (VNN infected), fish treatment of crude extract of *C. vulgaris* with a dose of 17 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (C1), fish with treatment of crude extract of *C. vulgaris* with a dose of 33 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (C2), fish with treatment of rude extract of *C. vulgaris* with dose of 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (C3), fish treated with crude extract of *C. vulgaris* with 17 $\mu\text{g} / \text{mL}$ dose and VNN infaction (CV1), fish with crude extract treatment *C. vulgaris* with a dose of 33 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and VNN infaction (CV2), as well as fish treated with crude extract of *C. vulgaris* with a dose of 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and VNN infaction (CV3). The activity of crude extract of *C. vulgaris* was observed in brain organ of test fish based on Hsp expression as a marker of anti-inflammatory response.

The results of this study were on identification of compounds contained crude extract *C. vulgaris* using phytochemical screening were alkaloids, terpenoids and tannins. After further analysis using UV-Vis and FTIR it was found that the dominant compound of crude extract *C. vulgaris* is possible from terpenoid compounds. The results of in-vivo test crude extract of *C. vulgaris* conducted on grouper fish were found that in VNN infected treatments (treatment K-, CV1, CV2 and CV3), after tested using Hsp70 positive RT-PCR with the emergence of band 562 bp. After analyzed further using IHC got the result quantitatively that is the emergence of percentage of DAB. The highest percentage of DAB from Hsp70 was on treatment of CV2, which was treatment of addition crude extract *C. vulgaris* 33 $\mu\text{g} / \text{mL}$ dose and VNN infection.



KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan syukur kehadiran Allah SWT karena atas berkat limpahan rahmat, taufik dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan laporan tesis yang berjudul Ekstrak Kasar Mikroalga Laut *Chlorella vulgaris* Sebagai Inducer Anti-Inflamasi Cluster *Heat Shock Protein* Pada Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.) yang Diinfeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN).

Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat meraih gelar Magister Perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

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

Malang, 16 Juli 2018

Amira Masitha



DAFTAR ISI

RINGKASAN	viii
SUMMARY	x
KATA PENGANTAR	xii
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR TABEL	xx
DAFTAR LAMPIRAN	xxi
GLOSARIUM	xxii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	4
1.4.2 Manfaat Praktis.....	5
1.5 Waktu dan Tempat.....	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Kerapu Cantang (<i>Epinephelus sp</i>).....	6
2.1.1 Morfologi.....	6
2.1.2 Reproduksi dan Daur Hidup.....	8
2.1.3 Habitat dan Kebiasaan Makan.....	9
2.1.4 Faktor Lingkungan.....	10
2.2 Sistem Kekebalan Tubuh Ikan Kerapu Cantang (<i>Epinephelus sp</i>).....	10

2.2.1 Sistem Imun Non-Spesifik (<i>Innate</i>).....	12
2.2.2 Sistem Imun Spesifik (<i>Adaptive</i>).....	17
2.3 Pengenalan Antigen Oleh Reseptor.....	19
2.3.1 Heat Shock Protein (Hsp).....	20
2.3.2 Fungsi Hsp.....	21
2.3.3 Proses molekuler berhubungan dengan ekspresi HSP.....	21
2.3.4 Mekanisme Hsp Sebagai Penanda Reaksi Inflamasi.....	22
2.4 Virus RNA.....	23
2.4.1 <i>Viral Nervous Necrosis</i> (VNN).....	24
2.4.2 Karakteristik dan Distribusi <i>viral nervous necrosis</i>	25
2.4.3 Transmisi dan Mekanisme <i>viral nervous necrosis</i>	26
2.4.4 Gejala Klinis infeksi <i>viral nervous necrosis</i>	26
2.5 Inflamasi.....	27
2.6 PCR dan RT-PCR.....	29
2.7 <i>Chlorella vulgaris</i>	30
2.7.1 Morfologi.....	31
2.7.2 Reproduksi.....	32
2.7.3 Fase Pertumbuhan.....	33
2.7.4 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan.....	35
2.8 Bioaktif Peptida Alami.....	39
2.8.1 Pigmen Protein.....	39
2.8.2 Karotenoid.....	41
2.8.3 Fikobiliprotein.....	42
2.9 Acuan Penggunaan Dosis untuk Uji In-Vivo Ekstrak <i>C. vulgaris</i>	43
3. KONSEP PENELITIAN.....	44
3.1 Landasan Teori.....	44
3.2 Kerangka Konsep Penelitian.....	47
3.3 Hipotesis.....	48

3.4	Kerangka Operasional Penelitian	49
3.5	Penelitian Terdahulu.....	53
3.6	Kebaruan Penelitian	54
3.7	Strategi Publikasi.....	54
4.	MATERI DAN METODE PENELITIAN.....	56
4.1	Materi Penelitian.....	56
4.2	Waktu dan Tempat	56
4.3	Bahan dan Alat.....	56
4.4.1	Alat-alat.....	56
4.4.2	Bahan-bahan	57
4.4	Metode Penelitian.....	58
4.5	Prosedur Penelitian	59
4.6.1	Ekstraksi <i>Chlorella vulgaris</i>	59
4.6.2	Skrining Fitokimia.....	60
4.6.3	Analisis Spektroskopi UV-Vis	61
4.6.4	Analisis FT-IR (<i>Fourier Transform Infra Red</i>)	62
4.6.5	Aklimatisasi Ikan Kerapu Cantang (<i>Epinephelus</i> sp)	63
4.6.6	Uji <i>in-vivo</i> Ekstrak Kasar <i>C. vulgaris</i> pada Ikan Kerapu Cantang (<i>Epinephelus</i> sp).....	65
4.6.7	Uji Tantang <i>in-vivo</i> VNN pada Ikan Kerapu Cantang (<i>Epinephelus</i> sp)	66
4.6.8	Deteksi <i>Viral Nervous Necrosis</i> (VNN).....	66
4.6.9	Deteksi <i>Heat Shock protein</i> (Hsp)	69
4.6.10	IHK.....	71
4.6.11	Analisa Data	73
4.6	Matriks Variabel Penelitian	74
5.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	75
5.1	Biologi Hewan Uji Ikan Kerapu Cantang (<i>Epinephelus</i> sp).....	75

5.2 Hasil Ekstraksi <i>Chlorella vulgaris</i>	76
5.3 Hasil Analisis Skrining Fitokimia.....	77
5.4 Hasil Analisis Spektroskopi Uv-Vis.....	79
5.5 Hasil Analisis FT-IR (<i>Fourier Transform Infra Red</i>).....	80
5.6 Aklimatisasi Ikan Kerapu Cantang (<i>Epinephelus</i> sp).....	82
5.7 Hasil Uji In-vivo Kerapu Cantang (<i>Epinephelus</i> sp).....	83
5.8 Hasil Amplifikasi nested RT-PCR VNN.....	85
5.9 Respon Immunologi Sel Darah pada Organ Target.....	87
5.10 Hasil Amplifikasi RT-PCR dan Immunohistokimia Ekspresi <i>Heat Shock Protein</i>	93
5.10.1 Hasil Amplifikasi RT-PCR Hsp70.....	93
5.10.2 Hasil analisis Immunohistokimia Hsp.....	96
5.11 Analisa Data Hasil Penelitian.....	110
6. KESIMPULAN DAN SARAN.....	112
6.1 Kesimpulan.....	112
6.2 Saran.....	112
DAFTAR PUSTAKA.....	113
LAMPIRAN	129

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Ikan kerapu cantang (*Epinephelus* sp)..... 7

Gambar 2. Skema sistem kekebalan tubuh..... 11

Gambar 3. Konsep Sistem Imun Ikan..... 12

Gambar 4. Pandangan integratif imunitas bawaan pada vertebrata. 14

Gambar 5. Kompleks Kaperon Hsp..... 20

Gambar 6. Model peran heat shock factor (HSF1) dalam regulasi ekspresi heat shock protein 22

Gambar 7. Viral Nervous Necrosis (VNN) 25

Gambar 8. Jalur Primer Inflamasi..... 29

Gambar 9. Struktur Sel *C.vulgaris*..... 32

Gambar 10. Fase pembentukan dinding sel pada *Chlorella vulgaris*..... 33

Gambar 11. Kurva pertumbuhan mikroalga..... 33

Gambar 12. Mekanisme aksi anti-inflamasi potensial peptida bioaktif dan protein peptida hidrolisat 41

Gambar 13. Kerangka Konseptual Penelitian..... 47

Gambar 14. Kerangka Operasional Penelitian Tahap 1..... 49

Gambar 15. Diagram Alir Proses Ekstraksi *C. vulgaris*..... 50

Gambar 16. Kerangka Operasional Penelitian Tahap 2..... 51

Gambar 17. Diagram Alir Proses Aklimatisasi Ikan Kerapu Cantang..... 52

Gambar 18. Hewan uji penelitian, ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp) 75

Gambar 19. (A) Proses Maserasi dan (B) Proses Evaporasi..... 76

Gambar 20. (A) Uji Senyawa Flavonoid Negatif (-), (B) Uji Senyawa Saponin Negatif (-), (C) Uji Senyawa Tanin Positif (+), (D) Uji Senyawa Terpenoid Positif (+), (E) Uji Senyawa Alkaloid Positif (+)..... 79

Gambar 21. Hasil Analisa Spektroskopi UV-Vis Ekstrak <i>C. vulgaris</i>	79
Gambar 22. Hasil Analisis FTIR Ekstrak <i>C. vulgaris</i>	81
Gambar 23. Ikan kerapu cantang dalam masa aklimatisasi.....	82
Gambar 24. Hasil amplifikasi nested RT-PCR dengan band VNN 294 bp pada organ target VNN yaitu otak	85
Gambar 25. Intensitas band 294 bp virus RNA VNN pada organ otak.....	86
Gambar 26. Grafik respon imunologi organ otak ikan kerapu cantang	88
Gambar 27. Hasil amplifikasi RT-PCR ekspresi Hsp70 pada oragn otak kerapu cantang.	94
Gambar 28. Hasil analisa semikuantitatif intensitas band 562 bp hsp70 pada organ otak.	95
Gambar 29. Hasil ImmunoRatio Organ Otak Ikan Kerapu Cantang Kontrol (K+).	97
Gambar 30. Grafik data persentase DAB pengulangan pada perlakuan K+ (tanpa pemberian perlakuan ekstrak <i>C. vulgaris</i> dan infeksi VNN)	98
Gambar 31. Hasil ImmunoRatio Organ Otak Ikan Kerapu Cantang Perlakuan VNN (K-).....	98
Gambar 32. Grafik data persentase DAB pengulangan pada perlakuan K- (perlakuan pemberian virus VNN).....	99
Gambar 33. Hasil ImmunoRatio Organ Otak Ikan Kerapu Cantang Perlakuan C1	100
Gambar 34. Grafik data persentase DAB pengulangan pada perlakuan C1 (pemberian ekstrak <i>C. vulgaris</i> dengan dosis 17 µg/mL).	100
Gambar 35. Hasil ImmunoRatio Organ Otak Ikan Kerapu Cantang Perlakuan C2.	101
Gambar 36. Grafik data persentase DAB pengulangan pada perlakuan C2 (pemberian ekstrak <i>C. vulgaris</i> dosis 33 µg/mL)	102

Gambar 37. Hasil ImmunoRatio Organ Otak Ikan Kerapu Cantang Perlakuan C3.

102

Gambar 38. Grafik data persentase DAB pengulangan pada perlakuan C3

(pemberian ekstrak C. vulgaris dengan dosis 50 µg/mL)103

Gambar 39. Hasil ImmunoRatio Organ Otak Ikan Kerapu Cantang Perlakuan CV1

104

Gambar 40. Grafik data pengulangan pada perlakuan CV1 (pemberian ekstrak C.

vulgaris dengan dosis 17 µg/mL dan infeksi VNN) 105

Gambar 41. Hasil ImmunoRatio Organ Otak Ikan Kerapu Cantang Perlakuan CV2.

105

Gambar 42. Grafik data pengulangan pada perlakuan CV2 (pemberian ekstrak C.

vulgaris dengan dosis 33 µg/mL dan infeksi VNN)106

Gambar 43. Hasil ImmunoRatio Organ Otak Ikan Kerapu Cantang Perlakuan CV3.

107

Gambar 44. Grafik data pengulangan pada perlakuan CV3 (pemberian ekstrak C.

vulgaris dengan dosis 50 µg/mL dan infeksi VNN) 108

Gambar 45. Grafik data nilai rata-rata perubahan ekspresi Hsp70 pada ikan

kerapu cantang108

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Penelitian terdahulu yang menggunakan ekstrak mikroalga laut.....	53
Tabel 2. Susunan Bahan Amplifikasi.....	68
Tabel 3. Kondisi Amplifikasi nested RT-PCR.....	68
Tabel 4. Susunan Primer Penentuan HSP.....	70
Tabel 5. Susunan Bahan Amplifikasi nested RT-PCR HSP.....	70
Tabel 6. Kondisi Amplifikasi nested RT-PCR HSP.....	71
Tabel 7. Analisa sidik ragam.....	73
Tabel 8. Matriks Variabel Penelitian.....	74
Tabel 9. Hasil Uji Fitokimia ekstrak kasar <i>C. vulgaris</i>	77
Tabel 10. Hasil Uji Uv-Vis Ekstrak <i>C. vulgaris</i>	80
Tabel 11. Hasil FT-IR ekstrak <i>C. vulgaris</i>	81
Tabel 12. Hasil kualitas air media hidup ikan kerapu cantang (<i>Epinephelus</i> sp).....	82
Tabel 13. Hasil pengamatan tingkah laku hewan uji.....	84
Tabel 14. Hasil rata-rata penghitungan sel sebagai respon imunologi pada jaringan otak.....	92

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Dokumentasi Selama Proses Penelitian129

Lampiran 2. Data Kualitas Air Media Hidup Hewan Uji131

Lampiran 3. Data Perhitungan Darah Pada Respon Immunologi Organ
Otak133

Lampiran 4. Analisis data135



GLOSARIUM

ISTILAH	PENJELASAN
<i>Adlibitum</i>	Pemberian pakan ke dalam perairan sedikit demi sedikit hingga ikan kenyang.
Antibodi	Molekul yang terbentuk dalam tubuh hewan dan manusia sebagai tanggapan terhadap adanya antigen.
Antigen	Substansi yang biasanya berupa protein yang mampu menstimulasi organisme untuk memproduksi antibodi dan mampu berkombinasi sehingga diproduksi antibodi.
Anti-inflamasi	Zat yang dapat menghilangkan radang yang disebabkan bukan karena mikroorganisme (non infeksi), namun yang timbul sebagai respon cedera jaringan dan infeksi.
Apoptosis	Aksi bunuh diri sel yang dikenal juga sebagai kematian terprogram, di mana program bunuh diri ini diaktivasi dan diregulasi oleh sel itu sendiri
<i>Damage associated Molecular Pattern (DAMPs)</i>	Biomolekul inang yang dapat memulai dan mengabadikan respons inflamasi noninfeksius.
<i>Heat shock factor (HSF)</i>	Faktor transkripsi yang mengatur ekspresi protein kejutan panas (Hsp).
<i>Heat shock protein (HSP)</i>	Keluarga protein yang diproduksi oleh sel sebagai respons terhadap paparan dari kondisi stres.
<i>Heat shock response (HSR)</i>	Respon molekular yang dapat diinduksi terhadap terganggunya homeostasis protein yang menghasilkan ekspresi gen sitoprotektif yang tinggi yang melindungi proteom.
Homeostatis	Mekanisme tubuh untuk mempertahankan keseimbangan dalam menghadapi berbagai kondisi yang dialaminya

Host	Organisme yang menampung virus, parasit, partner mutualisme, atau partner komensalisme, umumnya dengan menyediakan makanan dan tempat berlindung.
Infeksi	Pengenalan agen infeksi seperti virus atau bakteri ke dalam host sel atau organisme.
Inflamasi	Upaya tubuh untuk perlindungan diri, tujuannya adalah untuk menghilangkan rangsangan berbahaya, termasuk sel-sel yang rusak, iritasi, atau patogen dan memulai proses penyembuhan.
Interferon	Molekul sitokin berupa protein berjenis glikoprotein yang disekresi oleh sel vertebrata karena akibat rangsangan biologis, seperti virus, bakteri, protozoa, mycoplasma, mitogen, dan senyawa lainnya.
Immunity	Sistem imun yang berperan melawan protein tubuh dan molekul lain seperti yang terjadi pada autoimun dan melawan sel yang teraberasi.
Ligan	Protein adhesin/ senyawa kompleks bertindak sebagai donor pasangan elektron
Limfosit B	Sel-sel dalam sistem imun yang mengkhususkan diri dalam pembentukan antibodi
Limfosit T	Sel-sel yang berperan pada berbagai fungsi imunologi yang berbeda, yaitu sebagai efektor pada respons imun seluler dan sebagai regulator yang akan mengatur kedua respons imun
Necrosis	Sekelompok sel yang mengalami perubahan atau kematian tanpa terprogram
<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> (PAMPs)	Biomolekul inang yang dapat memulai dan mengabadikan respon inflamasi yang disebabkan oleh patogen.
Preparasi jaringan	Teknik pemotongan organ target penyakit virus tertentu untuk memudahkan dalam proses jaringan
Prokariotik	Organisme yang tidak memiliki membran inti
Reseptor	Bagian target pada tingkat molekuler yang mengelilingi substansi sebagai hasil dari interaksi spesifik. Bagian organisme yang merespon terhadap stimuli spesifik

	seperti chemoreseptor, osmoreseptor atau potoreseptor
Sistem Imun	Sistem pertahanan atau kekebalan tubuh, yang terdiri dari Sistem imun <i>Innate</i> dan Sistem imun <i>Adaptive</i>
Sistem imun <i>Adaptive</i>	Sistem imun daptan yang mempunyai ciri ;(1) memiliki spesifitas yang dapat membedakan tiap-tiap molekul dari agen penginfeksi dan (2) memiliki sistem memori yang mampu untuk mengingat agen penginfeksi yang pernah masuk atau terpapar di dalam tubuhnya
Sistem imun <i>Innate</i>	Sistem kekebalan alami atau system imun non spesifik yang merupakan pertahanan tubuh terdepan dalam menghadapi berbagai antigen.
Sitokin	Sitokin merupakan glikoprotein yang dapat larut ketika dilepaskan oleh sel system immune (disekresi terutama dari leukosit) yang berperan dalam non <i>enzmatically</i> reseptor spesifik untuk meregulasi respon imun.
Teleostei	Ikan bertulang keras
<i>Toll Like Receptor</i> (TLR)	Reseptor pada membran sel atau kelompok protein pada membran sel sebagai reseptor yang secara luas mengenal molekul mikroba serta dapat stimulasi respon innate imun bawaan.
<i>Viral nervous necrisos</i> (VNN)	Jenis virus Nodaviridae yang menyerang sebagian besar ikan.
Virus	Suatu partikel yang mengandung bahan genetik berupa DNA atau RNA yang diselubungi oleh protein dan pada beberapa virus ada juga komponen lain, misalnya lemak

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ikan Kerapu merupakan salah satu komoditas unggulan perikanan budidaya laut yang memiliki nilai ekonomis yang tinggi serta harga yang mahal dan merupakan komoditas ekspor (Triastuti *et al.*, 2018). Jumlah produksi ikan kerapu di Indonesia selama tahun 2015 mencapai 8.972 ton dan memiliki meningkat menjadi 15.089 ton pada kuartal ketiga 2016 (Dirjen Perik. Bud. KKP, 2016). Jumlah total kerapu hidup yang diekspor selama 2016 mencapai 4.006.852 ton (BKIPMSTATISTIK, 2017). Salah satu kerapu yang dibudidayakan di Indonesia adalah kerapu cantang. 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*) (Ismi *et al.*, 2014). Namun, kerapu cantang hibrida ini mengalami penurunan produksi akibat beberapa tekanan lingkungan termasuk buruknya kualitas air sehingga ikan kerapu cantang dari waktu ke waktu rentan terhadap infeksi virus, bakteri, stres yang mengakibatkan buruknya pertumbuhan dan akhirnya mengalami kematian (Noor *et al.*, 2018).

Penyakit yang sering menginfeksi ikan ini salah satunya adalah *Viral Nervous Necrosis* (VNN) (Rahmana *et al.*, 2013). Virus ini salah satu penyebab hilangnya industri budidaya kerapu. Di Indonesia sendiri penyakit ini pertama kali ditemukan di daerah Banyuwangi pada budidaya ikan kerapu putih. Virus VNN telah banyak dilaporkan menginfeksi ikan laut yang dibudidayakan dan telah ditetapkan dalam Kepmen nomor 26 tahun 2013 sebagai Hama Penyakit Ikan Karantina (HPIK) Golongan I. VNN melemahkan sistem saraf ikan sehingga ikan akan kehilangan saraf kontrol, terjadi kelemahan gerak, dan akhirnya kematian

(Yanuhar, 2011). Stadia larva dan juvenile merupakan stadia yang rentan terinfeksi VNN dapat menyebabkan kematian missal hingga 100% (Eka *et al.*, 2012). VNN ini umumnya menyerang sistem organ syaraf mata dan otak yang dapat menyebabkan kelainan pada ikan yang diserang.

Infeksi VNN dapat memicu inflamasi dalam jaringan ikan. Inflamasi merupakan respon penting yang diberikan oleh sistem kekebalan tubuh yang akan menjamin kelangsungan hidup selama infeksi dan cedera jaringan, dimana respon inflamasi ini sangat penting untuk pemeliharaan homeostatis jaringan normal (Ahmed, 2011). Menanggapi stimulan seperti infeksi virus, inflamasi atau peradangan biasanya dimulai beberapa menit di setiap *host* dengan sistem kekebalan bawaan fungsional. Seperti sistem kekebalan tubuh bawaan merupakan penyumbang utama inflamasi, sel kekebalan tubuh seperti makrofag, sel dendritik, sel mast, neutrofil dan limfosit memainkan peran penting dalam respon inflamasi (Akira *et al.*, 2006).

Berkaitan dengan infeksi virus dan penyakit, saat ini mulai diteliti suatu bagian kecil dari sistem kekebalan tubuh ikan yaitu heat shock protein (Hsp). Hsp secara alami terdapat dalam tubuh ikan yang secara fisiologis merupakan sarana adaptasi bagi ikan untuk menghadapi stress (Cahyadi *et al.*, 2004). Dalam beberapa studi dijelaskan bahwa Hsp memiliki peran dalam kekebalan tubuh terhadap infeksi yang berfungsi sebagai antigen penting dalam pertahanan melawan agen infeksius (Kaufmann, 1990). Hsp diketahui menginduksi kekebalan humoral dan selular yang sangat kuat terhadap banyak infeksi. Salah satu fungsi Hsp dalam sistem imun ikan yaitu berperan dalam proses antigen-Hsp. (Zu'gel *et al.*, 1999). Reaksi inflamasi juga dapat ditandai dengan terekspresinya Hsp (Yanuhar *et al.*, 2015). Peningkatan kadar Hsp berfungsi untuk merangsang respon inflamasi. Dalam jalur inflamasi akibat infeksi virus, ekspresi *Heat shock protein 70* (Hsp70) meningkat sehingga memberikan sitoproteksi dengan

menghambat dan memblokir komponen jalur sinyal inflamasi, seperti faktor transkripsi NF- κ B.

Inducer anti-inflamasi yang berasal dari bahan-bahan alami belum banyak dikembangkan, yaitu salah satunya penggunaan senyawa bioaktif mikroalga.

Chlorella vulgaris merupakan salah satu jenis mikroalga hijau bersel satu yang dapat tumbuh dan ditemui di daerah-daerah beriklim hangat. *C. vulgaris* memiliki banyak kandungan didalamnya yaitu mencakup protein, vitamin, mineral, karbohidrat, lemak, klorofil serta beta karoten (Tang dan Paolo, 2011). Dimana

protein merupakan kandungan yang paling dominan pada *C. vulgaris* yaitu sebesar 60%. *C. vulgaris* juga memiliki kandungan beberapa jenis pigmen seperti violaxanthin dan β -karoten merupakan jenis karotenoid yang memiliki kandungan antioksidan tinggi (Biehler *et al.*, 2012). Selain sebagai antioksidan, ekstrak kasar *C. vulgaris* yang mengandung bioaktif seperti flavonoid, fenol, dan saponin dapat berfungsi sebagai anti-bakterial dengan menghambat pertumbuhan bakteri yang diujikan secara in-vitro (Adhoni *et al.*, 2016).

Pemanfaatan ekstrak kasar dari mikroalga khususnya *C. vulgaris* sebagai inducer anti-inflamasi belum banyak dieksplor. Berdasarkan penjelasan diatas, hal tersebut yang melatarbelakangi penulis untuk melakukan penelitian tentang ekstrak kasar dari mikroalga *C. vulgaris* yang akan diujikan dengan menggunakan metode in vivo pada ikan kerapu cantang. Dalam penelitian ini ekstrak kasar dari *C. vulgaris* diharapkan dapat berperan sebagai inducer (senyawa yang dapat mengaktifkan gen spesifik) anti-inflamasi Hsp pada ikan kerapu cantang terhadap VNN.

1.2 Rumusan Masalah

Ekstrak kasar pada mikroalga *C. vulgaris* memiliki banyak manfaat salah satunya yaitu proteksi terhadap infeksi virus. Proteksi dalam infeksi virus dapat berupa respon anti-inflamasi. Hsp merupakan salah satu gen yang berfungsi sebagai penanda reaksi inflamasi. Sehingga dapat dirumuskan masalah dalam penelitian ini adalah :

1. Kandungan bioaktif apa sajakah yang terdapat pada ekstrak kasar dari mikroalga laut *Chlorella vulgaris*?
2. Bagaimana manfaat pemberian ekstrak kasar dari mikroalga laut *C. vulgaris* terhadap ekspresi Hsp sebagai inducer anti-inflamasi akibat VNN pada ikan kerapu cantang?.

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian tentang Ekstrak Kasar Mikroalga Laut *Chlorella vulgaris* Sebagai Inducer Anti-Inflamasi Cluster *Heat Shock Protein* Pada Ikan Kerapu Cantang yang Diinfeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN) ini bertujuan untuk :

1. Mengetahui dan menganalisis kandungan bioaktif apa saja dalam ekstrak kasar dari mikroalga laut *C. vulgaris*.
2. Mengetahui dan menganalisis manfaat ekstrak kasar *C. vulgaris* terhadap ekspresi dari Hsp sebagai inducer anti-inflamasi akibat infeksi VNN pada ikan kerapu cantang.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

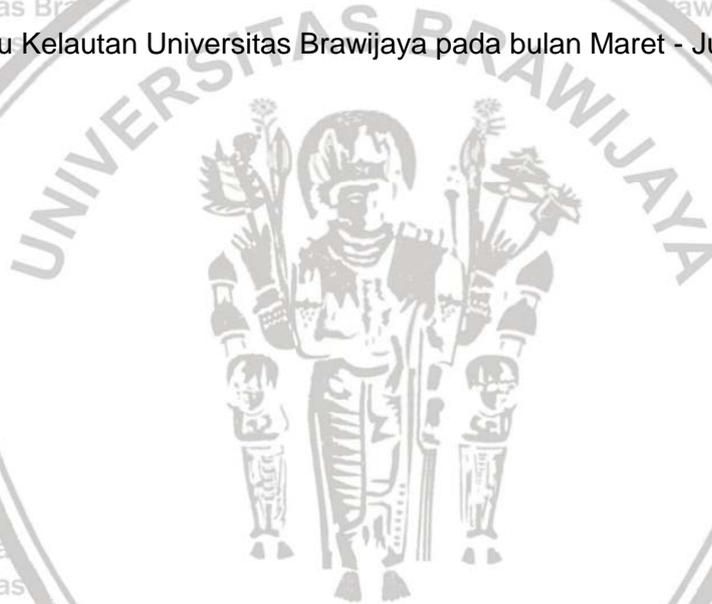
Manfaat teoritis yang dapat diambil bagi peneliti dari penelitian ini adalah sebagai sumber informasi keilmuan tentang manfaat ekstrak kasar mikroalga *C. vulgaris* sebagai bahan dasar inducer dari proses respon anti-inflamasi gen Hsp dalam ikan kerapu cantang.

1.4.2 Manfaat Praktis

Manfaat praktis dari penelitian ini adalah sebagai informasi dan bahan pertimbangan serta dasar untuk penulisan ataupun penelitian lebih lanjut tentang pemanfaatan ekstrak kasar mikroalga *C. vulgaris* sebagai bahan dasar inducer dari proses respon anti-inflamasi gen Hsp akibat infeksi VNN pada ikan kerapu cantang.

1.5 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Lingkungan dan Bioteknologi Perairan serta Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya pada bulan Maret - Juni 2018.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp).

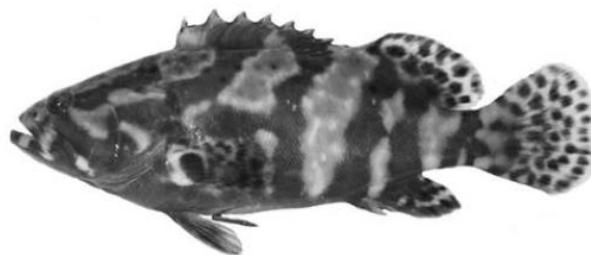
Ikan kerapu atau dalam dunia internasional disebut juga *groupers* atau *coral reef fishes* merupakan ikan yang termasuk dalam famili *Serranidae* dengan banyak spesies yang tersebar di perairan subtropis maupun perairan tropis. Ikan kerapu tergolong dalam ikan predator yang hidup di ekosistem terumbu karang (Nakai, 2002). 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*) (Ismi *et al.*, 2014). Kerapu jenis ini merupakan kerapu hibrida yang pertama kali diproduksi di Institut Penelitian Kelautan Borneo Universitas Sabah Malaysia dan sekarang telah menjadi ikan yang sangat populer untuk budidaya laut di wilayah Asia Tenggara (Ch'ng dan Senoo, 2008). Kerapu cantang memiliki beberapa jenis kekuatan hibrida seperti pertumbuhan cepat, toleransi terhadap salinitas air yang rendah dan pH air yang rendah (Firdaus *et al.*, 2016). Menurut Gino *et al.*, (2017) klasifikasi ikan kerapu cantang adalah sebagai berikut :

Ordo : Perciformes
Famili : Serranidae
Subfamili : Epinephelinae
Genus : Epinephelus
Spesies : *Epinephelus* sp

2.1.1 Morfologi

Ikan kerapu cantang (*Epinephelus* sp) merupakan hasil persilangan antara ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dengan ikan kerapu kertang (*Epinephelus lanceolatus*), sehingga secara morfologi atau bentuk tubuh kerapu

cantang merupakan kombinasi kedua induknya yaitu antara kerapu macan dengan kerapu kertang (Ch'ng dan Senoo, 2008). Ikan kerapu pada umumnya memiliki bentuk tubuh yang bulat panjang sedikit agak pipih, dengan tutup insang yang seluruhnya atau sebagian bergerigi, terdapat pula satu sampai tiga duri keras dan kuat serta sirip punggung yang memiliki duri keras dan jari-jari lunak di belakang (Darwasito, 2002). Kerapu memiliki bentuk mulut yang lebar serong keatas dengan bibir bawah menonjol keatas. Rahang atas dan bawah dilengkapi dengan deretan gigi dua baris, lancip dan kuat serta terdapat gigi terbesar di ujung luar bagian depan. Umumnya ikan ini memiliki sirip ekor yang bulat (rounded) (Fajriani, 2011). Ikan kerapu cantang dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Ikan kerapu cantang (*Epinephelus* sp) (Ch'ng dan Senoo, 2008)

Semua sirip Ikan kerapu cantang baik pectoral, anal, ventral, dorsal dan caudal memiliki corak seperti kertang dengan dasar berwarna kuning dilengkapi dengan bintik-bintik hitam. Terdapat bintik-bintik hitam di sekujur tubuhnya. Spot hitam atau bintik hitam pada bagian permukaan tubuh kerapu, merupakan gambaran yang unik dan jumlahnya akan bertambah sejalan dengan bertambahnya umur ikan tersebut. Setiap individu memiliki jumlah dan pola bintik hitam yang berbeda pada tubuhnya, baik pada bagian sirip dada, sirip ekor, sirip punggung maupun pada sirip perut (Wardana dan Tridjoko, 2015).

2.1.2 Reproduksi dan Daur Hidup

Reproduksi ikan kerapu merupakan proses dalam mempertahankan keturunan dan keberadaan jenisnya. Ikan kerapu cantang merupakan ikan hibridisasi. Dimana reproduksi dilakukan secara buatan dengan mengambil sperma dari ikan jantan kerapu kertang (*Epinephelus lanceolatus*) dan telur dari ikan betina kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) (Ch'ng dan Senoo, 2008).

Ikan kerapu termasuk dalam golongan ikan ovipar yaitu mengeluarkan telur pada saat pemijahan namun pembuahan terjadi diluar tubuh induknya (external fertilization). Ikan kerapu termasuk dalam ikan yang hermiprodit protogini dimana akan mengalami perubahan kelamin dari betina ke jantan. Perubahan kelamin pada ikan kerapu tergantung pada ukuran, umur dan spesies (Djamali *et al.*, 2001).

Perubahan tersebut terjadi setelah ikan betina berukuran di atas 2,5 kg pada saat ikan berumur diatas 2-2,5 tahun (Putri *et al.*, 2013).

Ikan kerapu memijah sepanjang tahun. Untuk melakukan pemijahan, ikan kerapu membutuhkan salinitas antara 28-32 ppt, dengan suhu antara 27°C - 30°C.

Ikan kerapu memijah disaat gelap, yaitu ketika bulan tidak bersinar terang dan suasana yang tidak berisik dan tenang (Kordi, 2001). Pada saat memijah, ikan betina dewasa akan mendekati ikan jantan dan akan bersama-sama berenang ke permukaan air. Jumlah telur yang akan dihasilkan tergantung dari berat tubuh ikan betina dimana telur memiliki sifat non adhesive yaitu telur yang satu tidak melekat pada telur yang lainnya. Berdasarkan pengamatan mikroskopis, telur kerapu berbentuk bulat tanpa kerutan, cenderung bergerombol pada kondisi tanpa aerasi, kuning telurnya tersebar merata, telur transparan dengan diameter sekitar 850 mikron dan tidak mempunyai rongga di dalam telur (Amirudin *et al.*, 2012).

Dalam daur hidupnya, ikan kerapu mengalami lima periode kehidupan yaitu: embrio, larva juvenil, dewasa dan tua. Dan Pada umumnya larva ikan kerapu terbagi menjadi dua tahap yaitu prolarva dan pasca larva (Effendie, 1978).

Perkembangan prolarva dimulai dari larva baru menetas sampai kuning telur habis terserap, sedangkan pasca larva dimulai dari kuning telur habis terserap sampai terbentuk organ-organ tubuh atau larva telah menyerupai bentuk induknya. Larva ikan kerapu yang baru menetas mempunyai panjang rata-rata 880 mikron dengan tinggi 480 mikron dan panjang rata-rata 1.88 mm dan tinggi 460 mikron (Slamet *et al.*, 1996).

2.1.3 Habitat dan Kebiasaan Makan

Pada fase larva kerapu memiliki habitat favorit yaitu diperairan pantai yang pasirnya berkarang dan banyak ditumbuhi lamun (Putri *et al.*, 2013). Pada kerapu dewasa bermigrasi ke perairan lebih dalam antara 7-40 m, biasanya perpindahan ini berlangsung pada siang dan sore hari (Amirudin *et al.*, 2012). Untuk penyebaran di habitat asalnya, penyebaran ikan kerapu cantang di alam masih sangat jarang dan bahkan hampir tidak ditemukan. Hal ini karena kerapu cantang merupakan hasil pembuahan yang tidak disengaja antara induk betina kerapu macan dan induk jantan kerapu kertang (Prayogo dan Isfanji, 2014).

Pada siang hari, larva kerapu biasanya tidak muncul ke permukaan air, sedangkan sebaliknya pada saat malam hari, larva kerapu banyak muncul ke permukaan air. Hal ini dikarenakan sifat kerapu sebagai organisme nocturnal, yakni pada siang hari lebih banyak bersembunyi di liang-liang karang dan pada malam hari aktif bergerak di kolom air untuk mencari makanan. (Subyakto, *et al.*, 2003). Aktivitas ikan nokturnal mencari makan dimulai saat hari mulai gelap. Ikan-ikan tersebut digolongkan sebagai ikan soliter di mana aktivitas makan dilakukan secara individu, gerakannya lambat cenderung diam dan arah gerakannya tidak begitu luas serta lebih banyak menggunakan indera perasa dan indera penciuman (Risamasu, 2008).

Ikan kerapu dikenal sebagai predator atau piscivorous yaitu pemangsa jenis ikan-ikan kecil, zooplankton, udang-udangan invertebrate, rebon dan hewan-hewan kecil lainnya. Ikan ini termasuk jenis karnivora dengan cara memangsanya memakan satu per satu makanannya. Sedangkan untuk larva ikan kerapu pemakan larva molusca (trokofor), rotifer, mikrocrustacea, copepod, dan zooplankton (Kordi, 2001). Namun Antore *et al*, (1998) menjelaskan bahwa ikan kerapu memiliki sifat buruk yaitu kanibalisme yang muncul pada larva yang berumur 30 hari akibat dari pasokan makanan yang tidak mencukupi.

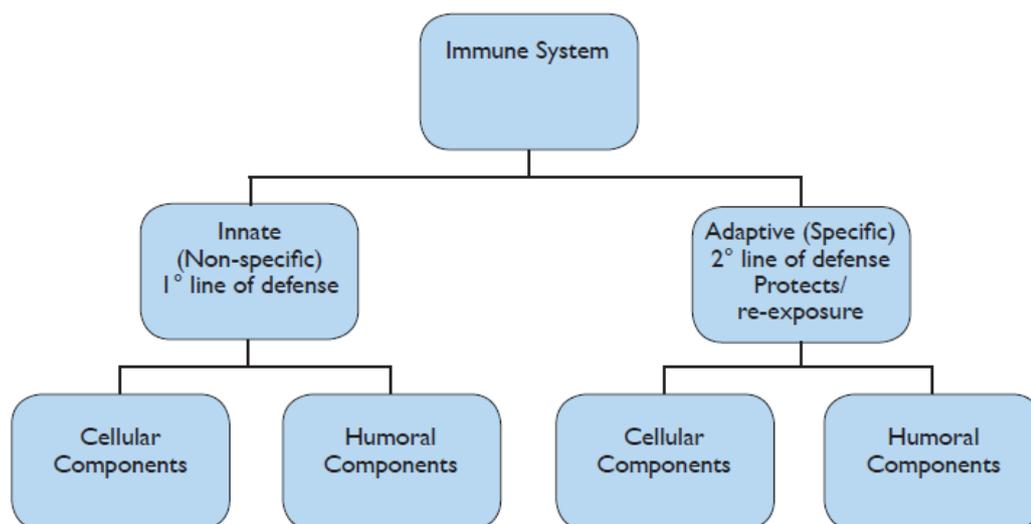
2.1.4 Faktor Lingkungan

Perkembangan kehidupan kerapu sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan tempat hidupnya. Faktor-faktor kualitas air yang mempengaruhi kehidupan kerapu cantang antara lain *dissolved oxygen* (DO), pH, suhu, dan salinitas (Noor *et al.*, 2018). Kualitas perairan yang optimal dalam pemeliharaan ikan kerapu cantang, seperti suhu berkisar antara 29 - 30°C, salinitas antara 30-33 ppt, oksigen terlarut > 3,5 ppm dan pH berkisar antara 7,8 - 8,0 (Prayogo dan Isfanji, 2014). Suhu merupakan salah satu faktor lingkungan yang dapat menimbulkan stres pada ikan. Perubahan suhu yang cukup besar dan mendadak dapat menimbulkan stres pada ikan. Stres adalah ketidak mampuan suatu organisme mempertahankan kondisi homeostasis akibat terganggunya individu tersebut oleh adanya rangsangan dari luar yang dinamai dengan stressor (Kubilya dan Ulukoy, 2002).

2.2 Sistem Kekebalan Tubuh Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp)

Sistem kekebalan tubuh diartikan sebagai gabungan dari sel, molekul maupun jaringan yang memiliki peran dalam resistensi maupun perlawanan terhadap infeksi (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010). Sistem kekebalan tubuh merupakan satu set dari komponen selular dan humoral untuk mempertahankan

tubuh terhadap zat asing seperti mikroorganism, toksin atau sel ganas, yang merespon faktor-faktor seperti endogen atau komponen eksogen yang merangsang sistem ini (Takahashi dan Urbinatsi, 2013). Ikan kerapu merupakan salah satu ikan yang termasuk dalam golongan ikan teleostei. Secara fisiologis, ikan memiliki sistem kekebalan tubuh yang mirip dengan vertebrata yang lebih tinggi yaitu untuk bertahan hidup mereka sejak awal embrio bergantung terhadap sistem imun atau kekebalan bawaan mereka (Uribe *et al.*,2011). Pada fase benih maupun juvenil, sistem pertahanan tubuh ikan telah terbentuk namun belum berfungsi secara optimal sehingga belum secara efisien bekerja dalam menahan infeksi dari patogen. Skema sistem kekebalan tubuh dapat dilihat pada gambar 2.



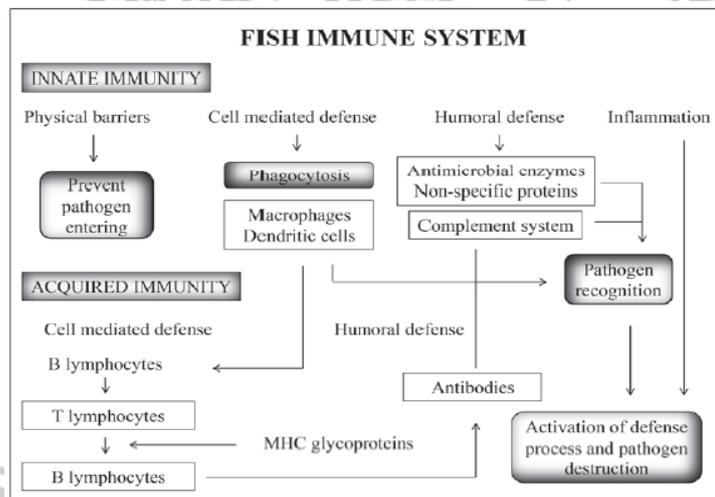
Gambar 2. Skema sistem kekebalan tubuh (Alcorn *et al.*,2008)

Sistem kekebalan tubuh pada ikan dapat dibedakan menjadi dua yaitu non-spesifik dan spesifik yang memiliki peranan yang berbeda dan tersendiri pada masing masing sistem kekebalan tubuh dalam menghancurkan dan memusnahkan serangan patogen asing kedalam tubuh ikan (Alcorn *et al.*,2008).

Sistem imun non-spesifik atau bawaan memiliki fungsi memberikan respon segera serta respon yang relatif luas terhadap berbagai serangan yang disebabkan oleh

pathogen. Sistem imun bawaan ini juga memiliki fungsi lain yaitu sebagai pengaktif respon imun spesifik, dimana respon imun spesifik ini memiliki cara yang sempit dalam penargetan tindakan terhadap pathogen yang telah menginfeksi sebelumnya (Alcorn *et al.*,2008 ; Kum dan Selim, 2011).

Seperti pada semua vertebrata, ikan memiliki dua respon kekebalan tubuh yaitu respon kekebalan tubuh selular dan respon kekebalan tubuh humoral, dimana respon kekebalan tubuh selular kerapu ataupun ikan secara umum meliputi sel-sel fagosit yang mirip dengan sel makrofag, sel pembunuh alami (*NK-cell*), juga neutrofil, serta sel limfosit T dan sel limfosit B, sedangkan untul respon kekebalan tubuh humoral ikan meliputi lisozim, transferin, hemolisin alami dan protein C-reaktin (CRP) (Kum dan Selim, 2011). Konsep sistem imun pada ikan dapat dilihat pada gambar 3.



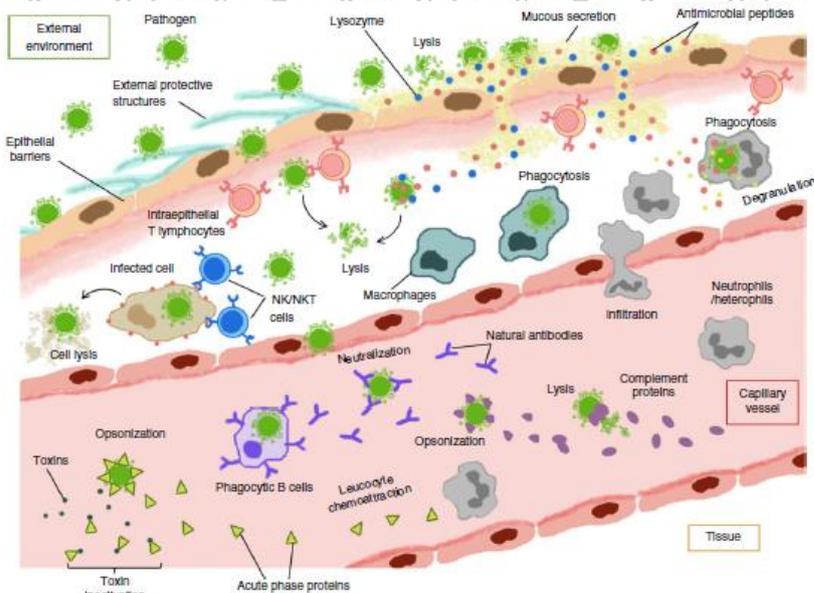
Gambar 3. Konsep Sistem Imun Ikan (Takahashi dan Urbinati, 2013)

2.2.1 Sistem Imun Non-Spesifik (*Innate*)

Sistem imun non spesifik (*innate*) atau yang disebut juga sebagai sistem kekebalan tubuh bawaan merupakan komponen yang sangat penting dalam proses yang dilakukan tubuh untuk memerangi pathogen yang masuk kedalam tubuh ikan. Respon bawaan merupakan pertahanan kekebalan tubuh invertebrata seperti arthropoda dan vertebrata termasuk ikan. Sistem kekebalan tubuh mereka

memiliki fitur yang memungkinkan mereka untuk dapat beradaptasi diberbagai lingkungan, mulai dari laut dalam hingga sungai, danau dari semua iklim bahkan lingkungan yang menggabungkan musim hujan dan musim kering (Tort *et al.*,2003). Respon bawaan umumnya dibagi menjadi tiga kompartemen yaitu penghalang fisiokimia dan epitel/mukosa (kulit, insang dan saluran pencernaan), parameter humoral dan komponen selular (Uribe *et al.*,2011).

Pada tubuh ikan, terdapat sistem bawaan eksternal dan sistem bawaan internal. Struktur eksternal sebagai strategi proteksi terhadap patogen merupakan mekanisme utama kekebalan bawaan yang berfungsi mencegah penyebaran mikroba dan infeksi. Pertahana fisik terjadi pada kulit, sisik serta lendir yang merupakan garis pertahanan paling luar terhadap serangan infeksi. Keratinosit dan lapisan epidermis kulit sehat serta epitel mukosa susah untuk ditembus oleh antigen yang akan masuk kedalam tubuh ikan. Mukus ikan mengandung immunoglobulin (IgM) alami, laktin, pentraxin, lisozim, peptida antibakteri serta rotein komplemen, yang memiliki peranan penting dalam menghambat masuknya patogen (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010). Sedangkan pada kulit epidermis ikan dilindungi oleh lapisan sisik berlapis, filamen yang kaya akan aktin yang disebut dengan *microridges* serta filamen keratin lokal yang cukup mekanis dalam pertahannannya terhadap lingkungan perairan dan hubungannya dengan patogen (Romo *et al.*,2015). Pandangan imunitas bawaan pada vertebrata dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Pandangan integratif imunitas bawaan pada vertebrata. Gambaran skematis sistem pertahanan bawaan utama yang mewakili komponen fisik, humoral dan sel-dimediasi dan interaksi diantara mereka dalam konteks fisiologis (Romo *et al.*,2015)

Sedangkan untuk sistem bawaan internal, mencakup tiga cabang interaksi yaitu faktor humoral, pertahanan selular dan inflamasi. Sistem bawaan humoral berfungsi melalui beberapa komponen yang larut didalam cairan tubuh yang mencakup antara lain seperti dibawah ini:

a) Lisozim

Lisozim merupakan enzim bakteriolitik yang didistribusikan secara luas ke seluruh tubuh dan merupakan bagian dari mekanisme pertahanan non-spesifik. Pada ikan, lisozim telah terdeteksi dalam serum sekresi, selaput lendir dan jaringan yang kaya akan leukosit terutama usus dan ginjal (Uribe *et al.*,2011). Tindakan bakterisida dari enzim ini melibatkan hidrolisis peptidoglikan dinding sel patogen yang mengakibatkan lisis sel serta memicu opsonin dari sistem pelengkap dan sel fagositik (Magnadottir, 2006).

b) Peptida Antimikrobia

AMP merupakan pertahanan humoral bawaan lain yang terdapat pada ikan. Polipeptida ini memiliki peranan penting dalam sistem pertahanan inang melawan virus maupun bakteri. Peptida ini dapat ditemukan di jaringan lendir, hati dan insang ikan, dimana memiliki berat molekul rendah dan mampu memecah dinding bakteri (Uribe *et al.*,2011). Molekul ini menunjukkan aktivitas antibakteri, antijamur dan antiparasit melalui berbagai proses termasuk destabilisasi dan terganggunya membran mikroba, pembentukan pori, agregasi protein, penghambatan target intraselular, gangguan dalam transkripsi DNA dan blokade protein sintesis dan lipatan (Romo *et al.*,2015).

c) Sitokin

Sitokin merupakan protein yang memediasi komunikasi antara sel dan sangat penting untuk respon imun. Sitokin dibagi lagi ke kelas yang berbeda sesuai dengan daerah encoding genomik mereka, target reseptor, jalur sinyal terkait dan fungsi biologis; kelas ini termasuk interferon (IFNs), interleukin (IL), faktor nekrosis tumor (TNFs) dan mengubah faktor pertumbuhan (TGFs) (Romo *et al.*,2015). Pada ikan, TNF- α dan - β memiliki peranan sebagai aktivator makrofag yang menyebabkan peningkatan aktivitas pernafasan, fagositosis dan produksi oksida nitrat (Uribe *et al.*,2011). Potensial sitokin yang memiliki peranan penting lain adalah interleukin. Jenis interleukin yang telah teridentifikasi pada ikan adalah IL-1, yang memiliki tiga anggota yaitu IL-1a dan IL-1b yang memediasi respon inflamasi dan stimulasi leukosit serta anggota ketiga yaitu IL-1 antagonis reseptor (IL-1Ra) yang menghambat aktifitas biologis IL-1a dan IL-1b (Tort *et al.*,2003). INF α dan β merupakan sitokin dengan fungsi antiviral nonspesifik yang didasarkan pada penghambatan replikasi asam nukleat dalam sel yang terinfeksi. INF memainkan peran penting dalam pertahanan terhadap infeksi virus pada sel inang vertebrata, yang mengeluarkan INF α / β pada pengakuan asam nukleat virus. INF ini

melindungi sel lain dari infeksi virus dengan mengikat reseptor yang berbeda, yang menghasilkan induksi beberapa ratus gen yang dirangsang oleh INF (ISG). Beberapa gen ini mengkodekan protein antivirus, seperti protein MX (MX), protein kinase dsRNA activated (PKR) dan 2,5-oligoadenylate synthetase (OAS) (Uribe *et al.*,2011). Dan jenis sitokin lain yang penting adalah TGF, TGF β dicirikan dan mencakup tiga isoform terkait yang dikodekan secara independen gen, yang mengatur pertumbuhan sel dan diferensiasi serta terlibat dalam pematangan oosit, perbaikan luka, modulasi respon inflamasi, immunosupresi dan toleransi (Romo *et al.*,2015).

d) Sistem Komplemen/Pelengkap

Sistem komplemen terdiri dari zat terlarut dan protein membran dalam bentuk tidak aktif atau pada aktivasi spontan tingkat rendah dan dipicu dengan jalur berurutan sejak stimulus awal (Biller-Takahashi dan Elisabeth, 2013). Sistem komplemen pada ikan teleostei dan vertebrata yang lebih tinggi dapat diaktifkan dengan tiga cara yaitu jalur klasik yang dipicu oleh antibodi yang mengikat permukaan sel, jalur alternatif yang merupakan antibodi independen dan diaktifkan langsung oleh mikroorganisme asing serta yang ketiga adalah jalur lektin yang diaktifkan oleh pengikatan protein kompleks yang terdiri dari sel induk pengikat mannose/mannan pada sel bakteri (Uribe *et al.*,2011). Terdapat dua komponen penting dalam sistem komplemen yaitu C5a dan C3b yang memainkan peran sentral dalam perekrutan fagosit dan peradangan. C5a dan C3b bersifat protein kemotoksik untuk neutrofil dan makrofag karena mereka tetap terhubung dengan dinding bakteri yang memicu proses biologis opsonisasi, fagositosis, kemotaksis leukosit dan inaktivasi melepaskan toksin bakteri (Biller-Takahashi dan Elisabeth, 2013).

Untuk sistem bawaan selular, mencakup sel sitotoksik non-spesifik (atau sel NK), monosit / makrofag, trombosit, granulosit (atau neutrofil), limfosit (Kum dan Selim, 2011). Sitotoksitas non-spesifik adalah salah satu yang paling penting dalam mekanisme seluler pada imunitas bawaan vertebrata, memainkan peran penting dalam pertahanan antivirus dan *surveillans* imun. Fungsi ini dilakukan terutama oleh limfosit NK, yang terlibat dalam respon sitotoksik terhadap sel yang ditransformasikan atau terinfeksi oleh virus atau mikroba intraselular. Selain itu, sel NK mensekresikan sitokin dengan aktifitas antivirus dan juga terlibat dalam pertahanan hati dan regenerasi jaringan dan remodelling (Romo *et al.*, 2015).

Diantara sel pertahanan ikan, trombosit memiliki kapasitas fagositosis yang memiliki asam fosfatase. Monosit menunjukkan fagositosis dan aktivitas sitotoksik tidak spesifik yang melakukan migrasi melalui jaringan ikat dan berubah menjadi makrofag. Neutrofil adalah sel polimorfonuklear yang ditemukan di dalam darah, jaringan limfoid dan rongga peritoneum yang bisa memfagositosis partikel asing. Sedangkan eosinofil didistribusikan melalui jaringan penghubung, terutama di saluran gastrointestinal, insang dan aliran darah dan menyediakan degranulasi bila terdapat parasit (Biller-Takahashi dan Elisabeth, 2013).

Produksi atau ekspresi dari parameter bawaan humoral dan selular biasanya diperkuat atau diregulasi selama respon imun, namun diyakini adanya memori. Ini menunjukkan bahwa pertemuan kedua dengan patogen yang sama tidak akan menghasilkan peningkatan respon seperti yang terlihat pada respon imun yang didapat (Magnadóttir, 2010).

2.2.2 Sistem Imun Spesifik (*Adaptive*)

Respon imun spesifik terjadi melalui mekanisme yang melibatkan jaringan kompleks sel, protein, gen dan pesan biokimia khusus yang menyediakan sarana yang diperlukan tubuh untuk merespons secara antigen spesifik, antibodi dan sel

efektor dengan spesifisitas dan afinitas yang tinggi (Uribe *et al.*,2011). Berbeda dengan komponen sistem kekebalan bawaan, sistem kekebalan spesifik atau sering disebut adaptif dapat menghasilkan sel efektor (limfosit T dan B) dan molekul-molekul (imunoglobulin (Igs) / atau antibodi spesifik), yang sangat spesifik terhadap antigen mikroba penyerbu (Kum dan Selim, 2011).

Antibodi merupakan agen yang bertindak sebagai sistem imun spesifik secara humoral pada ikan. Imunoglobulin yang dominan pada ikan teleostei adalah tetramer kelas IgM dan mengandung delapan situs penggabungan antigenik.

Hubungan afinitas IgM monomer dan tetramer hampir serupa, namun IgM tetrameric mengaktifkan pelengkap lebih efektif daripada bentuk monomer karena adanya perbedaan struktural pada bagian molekul Fc. IgD adalah isotipe imunoglobulin kedua yang diidentifikasi pada ikan, lokasinya tepat di bawah gen IgM dan ekspresinya pada sel B (Uribe *et al.*,2011).

Limfosit T dan B adalah sel sistem kekebalan adaptif yang memiliki kemampuan untuk menghancurkan sel somatik terluka (tumor atau sel yang terinfeksi virus) dan menghasilkan sitokin modulasi imun (Biller-Takahashi dan Elisabeth, 2013). Ketika suatu antigen merangsang respon imun spesifik, antigen tersebut akan mengaktifkan sel limfosit T. Ketika sel limfosit T teraktifasi oleh antigen, sel tersebut akan melawan antigen dan merangsang aktifasi sel limfosit B. Sel limfosit B yang teraktifasi akan merangsang pembentukan antibodi yang akan melawan antigen tersebut. Fungsi utama sel B adalah mempertahankan tubuh terhadap infeksi bakteri, virus dan melakukan netralisasi toksin.

(Baratawidjaja dan Renganis, 2010). Sistem imun spesifik selular diperantarai oleh Sel T. Sel T juga berasal dari sum-sum tulang belakang. Fungsi utama sistem imun spesifik selular ialah sebagai pertahanan terhadap bakteri yang hidup intraselular, virus, jamur, parasit dan keganasan (Nakanishi *et al.*,2015). Sel T terdiri sel CD4+ terdiri atas Th1 dan Th2. Th1 diaktifkan oleh CD4+ untuk mengaktifkan makrofag

yang berfungsi dalam menghancurkan mikroba. Sel T juga terdiri atas sel CD8+/CTL/Tc/Ts/Th3 yang berfungsi untuk memusnahkan sel terinfeksi (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010). Sel T sitotoksik yang juga dikenal dengan sel pembunuh (*killer T cells*) akan memusnahkan sel yang terinfeksi atau sel-sel abnormal dengan cara melepaskan zat yang bersifat toksik atau memicu sel agar melakukan distruksi sel (*apoptosis*).

2.3 Pengenalan Antigen Oleh Reseptor

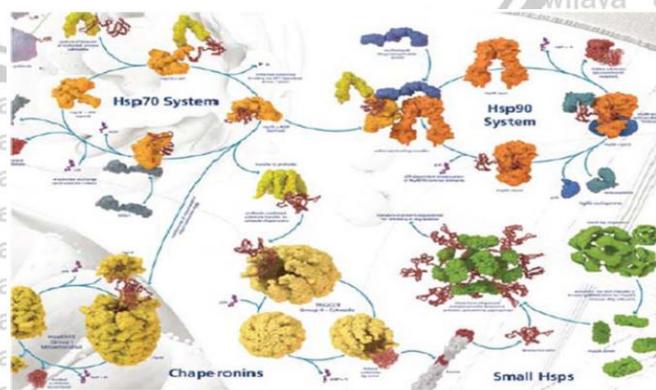
Pengenal antigen dalam imunitas humoral telah lama dipaham, bagian antigen-spesifik dari molekul antibodi mengikat secara langsung ke antigen di tempat asalnya. Molekul antibodi ditemukan sebagai reseptor antigen pada membran plasma sel B dan juga sebagai protein yang disekresikan. Sedangkan sel T tidak dapat mengenali antigen dalam konformasi asli mereka, tetapi hanya setelah proteolisis parsial di dalam pemrosesan antigen atau menyajikan sel (APC). APC dapat menangkap dan meginternalisasi antigen dalam berbagai bentuk dan oleh berbagai rute (Blum *et al.*, 2013). APC terutama menggunakan tiga jalur presentasi antigen : Antigen disajikan oleh molekul *major histocompatibility complex* (MHC). Dua molekul MHC berfungsi dalam mempresentasika antigen yaitu molekul MHC-1 dan MH-II (Mollen, 1988). Jalur pertama melibatkan molekul MHC kelas I (Springer, 2015). Di sitosol, rantai polipeptida yang disintesis secara endogen berulir ke dalam struktur seperti barel yang disebut proteasom, yang mengandung berbagai aktivitas enzim proteolitik. Molekul MHC kelas I-pengangkutan peptida diangkut melalui Golgi ke permukaan sel, di mana mereka dikenali oleh sel CD8 + T. Jalur presentasi antigen kedua melibatkan MHC kelas II molekul (Nair *et al.*, 2011). MHC kelas II merupakan molekul kompleks dengan rantai invarian (Ii). Molekul MHC kelas II yang diangkut ke permukaan sel di mana

ia dikenali oleh CD4 + Sel T. Jalur penyajian antigen yang ketiga tidak melibatkan presentasi peptida antigen.

2.3.1 Heat Shock Protein (Hsp)

Hsp merupakan protein seluler yang ditemukan di semua organisme hidup, termasuk ikan. Hsp adalah kelas protein yang berfungsi dalam melipat dan membentangkan protein yang lainnya. Hsp adalah keluarga protein yang dinyatakan sebagai respons terhadap berbagai macam pemicu biotik dan abiotik (Iwama *et al.*, 1998). Mereka juga disebut sebagai protein stres. Ekspresi Hsp dipengaruhi oleh beragam sel dan jaringan sel, sebagai respon baik untuk stressor biologis seperti patogen infeksius, serta abiotik stressors seperti panas dan sengatan dingin, dan kontaminan lingkungan. Ekspresi mereka dapat meningkat saat sel-sel terkena peningkatan suhu atau tekanan yang lainnya.

Protein ini telah dikelompokkan menjadi beberapa keluarga berdasarkan berat molekulnya seperti Hsp90 (85-90 kDa), Hsp70 (68-73 kDa), Hsp60, Hsp47, dan Hsps kecil (12-43 kDa) (Park *et al.*, 2007; Hallare *et al.*, 2004). Hsp diketahui memainkan peranan vital seluler termasuk perakitan protein, lipatan yang benar, dan translokasi, serta mengatur interaksi antara hormon dan reseptornya. Kaperon kompleks pada Hsp dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5. Kompleks Kaperon Hsp. Hsp dan kofaktor terkait mereka yang berfungsi bersama dalam kompleks, bertindak sebagai molekul pendamping untuk memfasilitasi lipatan dan aktivasi protein seluler yang tepat (Walia dan Balkhia, 2016)

2.3.2 Fungsi Hsp

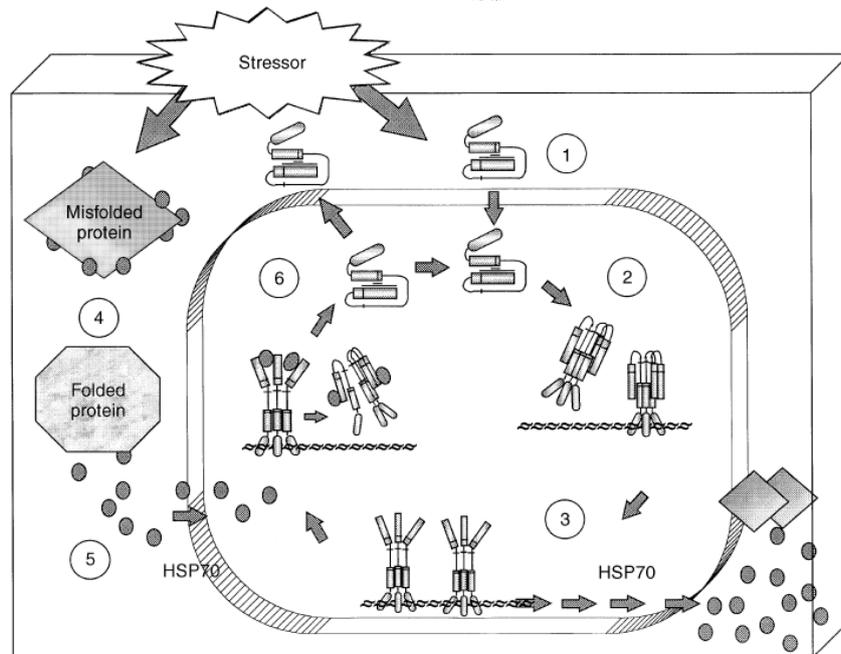
Fungsi Hsp mempengaruhi berbagai aspek fisiologi ikan, termasuk pengembangan dan penuaan, fisiologi stres dan endokrinologi, imunologi, fisiologi lingkungan, toleransi stres dan aklimasi (Basu *et al.*, 2003). Di sel yang tidak bertekanan, Hsp memiliki fungsi konstitutif yang sangat penting dalam metabolisme protein (Morimoto *et al.*, 1994; Hightower *et al.*, 1999). Keluarga kristal Hsp kecil (sHSP) memiliki peran utama dalam homeostatis sel, cedera tanggapan dan penyakit, misalnya Hspb1 (Hsp27) mengatur dinamika filamen aktin (Mounier dan Arrigo, 2002). Hsp70 dikenal berfungsi membantu melipat rantai polipeptida yang baru terbentuk, bertindak sebagai pendamping molekuler, dan menengahi perbaikan dan degradasi protein denaturasi (Kiang dan Tsokos, 1998). Hsp90 diaktifkan saat mendukung berbagai komponen reseptor hormon sitoskeleton dan steroid (Young *et al.*, 2001).

2.3.3 Proses molekuler berhubungan dengan ekspresi HSP

Hasil induksi Hsp terutama berasal dari pengikatan aktifitas faktor transkripsi kejutan panas (HSF) ke area promotor utama, yang disebut elemen kejutan panas (HSE). HSF yang paling penting untuk diinduksi adalah HSF1. Setelah terjadinya stres HSF1 dilepaskan dan translokasi ke nukleus. Kemudian, trimerisasi, pengikatan elemen sengatan panas (HSE) dan hiperfosforilasi akhirnya menghasilkan transkripsi HSPs (Sarge *et al.*, 1993).

Gen kejutan panas utama tidak mengandung intron sehingga RNA pembawa pesan dapat segera diterjemahkan ke dalam protein baru dalam beberapa menit setelah terpapar stressor (Iwama *et al.*, 1998). Semua stressor akan bertindak dengan cara merusak protein asli di dalam sel, dan melibatkan HSP70 sebagai sensor kunci dan mediator peristiwa penting yang mengarah ke produksi HSP70 lebih jauh. HSF1 ditemukan sebagai monomer (Westwood *et al.*, 1991; Baler *et*

al., 1993; Sarge *et al.*, 1993) atau sebagai heterodimer dikomplekskan dengan HSP70 (Baler *et al.*, 1992, 1995; Rabindran *et al.*, 1994) di sitosol dari sel yang tidak bertekanan. Model peran heat shock factor (HSF1) dalam regulasi ekspresi heat shock protein dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 6. Model peran heat shock factor (HSF1) dalam regulasi ekspresi heat shock protein. (1) Bentuk monomer laten HSF1 dalam sitoplasma atau nukleus. (2) Aktivasi oleh stressor menyebabkan trimerisasi HSF1, yang memfasilitasi pengikatan elemen kejutan panas promotor gen HSP70. (3) Fosforilasi dan aktivasi hasil transkripsi HSP70 menghasilkan ekspresi HSP70. (4) Meningkatkan perbaikan HSP70 sitosolik protein yang salah melipat, bersama dengan HSP lainnya. (5) Perbaikan protein yang rusak selanjutnya terjadi pada kadar HSP70 yang lebih tinggi dalam sitosol. (6) Konsentrasi HSP70 yang lebih tinggi menghasilkan ikatan HSF1, memfasilitasi pelepasan dari DNA, dan disosiasi HSF1 kembali ke bentuk monomer (Walia dan Balkhia, 2016).

2.3.4 Mekanisme Hsp Sebagai Penanda Reaksi Inflamasi

Terdapat beberapa hubungan antara *heat shock protein* (Hsp) dengan sistem kekebalan tubuh pada organisme. Sederhananya, koneksi antara keduanya adalah patogen yang mematikan (bakteri, virus dll) dapat merusak komponen didalam sel melalui pelepasan zat sitolitik, sehingga dapat mengubah homeostatis seluler dan merangsang Hsp. Hsp merupakan inducer kuat baik

sistem imun *innate* maupun antigen spesifik, mereka mengaktifkan sel dendrit dan sel NK sel T, dan sel humoral terhadap antigen spesifik mereka (Segal *et al.*,2006).

Pada ikan, inflamasi patologi yang disebabkan oleh paparan patogen dapat mengubah proses fisiologis pada tingkat sel, seperti regulasi ion dan keseimbangan asam basa. Host immunosit (fagosit dan granulosit) melepaskan zat ekstraselular seperti spesies oksigen reaktif, peptida kationik, lisozim, dan sitokin yang dikenal sebagai penginduksi berbagai Hsp (Demeke dan Tassew, 2016). Pemberian eksogen Hsp juga dapat mengatur dua diferensiasi makrofag / monosit, dan penelitian telah menunjukkan bahwa sel inang dapat mengenali peptida terkait tumor kecil saat dikomplekskan Hsp70. Oleh karena itu, Hsp mungkin merupakan bagian integral dari dukungan perakitan kompleks peptida MHC-kelas II untuk hipotesis bahwa Hsp terlibat dalam presentasi antigen. Hsp juga dapat bertindak sebagai molekul sinyal interselular, dan dapat menginduksi banyak sel sejenis untuk meregulasi sistem kekebalan ikan dan memberikan fungsi penting sel T (Elis, 2001) seperti faktor yang signifikan dalam kekebalan pada infeksi virus (Dong *et al.*,2006). Hsp juga penting dalam memberikan perawatan dan perlindungan terhadap sel fagositik dengan memperbaiki kerusakan atau perlindungan terhadap auto-lisis atau apoptosis karena auto-oksidasi yang disebabkan oleh sistem pertahanan internal sel (Polla *et al.*, 1995).

2.4 Virus RNA

Penyakit akibat virus pada ikan merupakan penyebab kematian skala besar yang sulit untuk diobati secara langsung. Virus sangat unik, sangat kecil, sering terdiri dari molekul asam nukleat dalam cangkang protein dan ketika mereka memasuki sel, mereka memarasize mesin seluler untuk menghasilkan ribuan keturunan. Saat ini telah ada sekitar 4000 virus yang dikelompokkan menjadi 71 keluarga. Virus umumnya merupakan genom terkecil, yang memiliki perbedaan

utama yaitu pada genomnya. Sebagian merupakan DNA dan yang lainnya merupakan RNA. Genom virus DNA dan RNA memiliki beberapa ciri khas. Genom virus pertama bisa monopartit atau multipartit. Jika mereka multipartit, mereka bisa memiliki beberapa segmen. Semua genom dsDNA yang diurutkan sampai saat ini hanya berisi satu molekul asam nukleat tunggal. Beberapa genom ssDNA memiliki banyak segmen. Sebaliknya, genom multipartit jauh lebih sering untuk virus RNA.

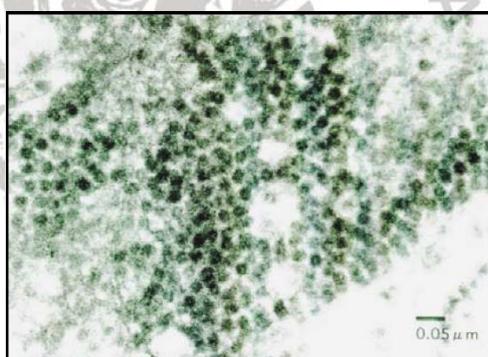
Secara khusus, untai gen virus ssRNA untai negatif umumnya multipartit. Virus DNA cenderung berukuran lebih besar dari virus RNA (McClean, 2004).

2.4.1 *Viral Nervous Necrosis (VNN)*

Dalam budidaya ikan kerapu cantang tidak terlepas dari faktor penyakit yang dapat menyerang dan menggagalkan hasil dari budidaya. Salah satu jenis penyakit yang menyerang ikan kerapu cantang adalah *viral nervous necrosis* (VNN). Virus ini merupakan salah satu contoh virus genom RNA yaitu terdiri dari dua molekul (RNA1 dan RNA2) (Tan *et al.*, 2001). Penyakit yang diakibatkan oleh virus VNN ini dapat menyebabkan kematian massal pada ikan kerapu terutama pada stadia larva dan juvenil (Eka *et al.*, 2012). Di Indonesia sendiri penyakit ini pertama kali ditemukan di daerah Banyuwangi pada budidaya ikan kerapu putih. VNN ini umumnya menyerang sistem organ syaraf mata dan otak yang dapat menyebabkan kelainan pada ikan yang diserang. Rahmana *et al.* (2013) menjelaskan bahwa VNN umumnya menginfeksi stadia larva sampai yuwana dan menyerang sistem organ syaraf mata dan otak dengan gejala yang cukup spesifik karena ikan menampilkan tingkah laku berenang yang tidak normal dan umumnya ikan berdiam di dasar. Beberapa gejala ikan yang terinfeksi VNN seperti ikan berputar putar, ikan berada di dasar dan menunjukkan gejala perilaku yang tidak wajar (Yanuhar, 2011).

2.4.2 Karakteristik dan Distribusi *viral nervous necrosis*

Virus nervous nekrosis merupakan anggota keluarga Nodaviridae dan dari genus Betanodavirus, berdasarkan asam nukleat, struktur genomik, sifat protein dan hubungan serologisnya (Lin *et al.*, 2007) dimana jenis spesiesnya adalah striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). Betanodavirus adalah sekelompok virus yang tidak memiliki kantung, berukuran kecil (25-35 nm), bulat, dengan genom yang terdiri dari dua molekul RNA positif tunggal. Segmen genomik yang lebih besar (RNA1) memiliki ukuran 3,1 kb dan berperan dalam mengkodekan RNA-dependent RNA polymerase. Sedangkan segmen genom yang lebih kecil (RNA2) memiliki ukuran 1,4 kb, bertanggung jawab terhadap mengkodekan selubung protein (mantel protein). Betanodavirus sangat tahan terhadap lingkungan air dan mampu bertahan untuk waktu yang lama di air laut pada suhu rendah (Yuanita *et al.*, 2013). Gambar virus VNN dapat dilihat pada gambar 7



Gambar 7. *Viral Nervous Necrosis* (VNN)
(Maeno dan Cruz-Lacierda, 2002)

Distribusi VNN telah dilaporkan hampir disemua benua kecuali Amerika Selatan. Ini termasuk Asia selatan dan timur (Jepang, Korea, Taiwan, China, Filipina, Thailand, Vietnam, Malaysia, Singapura, Indonesia, Brunei, India), Oceania (Australia, Tahiti), Mediterania (Israel, Kroasia, Bosnia, Yunani, Malta, Italia, Perancis, Spanyol, Portugal, Tunisia), Inggris, Skandinavia (Norwegia), dan Amerika Utara (AS, Kanada) (Nakai *et al.*, 2009). Sedangkan di Indonesia sendiri

virus ini pertama kali ditemukan di daerah Banyuwangi pada budidaya ikan kerapu putih (Eka *et al.*,2012).

2.4.3 Transmisi dan Mekanisme *viral nervous necrosis*

Transmisi dari VNN dapat terjadi secara vertikal dan horizontal. Transmisi VNN secara vertikal menyebar dari induk ke larva. VNN menyebar dalam indung telur sehingga telur dapat menyebabkan transmisi vertikal dari virus ini. Transmisi VNN secara horisontal pada populasi ikan liar pada area budidaya dan ikan-ikan liar di laut pernah diketahui terkena infeksi VNN dengan genotip RGNNV (Dennis *et al.*,2006).

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/*humbback grouper*) dimana protein memiliki peran dalam menempelnya virus pada reseptor inang (Yanuhar, 2011). VNN dapat menembus ephitelium nasal lewat sayaraf penciuman dan gelembung penciuman, dan menyerang kupin penciuman. Virus ini juga dapat melewati intramuscular, awalnya VNN melewati saraf peripheral dalam jaringan muscular tepi, lalu diangkut melalui axon ke jaringan spina pada tulang belakang. Dan VNN juga dapat menerang *Central Nervous System* (CNS) lewat sirkulasi darah sebagai titik awal injeksinya (Dennis *et al.*,2006).

2.4.4 Gejala Klinis infeksi *viral nervous necrosis*

Gejala yang sering ditimbulkan akibat infeksi virus ini seperti ikan berputar-putar atau *whirling*, terjadi *sleeping dead* atau ikan berada di dasar seperti mati serta adanya gejala tingkah laku yang tidak wajar atau abnormal (Rahmana *et al.*, 2013). Gejala abnormal yang terjadi ditandai dengan kesulitannya dalam menjaga

keseimbangan statis normal dan dinamis, kecepatan dan arah berenang serta kontrol inflamasi dari gelembung renang (Zorriehzakra *et al.*,2016).

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 (Eka *et al.*,2012). Infeksi virus ini juga menyerang sistem organ syaraf mata yang mengakibatkan ikan bertingkah laku berdiam diri di dasar perairan (Rahmana *et al.*, 2013). Infeksi VNN ditandai dengan terjadinya lesi vakuolasi pada beberapa bagian organ maupun syaraf.

Tanda khas pada penyakit ini seperti pola berenang ikan yang berputar-putar selalu dikaitkan dengan adanya vakuolasi pada sistem saraf pusat dan retina, Ikan yang terjadi vakuolasi retina mungkin akan mengalami keadaan gangguan penglihatan, sedangkan ikan dengan vacuolasi seluruh sistem saraf pusat tidak dapat dengan mudah menyesuaikan tingkah laku mereka sehingga dapat memastikan kelangsungan hidup ikan tersebut (Yanita *et al.*, 2013)

2.5 Inflamasi

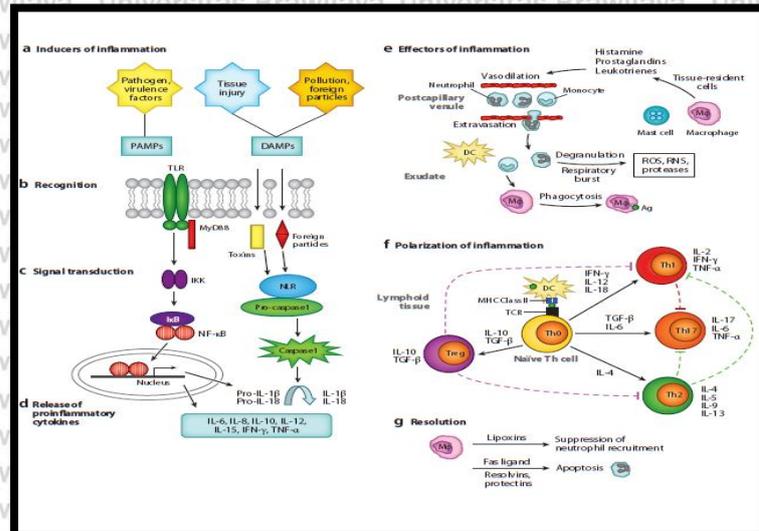
Inflamasi merupakan bentuk pertahanan sebagai respon nonspesifik merusak jaringan dan digunakan oleh sistem imun bawaan dan sistem imun adaptif untuk melawan patogen. Ciri khas dari respon inflamasi adalah kerusakan yang dialami diri sendiri (Graham *et al.*, 2005). Peradangan juga merupakan reaksi biologis terhadap homeostatis jaringan yang terganggu, dimana penghancuran jaringan ini melibatkan perekrutan produk yang berasal dari darah seperti protein plasma, cairan dan leukosit. Fungsi utama dari proses inflamasi yaitu dengan cepat menghancurkan atau mengisolasi sumber gangguan, menghapus jaringan yang rusak, dan kemudian mengembalikan homeostatis jaringan (Medzhitov, 2008).

Inflamasi terdiri dari sekumpulan imunologi, fisiologi, serta perilaku yang diatur oleh molekul sinyal sistem imun yang disebut sitokin. Langkah awal dari proses inflamasi melibatkan pengenalan infeksi atau kerusakan. Hal ini biasanya dicapai dengan mendeteksi pola molekul terkait patogen (PAMPs), yang secara khusus diarahkan pada motif umum molekul yang dinyatakan oleh patogen. Pola molekuler terkait kerusakan (DAMPs) merupakan molekul endogen yang menandai kerusakan atau nekrosis yang dikenali oleh sistem kekebalan bawaan.

Banyak sinyal kerusakan dikenali oleh reseptor kuman, seperti transmembran Toll like receptors (TLRs) dan domain pengikat nukleotida intraselular (Proell *et al.*, 2008). Begitu pengakuan ligans terjadi, TLRs mengaktifkan jalur persinyalan yang sama berujung pada aktivitas NF- κ B. Faktor transkripsi ini ditemukan di hampir semua jenis sel dan tetap dalam keadaan tidak aktif terikat pada protein inhibitor, I κ B (Ghosh *et al* 1998).

Transkripsi dan translasi gen mengarah ke tahap ketiga dari proses inflamasi, yang merupakan ekspresi sitokin proinflamatori yang dapat diinduksi, seperti interleukin-1-beta (IL-1 β), IL-6, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), dan lainnya. Setara dengan kemokinase dan berbagai molekul kostimulatori, protein terlarut ini memudahkan perekrutan sel efektor, seperti monosit dan neutrofil, ke lokasi gangguan. Neutrofil menciptakan lingkungan sitotoksik dengan melepaskan bahan kimia berbahaya dari butiran sitoplasma (proses yang disebut degranulasi).

Pelepasan cepat bahan kimia ini membutuhkan konsumsi glukosa dan oksigen, yang dikenal sebagai semburan pernapasan. Bahan kimia beracun dilepaskan termasuk spesies oksigen dan nitrogen yang sangat reaktif (ROS dan RNS, masing-masing). Zat dapat ini merusak kedua patogen dan inang dan pada dasarnya menginduksi pencairan jaringan di sekitarnya untuk mencegah metastasis patogen (Nathan 2002). Jalur primer proses inflamasi dapat dilihat pada gambar 8.



Gambar 8. Jalur Primer Inflamasi. (a) Patogen, cedera jaringan, dan partikel asing menyebabkan inflamasi/peradangan. (b) Transmembran TLRs dan NLRs intraselular mengikat ke PAMPs atau DAMPs. (c) TLR mengaktifkan jalur transduksi sinyal My-D88 yang melibatkan fosforilasi protein IκB inhibitori oleh IKK. NF-κB dilepaskan dari IκB dan translokasi ke inti dimana transkripsi diregulasi dengan mengikat gen target inflamasi. Sinyal NLRs mengaktifkan kaspase-1 untuk mengubah sitokin menjadi bentuk aktif (IL-1β dan IL-18), yang kemudian menimbulkan peradangan setelah dilepaskan dari sel. (d) Berbagai sitokin proinflamasi dan kemokin diproduksi dan dilepaskan untuk meningkatkan fungsi efektor peradangan. (e) Neutrofil dan monosit yang terbawa darah bermigrasi ke lokasi gangguan oleh kemotaksis dan selektif melewati sel endotel untuk mencapai lokasi target (ekstravasasi). Masuknya sel ini disertai dengan cairan kaya protein, yang dikenal sebagai eksudat, dan mempromosikan edema (pembengkakan). Sel prima dan jaringan makrofag mempromosikan migrasi ini dengan melepaskan histamin, leukotrien, dan prostaglandin. Neutrofil melepaskan senyawa beracun, termasuk ROS, RNS, dan berbagai protease, yang nonspesifik dan membahayakan patogen dan inang. Sel makrofag dan dendritik berpartisipasi dalam fagositosis Ag. (f) Sel-sel ini bermigrasi ke jaringan limfoid dan sel-sel T naif prima (Th0) menjadi terpolarisasi melalui stimulasi TCR oleh antigen yang terikat pada reseptor MHC kelas II. Sel Th0 berdiferensiasi menjadi beberapa jenis sel efektor dan regulator: Sel Th1 (proinflamasi), sel Th2 (antiinflamasi), Tregs (peraturan) dan sel Th17 (proinflamasi). (g) Resolusi peradangan terjadi ketika neutrofil mempromosikan peralihan leukotrien yang diproduksi oleh makrofag dan sel lainnya. Untuk lipoksin, yang memulai penghentian peradangan (Ashley *et al.*, 2012).

2.6 PCR dan RT-PCR

Dalam penelitian ini, ekspresi Hsp akan dilihat dengan menggunakan metode PCR sedangkan untuk virus VNN akan menggunakan RT-PCR.

Polymerase chain reaction (PCR) merupakan teknik ilmiah dalam biologi molekular untuk memperkuat satu atau beberapa salinan dari sepotong DNA di beberapa

perintah besarnya, menghasilkan ribuan untuk jutaan salinan DNA urutan tertentu (Joshi dan Deshpande, 2010). Prinsip dasar PCR adalah reaksi berantai, yang berarti Satu molekul DNA digunakan untuk menghasilkan dua salinan, lalu empat, lalu delapan dan sebagainya. Penggandaan terus menerus ini dilakukan oleh protein spesifik yang dikenal sebagai polimerase, enzim yang mampu mengikat bersama-sama bangunan DNA individu untuk membentuk untaian molekul yang panjang. Untuk lakukan pekerjaan mereka polimerase memerlukan pasokan blok bangunan DNA, yaitu nukleotida terdiri dari empat basis adenin (A), timin (T), sitosin (C) dan guanin (G). Mereka juga butuh fragmen DNA kecil, yang dikenal sebagai primer (Kleinschmidt-DeMasters *et al.*, 2001).

Sedangkan untuk RT-PCR sebenarnya merupakan metode evolusioner PCR yang diungsikan untuk memperkuat potongan DNA tertentu lebih dari satu miliar kali lipat. PCR real-time hanya mengacu pada amplifikasi DNA (oleh PCR) yang dimonitor sementara amplifikasi sedang terjadi. Manfaat kemampuan real-time ini adalah bahwa hal itu memungkinkan peneliti untuk lebih menentukan jumlah DNA awal dalam sampel sebelum amplifikasi oleh PCR. Metode real-time hari ini umumnya melibatkan probe fluorogenik yang menyala untuk menunjukkan jumlah DNA yang ada pada setiap siklus PCR. Kinetic PCR mengacu pada proses ini juga. Kuantitatif PCR mengacu pada kemampuan untuk menghitung jumlah awal urutan DNA tertentu (Valasek dan Repa, 2005).

2.7 *Chlorella vulgaris*

Nama *Chlorella* berasal dari bahasa Yunani yaitu Chloros (Χλωρός) yang memiliki arti hijau serta akhiran ella yaitu dari bahasa Latin yang mengacu pada ukuran mikroskopisnya (Safi *et al.*, 2014). *Chlorella vulgaris* merupakan salah satu alga yang banyak memiliki kandungan didalamnya yaitu mencakup protein yang mencapai 60%, vitamin, mineral, karbohidrat, lemak, klorofil serta beta karoten

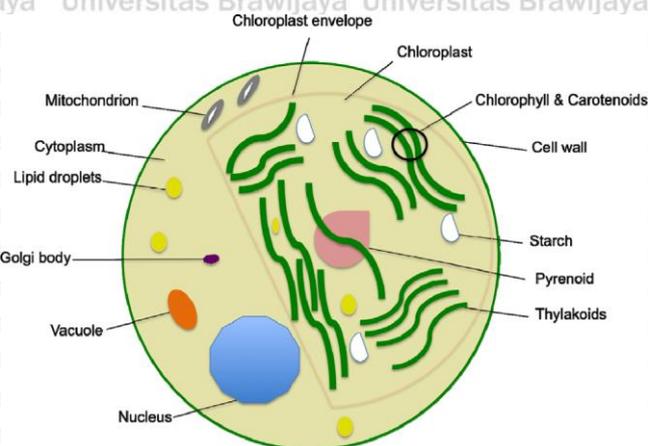
(Tang dan Paolo, 2011; Purnamawati *et al.*,2013). *Chlorella* banyak ditemukan di beberapa habitat yaitu di air laut, air tawar serta habitat edapik (Bock *et al.*,2011).

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

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

2.7.1 Morfologi

Sel *Chlorella* memiliki bentuk yang bulat dengan ukurannya 2-8 μm . Alga ini juga memiliki sel protoplas yang dikelilingi oleh membran yang selektif tetapi terdapat dinding yang tebal pada bagian luar membran selnya yang terbentuk oleh pektin dan selulosa (Purnamawati *et al.*,2013). Kekakuan pada dinding sel *Chlorella* pada dasarnya bervariasi tergantung pada setiap fase hidupnya. Pada awal kehidupannya, dinding sel masih dalam keadaan yang rapuh dengan membentuk elektron yang tipis (2 nm), selanjutnya dinding sel secara bertahap akan meningkat ketebalannya (mencapai 17-21 nm) (Safi *et al.*,2014). Struktur sel dari mikroalga *Chlorella vulgaris* dapat dilihat pada gambar 9.



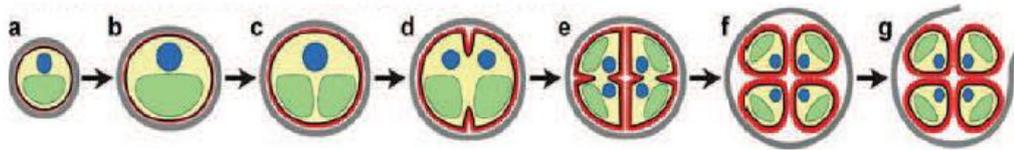
Gambar 9. Struktur Sel *C.vulgaris* (Safi *et al.*,2014)

Pada internal organelnya *C. vulgaris* juga memiliki mitokondria, kloroplas tunggal, badan golgi serta nucleus kecil yang diselimuti oleh sitoplasma yang memiliki fungsi sebagai zat penghalang membran sel (Safi *et al.*,2014). Pyrenoid pada semua spesies mikroalga umumnya memiliki struktur yang seragam, yang dikelilingi oleh selubung pati yang dibelah oleh dua tilakoid (Nemcova dan Tomas, 2000). *C.vulgaris* juga merupakan mikroalga pertama yang ditemukan memiliki dinding yang disebut nukleus, ditemukan oleh seorang peneliti dari Jerman pada tahun 1890 (Safi *et al.*,2014). Dinding sel *C. vulgaris* terdiri dari dua daerah yaitu pada bagian luar merupakan daerah yang sempit yang merupakan elektron padat yang dipisahkan oleh lapisan padat non elektron dengan ketebalan 120 dan 150 A, sedangkan pada bagian dalam, yang memisahkan lapisan luar dari plasmalema jauh lebih padat dengan ketebalan sekitar antara 2000 sampai 4000 A (Griffiths dan Griffiths, 1969).

2.7.2 Reproduksi

Reproduksi *Chlorella* melalui proses aseksual dan cepat dengan pembentukan autospora yang merupakan bentuk miniatur dari sel induk (Purnamawati *et al.*,2013). Proses ini terjadi selama 24 jam, satu sel dari *C. vulgaris* dalam kondisi yang optimal dapat berkembangbiak secara autosporeulasi

yang merupakan reproduksi asexual yang paling umum pada alga. Keempat sel anak alga memiliki dinding sel mereka sendiri yang terbentuk didalam dinding sel dari sel induk, setelah proses pematangan, sel induk akan melepaskan sel anak (Safi *et al.*,2014). Fase pertumbuhan *C. vulgaris* dapat dilihat pada gambar 10.

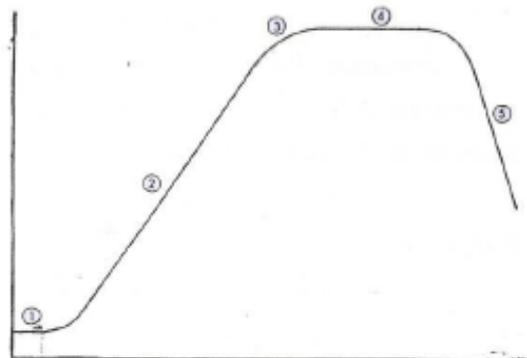


Gambar 10. Fase pembenturan dinding sel pada *Chlorella vulgaris*. (a) Fase pertumbuhan sel awal. (b) fase pertumbuhan sel yang terlambat (c) Fase kloroplas terbagi (d) Fase pembentukan awal protoplas (e) fase akhir, protoplas terbagi akhir (f) Fase pematangan sel anak (g) Tahap penetasan (Safi *et al.*,2014).

Dalam tahap berkembang sel, sel tumbuh dari diameter 2,5 sampai 5-7 μm . Pada awal tahap pembelahan sel, kloroplas awalnya terbagi menjadi dua, makan nukleus dan protoplas pertama terbentuk.

2.7.3 Fase Pertumbuhan

Selama pertumbuhannya mikroalga mengalami beberapa fase antara lain seperti fase lag (istirahat), fase log/eksponensial, fase penurunan laju pertumbuhan, fase stasioner dan fase kematian. Kurva pertumbuhan mikroalga dapat dilihat pada gambar 11.



Gambar 11. Kurva pertumbuhan mikroalga (Fogg dan Thake 1987)

1. Fase lag (istirahat).

Sejak dari penambahan inokulum ke media kultur hingga beberapa saat sesudahnya, fase ini terjadi peningkatan paling signifikan ukuran selnya karena secara fisiologis mikroalga menjadi sangat aktif. Pada fase ini terjadi sintesis protein dan metabolisme berjalan tetapi pembelahan sel belum terjadi sehingga kepadatan sel belum meningkat karena mikroalga sedang beradaptasi dengan lingkungan barunya (Purnamawati *et al.*, 2103). Selama fase adaptasi kultur alga menyesuaikan diri terhadap kondisi, laju pertumbuhan lebih rendah dan akan meningkat dengan waktu kultivasi. Sel menjadi sensitif terhadap suhu atau perubahan lingkungan lainnya (Fogg dan Thake, 1987).

2. Fase logaritmik (log) atau eksponensial.

Selama periode ini intensitas cahaya tidak terbatas dan perubahan konsentrasi nutrisi masih kecil pengaruhnya. Dalam sebuah kultur, dimana persediaan nutrisi dan cahaya tidak terbatas, biomas alga bertambah per waktu secara proporsional (Fogg dan Thake, 1987). Pada fase ini terjadi pembelahan sel sehingga laju pertumbuhan meningkat secara intensif. Dalam kondisi yang optimum, laju pertumbuhan dapat mencapai nilai maksimal sehingga dapat dilakukan pemanenan untuk keperluan pakan ikan dan industri (Purnamawati *et al.*, 2103).

3. Fase penurunan laju pertumbuhan.

Pada fase ini alga tumbuh pada kultur yang padat, tidak ada penambahan atau pengurangan dari medium setelah inokulasi, penurunan logaritmik mulai terjadi (Fogg dan Thake, 1987). Pembelahan sel masih terjadi pada fase ini meskipun tidak seintensif fase log, sehingga laju pertumbuhan menurun dibandingkan fase sebelumnya.

4. Fase stasioner.

Pada fase ini suplai cahaya per sel alga menjadi terbatas dan peranan respirasi mulai meningkat. Kurva pertumbuhan mendekati nilai limit, yaitu fase stasioner. Laju reproduksi dan laju kematian relatif seimbang pada fase ini. Kepadatan mikroalga relatif tetap karena penambahan dan pengurangan jumlah mikroalga seimbang (Purnamawati *et al.*, 2103).

5. Fase kematian.

Fase ini merupakan berakhirnya fase stasioner, yang mana populasi sel berkurang, sel-sel alga mulai mengeluarkan bahan organik, pertumbuhan terhambat. Terjadinya fase ini disebabkan oleh umur kultur yang sudah tua, suplai cahaya dan nutrisi terbatas. Pada fase ini laju kematian menjadi tinggi. Jumlah sel pada fase ini mengalami penurunan karena laju kematian lebih besar daripada laju reproduksi (Fogg dan Thake, 1987).

2.7.4 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan

Pertumbuhan *C. vulgaris* dipengaruhi oleh beberapa hal seperti organisme yang lainnya. Untuk mendapatkan pertumbuhan yang optimal, mikroalga ini memiliki beberapa faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhannya. *Chlorella* sp membutuhkan beberapa faktor lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhannya di kultur terbuka antara lain : intensitas cahaya, suhu, salinitas, pH, kandungan oksigen, dan aerasi (Regista *et al.*, 2017). Semua faktor tersebut harus berada dalam kondisi optimum untuk pertumbuhan mikroalga agar produk sel dan bahan metabolit berada dalam keadaan maksimum (Sutomo, 2005).

1. Intensitas Cahaya

Faktor yang dapat mempengaruhi pertumbuhan salah satunya adalah intensitas cahaya yang dapat diserap oleh sel dalam kultur. Sebagai organisme fotoautotrof, cahaya memegang peranan penting dalam pertumbuhan *C. vulgaris*.

Cahaya adalah sumber energi selama fase pertumbuhan fotoautotrofik dan organisme menggunakan energi cahaya mengubah karbon dioksida menjadi senyawa organik, terutama gula (Juneja *et al.*,2013). Cahaya yang dibutuhkan *C. vulgaris* sebagai energi untuk melakukan proses fotosintesis adalah 8000 lx (Singh dan Priyanka, 2015). Bila cahaya yang terserap oleh *Chlorella sp.* berkurang menyebabkan laju fotosintesis berjalan lambat, sehingga mengakibatkan pertumbuhan sel menurun (Regista *et al.*,2017). Sedangkan peningkatan intensitas cahaya diatas batas jenuh menyebabkan terjadinya fotoinhibisi (You dan Barnett, 2004). Hal ini menyebabkan terganggunya kloroplas lamellae yang disebabkan oleh intensitas cahaya yang tinggi (Brody dan Vatter, 1959) dan inaktivasi enzim yang terlibat dalam fiksasi karbon dioksida (Iqbal dan Zafar, 1993).

2. Suhu

Suhu mungkin merupakan salah satu faktor lingkungan yang terpenting yang mempengaruhi tingkat pertumbuhan, ukuran sel, komposisi biokimia dan kebutuhan nutrisi mikroalga (Juneja *et al.*,2013). Suhu juga mempengaruhi suatu stadium daur hidup organisme dan merupakan faktor pembatas penyebaran suatu spesies. Suhu adalah salah satu faktor yang berpengaruh terhadap produktifitas mikroalga, karena setiap spesies mempunyai suhu optimalnya tersendiri. Peningkatan suhu air menyebabkan peningkatan aktivitas sel sehingga metabolisme berjalan lebih cepat, akan tetapi suhu yang tinggi juga menyebabkan kematian dengan cepat (Regista *et al.*,2017). Suhu yang rendah juga dapat menurunkan fluiditas pada membran sel mikroalga, sel kemudian dikompensasikan dengan meningkatkan kadar asam lemak tak jenuh untuk meningkatkan fluiditas namun itu juga membuat selaput lebih rentan terhadap kerusakan akibat radikal bebas (Reven dan Geider, 1988). *C. vulgaris* memiliki suhu optimal dalam pertumbuhannya pada 25°C (Converti *et al.*,2009.)

3. pH

Faktor lain seperti pH juga merupakan faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan dan metabolisme mikroalga. pH juga menentukan kelarutan dan ketersediaan CO₂ dan nutrisi penting bagi pertumbuhan mikroalga, dan karena dapat memiliki dampak yang signifikan pada metabolisme mikroalga (Goldman, 1973). Pertumbuhan mikroalga maksimal terjadi di sekitar pH netral, walaupun pH optimum adalah pH awal kultur dimana mikroalga disesuaikan untuk tumbuh.

Mengubah pH di media dapat membatasi pertumbuhan mikroalga via penghambatan metabolisme (Goldman *et al.*, 1982). Kisaran pH untuk sebagian besar spesies mikroalga budidaya adalah antara 7 dan 9, dengan kisaran optimum 8,2 - 8,7, meskipun ada spesies yang tinggal di lingkungan yang lebih asam / dasar (Blinovia *et al.*, 2015).

pH yang lebih tinggi membatasi ketersediaan karbon dari CO₂, yang pada gilirannya dapat menekan pertumbuhan mikroalga (Azov, 1982). Pada pH yang lebih tinggi, karbon untuk mikroalga tersedia dalam bentuk karbonat (Nielsen, 1975). pH yang lebih tinggi juga dapat menyebabkan penurunan afinitas mikroalga (Rotatore dan Colman, 1991).

4. Salinitas

Salinitas merupakan faktor penting lain yang berfungsi dapat merubah komposisi biokimia sel mikroalga. Salinitas optimal untuk pertumbuhan *C. vulgaris* adalah 20-30 ‰ (Raghavan *et al.*, 2008). Perubahan salinitas, baik menurunkan maupun salinitas yang lebih tinggi daripada optimal pertumbuhan mereka dapat mengubah tingkat pertumbuhan dan perubahan komposisinya (Juneja *et al.*, 2013).

5. Nutrien atau Unsur Hara

Nutrien atau unsur hara merupakan parameter penting yang mendukung pertumbuhan mikroalga selain cahaya, CO₂, salinitas dan suhu (Sen *et al.*, 2005). Unsur hara atau nutrien yang dibutuhkan dalam pertumbuhan mikroalga

terdiri atas mikronutrien dan makronutrien. Mikronutrien yang dibutuhkan dalam pertumbuhan mikroalga antara lain seperti Fe, Cu, Mn, Zn, Co, Mo, Bo, Vn dan Si, sedangkan untuk makronutrien yang dibutuhkan antara lain seperti C, H, N, P, K, S, Mg dan Ca. Dari semua nutrien diatas terdapat dua unsur utama yang menjadi faktor pembatas dalam pertumbuhan mikroalga yaitu unsur P dan N. Mikronutrien seperti besi dan mangan juga dibutuhkan dalam jumlah kecil yaitu sebanyak 3,0-2,5 ppm sedangkan unsur lainnya seperti kobalt, seng, boron, tembaga dan molibdenum adalah elemen jejak yang penting yang dibutuhkan sekitar 4,5-2,5 ppm (Walker, 1954). Secara umum defisiensi nutrien pada mikroalga mengakibatkan penurunan protein, pigmen fotosintesis, serta kandungan produk karbohidrat dan lemak (Healey, 1973).

6. Aerasi/ pencampuran

Pencampuran (*mixing*) sangat penting bagi budaya mikroalga. Ada berbagai metode untuk merangsang pencampuran dalam budaya mikroalga. Namun, jenis pencampuran yang akan diadopsi bergantung pada berbagai faktor, seperti jenis strain mikroalga, jenis sistem kultur (yaitu kolam terbuka atau fotobioreaktor), skala sistem budaya (yaitu, budaya kecil atau skala besar), dan juga lingkungan di mana budaya dioperasikan (yaitu tipe indoor atau outdoor) (Ugwu dan Aoyagi, 2012). Pencampuran diperlukan untuk mencegah sedimentasi mikroalga, untuk memastikan bahwa semua sel populasi sama-sama terpapar cahaya dan nutrisi, untuk menghindari stratifikasi termal (misalnya dalam budaya luar) dan memperbaiki pertukaran gas antara media kultur dan udara. Yang terakhir ini sangat penting karena udara mengandung sumber karbon untuk fotosintesis dalam bentuk karbon dioksida. Bergantung pada skala sistem kultur, pencampuran dicapai dengan pengadukan setiap hari dengan tangan (tabung reaksi, erlenmeyer), aerating (tas, tangki), atau menggunakan roda dayung dan jetpumps

(kolam). Namun, perlu dicatat bahwa tidak semua spesies alga dapat mentolerir pencampuran yang kuat (Lavens dan Sorgeloos, 1996).

2.8 Bioaktif Peptida Alami

Mikroalga merupakan kelompok organisme laut yang memiliki jalur metabolisme kompleks dan unik yang menghasilkan senyawa organik bioaktif.

Bioaktif peptida didefinisikan sebagai fragmen protein spesifik yang memiliki dampak positif pada fungsi tubuh atau kondisi dan mungkin mempengaruhi kesehatan (Kitts dan Weiler, 2003). Bioaktif peptida merupakan zat organik yang terbentuk oleh asam amino yang bergabung dengan ikatan kovalen juga dikenal sebagai amida atau ikatan peptida, sedangkan protein merupakan polipeptida yang lebih besar berat molekulnya (MW). Senyawa tersebut meliputi protein, linier peptida, peptida siklik dan depsi-peptida, turunan peptida, asam amino, dan komponen asam amino (Sánchez dan Vázquez, 2017)

Chlorella merupakan jenis alga yang sangat kaya akan kandungan protein yaitu hampir 60% yang sebagian besar adalah asam amino juga vitamin dan mineral (Tang dan Paolo, 2011). Mikroalga secara umum juga mengandung senyawa bioaktif berharga lainnya seperti pigmen aksesori karotenoid, karotenoid utama dalam mikroalga meliputi β -karoten, lutein, astaxanthin, fucoxanthin, violaxanthin dan zeaxanthin (Safar *et al.*, 2016).

2.8.1 Pigmen Protein

Mikroalga merupakan kelompok organisme autotrofik yang dikenal sebagai sumber bahan baku yang berpotensi karena memiliki kandungan kimia yang sangat kompleks. Komposisi kimia dari biomassa mikroalga dipelajari dengan baik dan mengandung protein, karbohidrat, lipid, pigmen, vitamin, antioksidan, dan elemen jejak. Protein bisa menjadi senyawa yang paling dominan dalam mikroalga seperti *Chlorella sp.* (Viegas *et al.*, 2015). Secara mikroalga luas menyajikan

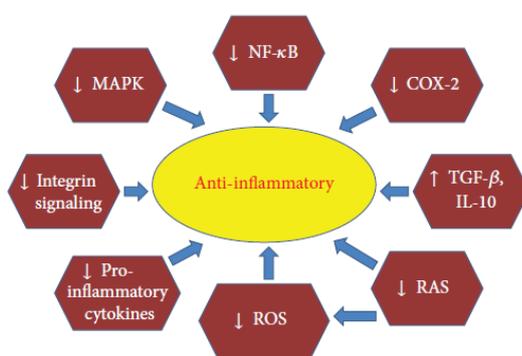
semua asam amino esensial seperti arginin, fenilalanin, histidin, isoleusin, leusin, lisin, metionin, treonin, triptofan, dan valin (Becker, 2007).

Mikroalga juga mengandung senyawa bioaktif berharga lainnya seperti pigmen karotenoid. Karotenoid utama dalam mikroalga meliputi β -karoten, lutein, astaxanthin, fukoxanthin, violaxanthin dan zeaxanthin. Astaxanthin dan lutein digunakan untuk meningkatkan pigmentasi pada ikan dan sebagai pewarna makanan, obat-obatan, dan kosmetik masing-masing (Gouveia, 1998). Hal ini juga diketahui bahwa *Chlorella* sp. kaya akan lutein (Viegas *et al.*, 2015), dengan akumulasi lutein hingga 0,45% dari berat sel kering di beberapa spesies, yang kemudian membuat lutein pada karotenoid primer dalam ganggang hijau ini (Sun *et al.*, 2016). Dalam beberapa penelitian mengatakan bahwa fagmen dari pigmen protein *Chlorella* memiliki banyak manfaat, diantaranya dapat dikembangkan dan diaplikasikan sebagai antiviral dan anti-inflamasi pada infeksi virus pada ikan kerapu (Yanuhar, 2015).

2.8.1.1 Peptida Sebagai Anti-inflamasi

Keanekaragaman molekul protein dan peptida dari mikroalga laut menunjukkan sifat anti-inflamasi (Kim *et al.*, 2010). Inflamasi merupakan respon tubuh terhadap luka nonlethal yang ditandai dengan meningkatkan permeabilitas endotel, kebocoran protein, dan infiltrasi leukosit menjadi ekstrasvaskular jaringan (Chakrabarti *et al.*, 2014). Endotelium vaskular memainkan peran kunci sebagai penjaga gerbang untuk ekstrasvasi leukosit yang terdapat ciri-ciri peradangan. Namun, jaringan makrofag, sel epitel, dan fibroblas sering terlibat dalam pembangkitan dari mediator yang menimpa dan kemudian mengaktifkan endothelium melalui ekspresi molekul adhesileukosit seperti molekul adhesi interselular-1 (ICAM-1) dan molekul adhesi sel vaskular-1 (VCAM-1) yang merekrut leukosit dari aliran darah.

Mediator seperti berbagai sitokin proinflamasi (seperti faktor tumor nekrosis dan interleukin (IL-1 β)), kemokin (seperti IL-8 dan *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1)), dan spesies oksigen reaktif (ROS, seperti superoksida dan peroksinitrit) terlibat dalam respon inflamasi. Sejumlah jalur sinyal intraselular diaktifkan dalam sel termasuk faktor nuklear-kappaB (NF- κ B), protein aktif mitogen (MAP) kinase, dan protein aktivator-1 (AP-1) (Csiszar *et al*, 2008). Mekanisme aksi anti-inflamasi bioaktif peptida dapat dilihat pada gambar 12.



Gambar 12. Mekanisme aksi anti-inflamasi potensial peptida bioaktif dan protein peptida hidrolisat. MAPK: mitogen activated protein kinase; NF- κ B: nuclear factor- κ B; COX- 2: cyclo-oxygenase-2; TGF-beta: transforming growth factor-beta; IL-10: interleukin-10; RAS: renin-angiotensin system; ROS: reactive oxygen species (Chakrabarti *et al.*, 2014).

2.8.2 Karotenoid

Karotenoid merupakan igmen isopronoid alami yang dibiosintesis oleh tanaman fotosintesis, protista, beberapa bakteri dan beberapa jenis invertebrata.

Subtipe utama karotenoid adalah karoten (karotenoid hidrokarbon) dan xantofil (turunan oksigenat). Karotenoid terdiri dari banyak pigmen kuning, oranye dan merah (Cazzonelli, 2011). Lima karotenoid utama adalah diproduksi secara sintesis pada skala industri (lycopene, β -carotene, canthaxanthin, zeaxanthin) (Markou *et al.*, 2015). Mikroalga adalah sumber karotenoid yang kaya (Varela *et al.*, 2015).

Mikroalga laut mengandung hingga 0,2% dari karotenoid. *Chlorella* merupakan

salah satu mikroalga yang memiliki kandungan karotenoid seperti canthaxanthin, astaxanthin dan lutein (Guedes *et al.*, 2011).

2.8.2.1 Karotenoid Sebagai Anti-Inflamasi

Karotenoid memiliki banyak manfaat salah satunya yaitu sebagai anti-inflamasi. Astaxanthin telah digunakan untuk mencegah proses inflamasi, seperti kolitis, dan beberapa jenis kanker. Aktivitas antiinflamasi astaxanthin dalam model seluler disebabkan oleh supresi ekspresi iNOS (Choi *et al.*, 2008). Efek penghambatan astaxanthin pada produksi NO memiliki implikasi penting untuk pengobatan. Astaxanthin menginduksi apoptosis yang mengatur ekspresi COX-2, dan NF- κ B (Nagendraprabhu *et al.*, 2011). Diet astaxanthin dapat memperbaiki kolon peradangan dengan mengurangi faktor proinflamasi TNF- α , IL-1 β , COX-2 dan NF- κ B (Yasui *et al.*, 2011).

2.8.3 Fikobiliprotein

Fikobiliprotein merupakan pigmen fotositik utama pada cyanobacteria yang merupakan protein yang sangat berwarna dan mudah larut dalam air (Patel *et al.*, 2005). Fikobiliprotein adalah konstituen dari struktur subselular yang disebut fikobilisom, dan terikat secara kovalen melalui asam amino sistein kromofor, fikobilin (Chistaki *et al.*, 2015). Berdasarkan warna dan kemampuan absorpsinya, fikobilin dibagi menjadi 4 kelompok yaitu phycoerythrin (PE)-pigmen warna merah, allophycocyanin (APC)-hijau kebiruan, phycocyanin (PC)-biru, dan phycoerythro-cyanin (PEC)- pigmen oranye (Cohen-Bazire, Bryant, 1982). Phycocyanin adalah phycobiliprotein yang menunjukkan berbagai sifat farmakologis. Dalam hal ini, efek antioksidan, antiinflamasi, neuroprotektif dan hepatoprotektif (Romay *et al.*, 2003).

2.9 Acuan Penggunaan Dosis untuk Uji In-Vivo Ekstrak *C. vulgaris*

Dosis merupakan salah satu variabel yang sering digunakan dalam penelitian eksperimen. Pemberian dosis yang berbeda pada penelitian eksperimen bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian dosis yang berbeda tersebut terhadap hewan uji. Penentuan dosis biasanya mengacu pada uji klinis pendahuluan maupun mengacu pada literatur yang telah ada. Dalam penelitian tentang mikroalga *C. vulgaris* sebagai inducer anti-inflamasi ini dosis yang digunakan merupakan hasil uji klinis penelitian sebelumnya. Pemberian dosis dalam penelitian ini mengacu pada Yanuhar (2015), yaitu dengan pemberian ekstrak sebanyak 33 $\mu\text{g/mL}$. Dalam penelitian tersebut menyebutkan bahwa dengan pemberian dosis ekstrak sebanyak 33 $\mu\text{g/mL}$ dapat meningkatkan ekspresi gen target dan meningkatkan sistem kekebalan tubuh pada ikan kerapu.



3. KONSEP PENELITIAN

3.1 Landasan Teori

Viral nervous necrosis (VNN) merupakan salah satu contoh virus genom RNA yaitu terdiri dari dua molekul (RNA1 dan RNA2) (Tan *et al.*, 2001). Infeksi oleh virus ini memicu terjadinya inflamasi/peradangan pada jaringan ikan. Peradangan terjadi sebagai respons terhadap infeksi, sengatan panas maupun stres seluler. Inflamasi merupakan bentuk pertahanan yang meluas yang didefinisikan secara luas sebagai respon non-spesifik kerusakan jaringan dan digunakan oleh sistem imun bawaan dan adaptif untuk melawan patogen, dalam hal ini adalah VNN. Inflamasi terdiri dari sekumpulan imunologi, fisiologi dan perilaku yang diatur oleh molekul imun yang disebut sitokin (Asley *et al.*, 2012).

Pada jalur inflamasi, langkah pertama melibatkan pengenalan infeksi atau kerusakan dengan mendeteksi pola molekul terkait patogen (PAMPs). Sinyal kerusakan selanjutnya dikenali oleh TLRs. TLR mengaktifkan jalur persinyalan yang sama berujung pada aktivasi NF- κ B. NF- κ B adalah faktor transkripsi yang memainkan peran penting dalam regulasi berbagai gen yang terlibat dalam respons inflamasi. Pada kebanyakan tipe sel, NF- κ B, yang mana biasanya diasingkan di sitoplasma dalam bentuk tidak aktif yang terikat pada I κ B (Ghosh *et al.*, 1998). Transkripsi dan translasi gen mengarah pada ekspresi sitokin proinflamasi yang dapat diinduksi seperti interleukin-1-beta (IL-1 β), IL-6, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), dan lainnya, yang selanjutnya akan mengakibatkan kerusakan pada jaringan.

Pola molekul terkait kerusakan (DAMPs) merupakan molekul endogen yang menandai kerusakan atau nekrosis dan juga dikenali oleh sistem kekebalan, salah satunya adalah *heat shock protein* (Janeway *et al.* 2005). Hsp merupakan keluarga

protein yang dinyatakan sebagai respon terhadap berbagai macam pemicu biotik dan abiotik termasuk infeksi virus. Protein ini telah dikelompokkan menjadi beberapa keluarga berdasarkan berat molekulnya seperti Hsp90 (85-90 kDa), Hsp70 (68-73 kDa), Hsp60, Hsp47, dan Hsps kecil (12-43 kDa) (Park *et al.*, 2007).

Ekspresi heat shock protein dimulai dengan adanya infeksi patogen asing (dalam penelitian ini infeksi virus) yang merupakan salah satu heat shock factor (HSF).

HSF akan mengaktifkan pengikatan transkripsi kejutan panas ke area promotor utama, yang disebut elemen kejutan panas (HSE). Selanjutnya transkripsi dari HSF akan menghasilkan ekspresi dari HSP (Iwama *et al.*, 1998).

Inducer ekspresi Hsp sebagai anti-inflamasi yang berasal dari bahan-bahan alami belum banyak dikembangkan, yaitu salah satunya penggunaan senyawa bioaktif mikroalga. *Chlorella vulgaris* merupakan salah satu jenis mikroalga hijau bersel satu yang dapat tumbuh dan ditemui di daerah-daerah beriklim hangat. *C. vulgaris* memiliki banyak kandungan didalamnya yaitu mencakup protein, vitamin, mineral, karbohidrat, lemak, klorofil serta beta karoten. Dalam ekstrak kasar *C. vulgaris* mengandung beberapa komponen penting seperti karotenoid, alkaloid, flavonoid, glikosida, fenol, lignin, saponin, asam amino dan karbohidrat (Adhoni *et al.*, 2016). Kandungan bioaktif ini dapat digunakan sebagai sumber antioksidan, antibakteri, antiviral, maupun anti-inflamasi. Dalam perannya sebagai agen anti-inflamasi, bioaktif dari *C. vulgaris* berperan sebagai *Co-inducer* dari *Heat Shock Respon* (HSR). *Co-inducer* secara parsial mengaktifkan komponen HSR, dimana sinyal tegangan lebih lanjut diperlukan untuk aktivasi penuh transkripsi HSP (Wieten *et al.*, 2007).

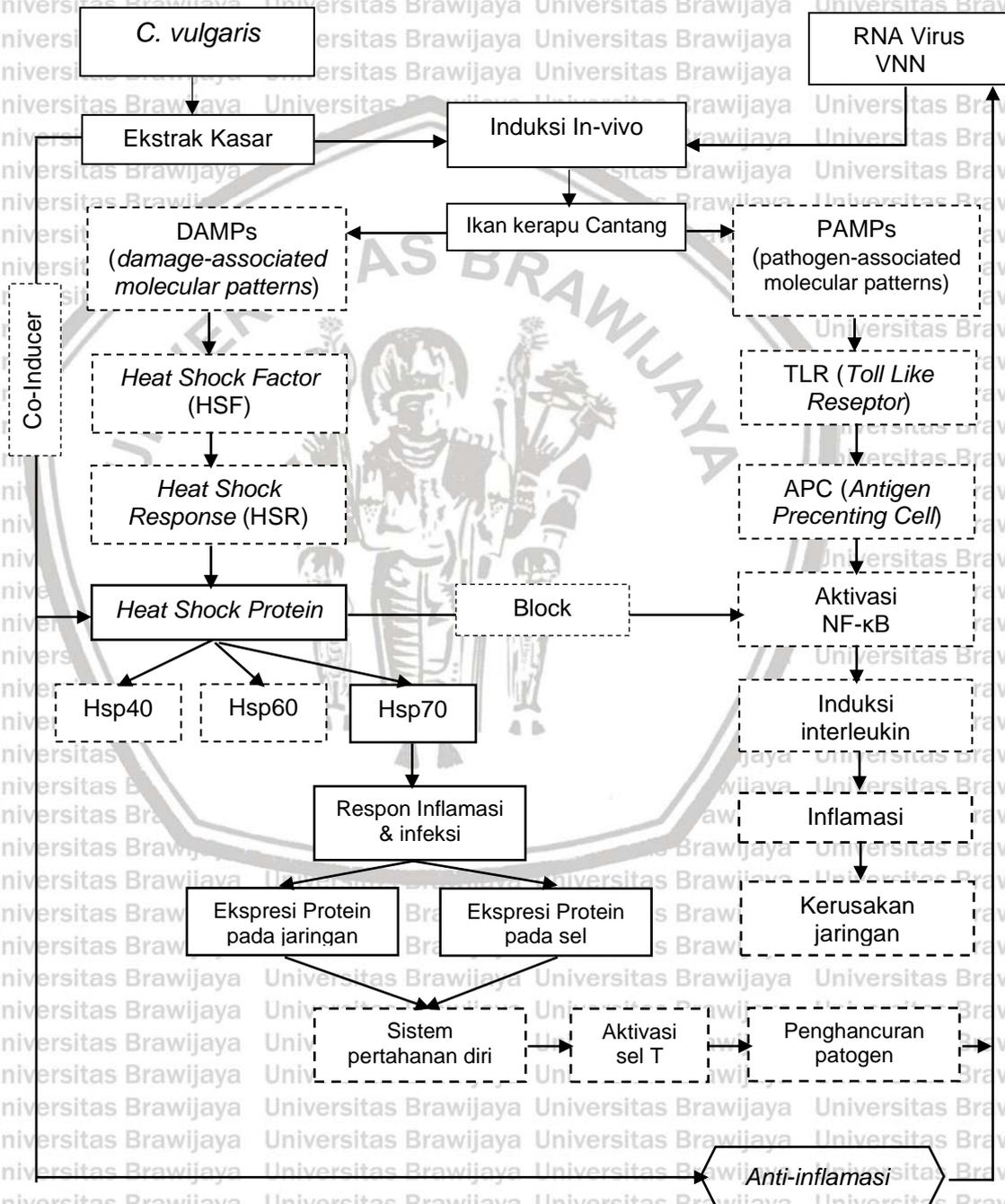
Sebagai molekul anti-inflamasi, selama infeksi ekspresi *Heat shock protein* 70 (Hsp70) meningkat sehingga memberikan sitoproteksi dengan menghambat komponen jalur sinyal inflamasi, seperti faktor transkripsi NF- κ B. Peningkatan kadar Hsp berfungsi untuk merangsang respon inflamasi melalui sejenis *Toll*

receptor 2 (TLR2)/ TLR 4/CD14 tergantung mekanisme yang mengarah pada aktivitas NF- κ B, TNF- α , IL1- β dan produksi IL-6. HSR dapat memblokir jalur NF- κ B dengan meningkatkan ekspresi gen I- κ B α . Hsp dapat membangkitkan modulasi kekebalan tubuh dengan menyediakan target regulasi Sel T spesifik. HSP (Knowlton, 2006).



3.2 Kerangka Konsep Penelitian

Dalam penelitian ini ingin dilihat bagaimana pengaruh pemberian ekstrak kasar *C. vulgaris* dari mikroalga laut *C. vulgaris* untuk meningkatkan ekspresi Hsp ikan Kerapu terhadap infeksi virus VNN sebagai penanda anti-inflamasi. Kerangka konsep penelitian dapat dilihat pada gambar 13 dibawah ini:



Gambar 13. Kerangka Konseptual Penelitian

Keterangan :

-  : Diteliti
-  : Tidak diteliti
-  : Berhubungan
-  : Berpengaruh
-  : Sebab akibat
-  : Perbandingan

3.3 Hipotesis

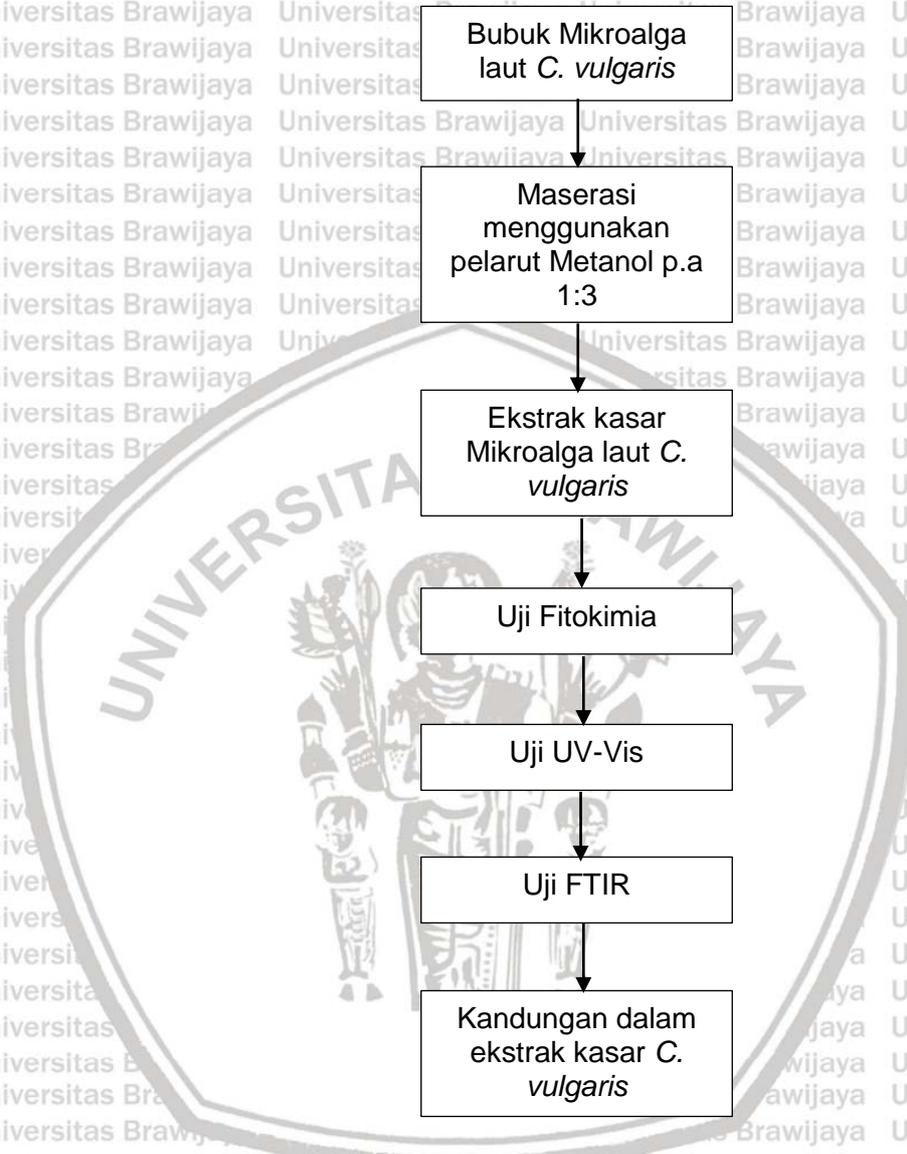
H₀ : Pemberian ekstrak kasar mikroalga laut *C. vulgaris* tidak meningkatkan ekspresi *heat shock protein* pada ikan kerapu cantang (*Epinephelus* sp) yang diinfeksi *viral nervous necrosis* (VNN)

H₁ : Pemberian ekstrak kasar mikroalga laut *C. vulgaris* meningkatkan ekspresi *heat shock protein* pada ikan kerapu cantang (*Epinephelus* sp) yang diinfeksi *viral nervous necrosis* (VNN)

H₂ : Pemberian ekstrak kasar mikroalga laut *C. vulgaris* meningkatkan respon imunologi pada ikan kerapu cantang (*Epinephelus* sp) yang diinfeksi *viral nervous necrosis* (VNN)

3.4 Kerangka Operasional Penelitian

Penelitian Tahap 1

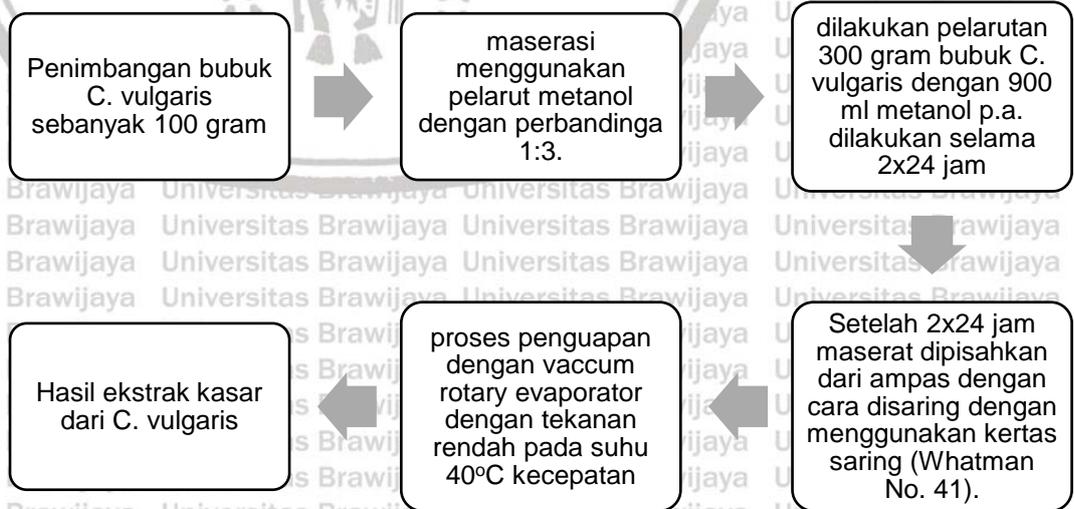


Gambar 14. Kerangka Operasional Penelitian Tahap 1

Tahap penelitian yang akan dilakukan antara lain :

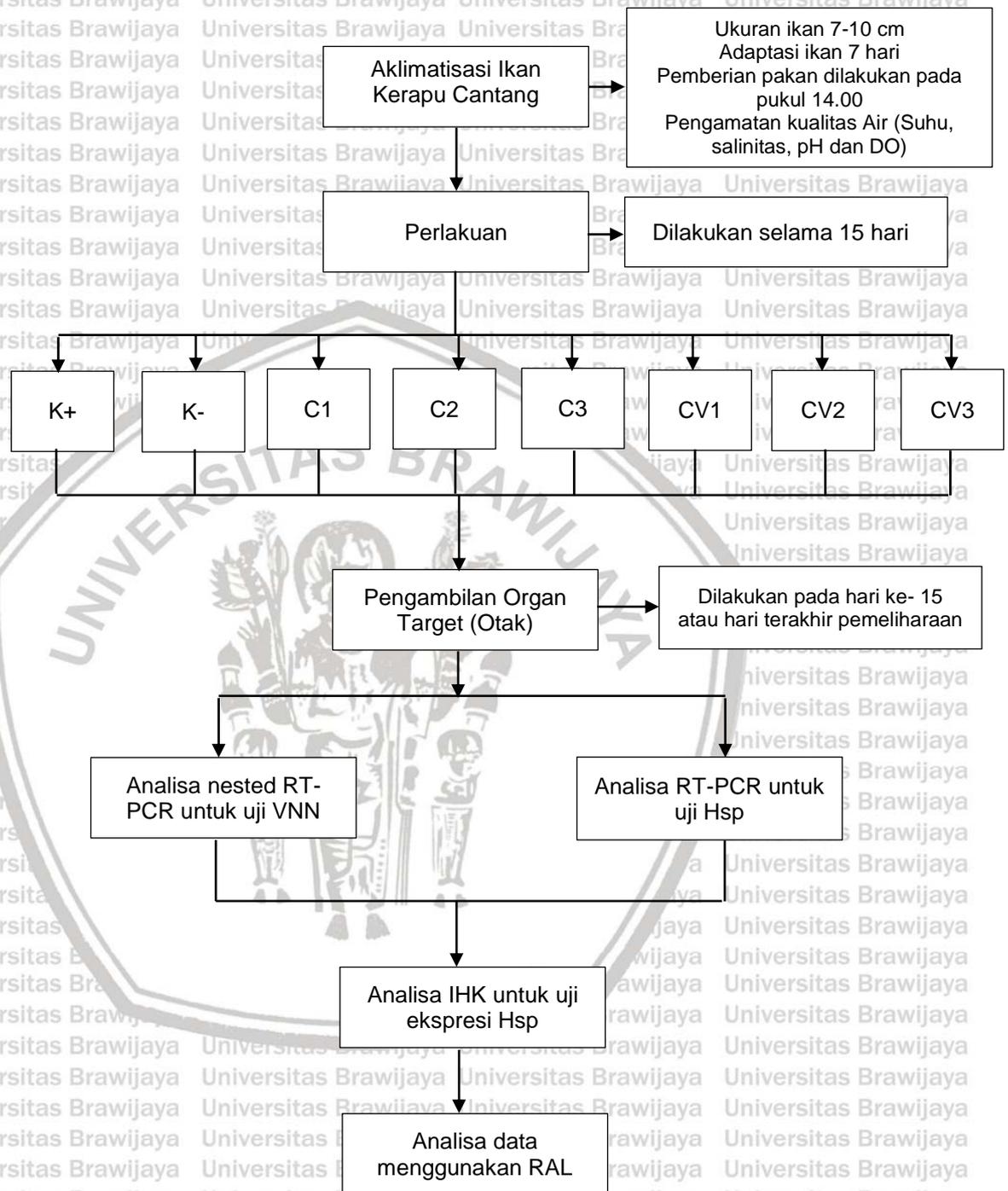
Tahap 1:

- Dilakukan penimbangan bubuk mikroalga *C. vulgaris* sebanyak 100 gram.
- Proses ekstraksi *C. vulgaris* dilakukan dengan cara melakukan maserasi menggunakan pelarut metanol dengan perbandingan 1:3. Sehingga dilakukan pelarutan 100 gram bubuk *C. vulgaris* dengan 300 ml metanol p.a. dilakukan selama 2x24 jam dengan sesekali di *shaker* selama 5 jam per harinya.
- Setelah 2x24 jam maserat dipisahkan dari ampas dengan cara disaring dengan menggunakan kertas saring (Whatman No. 41). Maserat yang dihasilkan kemudian dipekatkan dengan cara menguapkan pelarutnya menggunakan *vaccum rotary evaporator* dengan tekanan rendah pada suhu 40°C kecepatan 110 rpm, dan tekanan 200 mBar sampai tidak ada lagi pelarut yang menetes.
- Hasil ekstraksi lalu diuji fitokimia, UV-Vis dan FTIR
- Output dari tahap ini yaitu mendapatkan kandungan apa saja yang terdapat pada ekstrak kasar *C. vulgaris*.



Gambar 15. Diagram Alir Proses Ekstraksi *C. vulgaris*

Penelitian Tahap 2



Gambar 16. Kerangka Operasional Penelitian Tahap 2

Tahap 2 :

- Proses aklimatisasi ikan kerapu cantang (*Epinephelus* sp). Proses aklimatisasi ini dilakukan selama 7 hari.
- Perlakuan dalam penelitian ini dibagi menjadi 8 yaitu pada perlakuan ikan kontrol positif, ikan kontrol negatif (pemberian VNN), ikan perlakuan ekstrak kasar *C. vulgaris* dengan dosis 17 µg/mL (C1), ikan dengan perlakuan ekstrak kasar *C. vulgaris* dengan dosis 33 µg/mL (C2), ikan dengan perlakuan ekstrak kasar *C. vulgaris* dengan dosis 50 µg/mL (C3), ikan dengan perlakuan ekstrak kasar *C. vulgaris* dengan dosis 17 µg/mL dan penginfeksian VNN (CV1), ikan dengan perlakuan ekstrak kasar *C. vulgaris* dengan dosis 33 µg/mL dan penginfeksian VNN (CV2), serta ikan dengan perlakuan ekstrak kasar *C. vulgaris* dengan dosis 50 µg/mL dan penginfeksian VNN (CV3).
- Setelah pemeliharaan selama 15 hari, pada hari terakhir pemeliharaan dilakukan pengambilan organ target (otak) untuk diuji.
- Pengujian virus VNN dilakukan dengan menggunakan uji RT-PCR sedangkan untuk uji Hsp menggunakan PCR dan untuk mengetahui seberapa besar ekspresi dari Hsp dilakukan uji menggunakan IHK
- Analisa data menggunakan RAL dengan hasil output nilai $P < 0,05$ dianggap signifikan.



Gambar 17. Diagram Alir Proses Aklimatisasi Ikan Kerapu Cantang

3.5 Penelitian Terdahulu

Penelitian serupa yang menggunakan ekstrak mikroalga laut dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Penelitian terdahulu yang menggunakan ekstrak mikroalga laut.

NO	AUTHOR DAN TAHUN	JUDUL	HASIL
1	(Kang, Kim, and Oh 2008)	In vitro Antiviral Activities of Korean Marine Algae Extracts against Fish Pathogenic Infectious Hematopoietic Necrosis Virus and Infectious Pancreatic Necrosis Virus	Pemberian ekstrak mikroalga laut dapat menghambat replikasi pada viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), dan aktivitas antivirus ini bisa disebabkan oleh sulfat polisakarida yang terkandung dalam mikroalga tersebut.
2	(Yanuhar, 2009)	The Influence Of Supply Of Bioactive Extract <i>Nannochloropsis oculata</i> To Dose Of Free Radicals In The Humpback Grouper (<i>Cromileptes altivelis</i>) That Was Infected By <i>Vibrio alginolyticus</i>	Pemberian ekstrak bioaktif <i>N. oculata</i> dapat menangkai radial bebas pada ikan yang diinfeksi bakteri <i>Vibrio alginolyticus</i> . Hal ini dilihat dari hasil uji Malonaldehida (MDA). Hasil uji Malonaldehida (MDA) pada ikan yang diberikan ekstrak <i>N. oculata</i> mengalami penurunan.
3	(Yasuhara-bell et al. 2010)	In vitro evaluation of marine-microorganism extracts for anti-viral activity	Pemberian ekstrak mikroorganisme laut berefek menghambat pada pembentukan virus plak. Pemberian ekstrak mikroorganisme laut juga berpotensi memiliki cara lain penghambatan virus, seperti mempengaruhi replikasi virus setelah sel terinfeksi.
4	(Dahoklory et al. 2014)	The Profile of Gill Protein Expression of Humpback Grouper (<i>Cromileptes altivelis</i>) Injected with Per-Cp of <i>Halimeda Opuntia</i> and Viral Nervous Necrosis.	Berdasarkan data profil protein insang kerapu, injeksi Per-CP dari <i>H.opuntia</i> ke kerapu tikus mampu meningkatkan ekspresi protein dari insang Humpback kerapu di molekul berat dari 56 kDa dan 5 kDa . Dengan menggunakan metode western blot, itu jelas bahwa protein Per-CP dari <i>H.opuntia</i> bertindak sebagai antivirus VNN

		diungkapkan melalui protein 5 kDa dari organ insang.
5	(Yanuhar 2015) Effects of Pigment-Protein Fraction from <i>Nannochloropsis oculata</i> on TNF α and IL-6 which Act as an Anti-Inflammatory Against Viral Nervous Necrosis (VNN) Infection	Fraksi pigmen-protein (FPP) dari mikroalga laut <i>N. oculata</i> mampu bertindak sebagai antigen anti-inflamasi selama infeksi virus RNA pada ikan kerapu.
6	(Yanuhar dan Khumaidi, 2017) The application of pigment-protein fraction from <i>Nannochloropsis oculata</i> on β -actin response of <i>Cromileptes altivelis</i> infected with viral nervous necrosis	Pemberian fragmen pigmen protein <i>N. oculata</i> pada ikan yang terinfeksi VNN dapat meningkatkan ekspresi gen β -actin dengan mengisolasi organ otaknya.

3.6 Kebaruan Penelitian

Penelitian terakhir terkait penggunaan ekstrak kasar mikroalga dilakukan pada tahun 2017 dengan menggunakan jenis mikroalga yang berbeda yaitu menggunakan *Nannochloropsis oculata*. Pada penelitian saya menggunakan jenis bahan alam yang berbeda yaitu *Chlorella vulgaris* dengan proses ekstraksi sehingga uji in-vivo menggunakan ekstrak kasar dari *C. vulgaris*. Perbedaan yang lain juga pada ekspresi gen yang dilihat sebagai objek, pada penelitian sebelumnya melihat gen TNF α , IL-6, dan β -aktin sedangkan pada penelitian yang saya kerjakan adalah melihat ekspresi gen *heat shock protein* sebagai anti-inflamasi.

3.7 Strategi Publikasi

Hasil penelitian mengenai Ekstrak kasar Mikroalga Laut *Chlorella vulgaris* Sebagai Inducer Anti-Inflamasi Cluster *Heat Shock Protein* Pada Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp) yang Terinfeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN) rencananya akan dicoba untuk dipublikasikan di Journal of Fisheries and Marine Research yang terindeks DOAJ dan Google Shcoolar. Publikasi jurnal sebagai

salah satu syarat untuk menyelesaikan studi di program Magister Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang.



4. MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Materi Penelitian

Penelitian ini memanfaatkan ekstrak kasar dari mikroalga laut *C. vulgaris* untuk diujikan pada ikan Kerapu cantang (*Epinephelus* sp) yang diinfeksi Virus *nervous necrosis* (VNN). Pemanfaatan ekstrak kasar dari mikroalga laut *C. vulgaris* pada ikan Kerapu cantang (*Epinephelus* sp) dijadikan sebagai inducer anti-inflamasi dengan meningkatkan ekspresi cluster Hsp.

4.2 Waktu dan Tempat

Penelitian Ini akan dilaksanakan Di Laboratorium Lingkungan Dan Bioteknologi Perairan, Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu kelautan, Universitas Brawijaya Malang pada bulan Maret - Juni 2018.

4.3 Bahan dan Alat

4.4.1 Alat-alat

Untuk menunjang keberhasilan penelitian ini digunakan beberapa alat:

- Alat-alat yang digunakan untuk ekstraksi mikroalga laut *C. vulgaris* yaitu: erlenmeyer bertutup 300 ml, 1000 ml dan 2000 ml, beaker glass 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml dan 1000 ml, erlenmeyer 250 ml, 500 ml dan 1000 ml, timbangan digital, oven, magnetik stirer, botol vial, corong dan *rotary vacuum evaporator*.
- Alat-alat yang digunakan untuk fraksinasi dan identifikasi senyawa mikroalga laut *C. vulgaris* adalah gelas ukur 100 ml, spatula, erlenmeyer (50 ml, 100 ml, 250 ml), dan LC-MS.

- Alat-alat yang digunakan untuk uji In-vivo yaitu : akuarium 30x30x30, aerator, selang aerasi, batu aerasi, setio set, seser, toples plastik dan nampan. Sedangkan peralatan untuk mengamati kualitas air digunakan pH meter, thermometer dan DO meter.
- Alat-alat untuk uji PCR dan IHK meliputi *elecktroforesis system, gel documentation, microsentrifuge tubes, micropippet, microtome, pellet pestle, thermalcycler, vortex*, lemari es, *olimpus digital camera*, refrigerator, SA-HRP dan *wax dispenser*.

4.4.2 Bahan-bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- Ikan kerapu cantang (*Epinephelus* sp)
- Mikroalga laut *C. vulgaris* yang berasal dari Balai Perikanan Budidaya Air Payau Situbondo, Jawa Timur
- Virus VNN berasal dari Balai Karantina Ikan Juanda, Surabaya, Jawa Timur.
- Pelarut metanol
- Kertas label
- Serat fiber, kapas, alumunium foil, kertas saring Whatman No.42, pasir, silika gel 60 GF 254 dan silika gel (SiO₂)-254 (plat KLT).
- Bahan untuk uji PCR meliputi klorofom, isopropanol, alcohol 75%, alcohol 95%, ethanol, xylene, akuadest, formalin, DEPC, agarose, control positif vnn, control negative vnn, *TAE buffer*, set primer (OIE, 2017).
- Bahan untuk analisa Hsp dengan IHK meliputi alkohol, *dionize water*, PBS pH 7,4, H₂O₂ 3%, Antibodi primer anti-mouse HSP 70 dan Hsp 90, antibodi sekumnder antimouse IgG conjugate.

4.4 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental.

Eksperimen merupakan suatu penelitian ilmiah dimana peneliti memanipulasi dan mengontrol satu atau lebih variabel bebas dan melakukan pengamatan terhadap variabel-variabel terikat untuk menemukan variasi yang muncul bersamaan dengan manipulasi terhadap variabel bebas tersebut (Setyanto, 2005). Terdapat dua karakteristik penting dalam metode eksperimen yaitu:

- (1) variabel bebas, dalam hal ini ekstrak kasar *C. vulgaris* dan VNN, yang merupakan variabel yang dapat secara bebas ditentukan oleh peneliti dan dipertanggungjawabkan secara terbuka untuk memberikan dampak terhadap variabel terkait yaitu respon gen Hsp pada ikan.
- (2) observasi atau pengamatan secara langsung akan hasil atau efek yang diinginkan yaitu respon ekspresi gen Hsp pada ikan setelah diberi perlakuan ekstrak kasar *C. vulgaris* dan VNN.

Sumber data yang digunakan dalam penelitian ini mencakup 2 macam data, yaitu data primer dan data sekunder.

A. Data Primer

Data primer merupakan data yang diperoleh peneliti secara langsung (dari tangan pertama) (Sekaran, 2006). Data primer merupakan data yang diperoleh langsung dari sumber data oleh penyelidik untuk tujuan yang khusus. Pencatatan data primer dalam penelitian ini adalah pengumpulan data setiap proses dan kejadian yang dilakukan selama penelitian, seperti ekstrak kasar *C. vulgaris*, pengukuran kualitas air media budidaya, pembedahan sampel ikan baik kontrol maupun yang diberi perlakuan dengan menganalisa ekspresi gen Hsp sebagai penanda respon anti-inflamatori pada organ otak dengan menggunakan metode PCR dan IHK.

B. Data Sekunder

Data sekunder adalah data yang bukan diusahakan sendiri pengumpulannya oleh peneliti atau berasal dari tangan kedua, ketiga dan seterusnya. Misalnya dari Biro statistik, majalah, keterangan-keterangan atau publikasi lainnya (Marzuki, 1983). Pengumpulan data sekunder dapat dibagi menjadi beberapa kategori, antara lain: (1) publikasi lembaga pemerintahan atau non pemerintahan seperti: data sensus, data statistik, survey pekerja, laporan kesehatan, informasi ekonomi, informasi demografi. (2) penelitian terdahulu (3) laporan atau catatan pribadi (4) media massa. Data sekunder dalam penelitian ini didapatkan dari jurnal, internet, serta buku-buku guna menunjang keberhasilan penelitian (Widi, 2010).

4.5 Prosedur Penelitian

4.6.1 Ekstraksi *Chlorella vulgaris*

Maserasi merupakan metode yang dipakai untuk melakukan ekstraksi *C. vulgaris*. Maserasi merupakan metode yang paling umum dan sederhana, yakni merendam bahan dengan pelarut pada suhu ruang (Senja *et al.*, 2014). Pada proses ekstraksi ini hal pertama yang dilakukan adalah menimbang bubuk *C. vulgaris* sebanyak 300 gr. Pemilihan penggunaan bahan dasar berupa bubuk dalam proses ini karena derajat kehalusan dari bahan dasar mempengaruhi hasil dari proses ekstraksi. Derajat kehalusan dari bahan dasar penting untuk mengupayakan agar penarikan dapat berlangsung secara maksimal, kehalusan menyangkut luas permukaan yang akan berkontak dengan pelarut dalam proses ekstraksi (Sapri *et al.*, 2014). Perbandingan bubuk *C. vulgaris* dengan pelarut metanol p.a yaitu 1:3. Sebanyak 100 gr *C. vulgaris* bubuk direndam dengan 900 ml metanol p.a dan didiamkan selama 2x24 jam sambil sesekali dilakukan pengadukan atau dengan bantuan *shaker*. Setelah 2x24 jam maserat dipisahkan dari ampas dengan cara disaring dengan menggunakan kertas saring (Whatman

No. 41). Maserat yang dihasilkan kemudian dipekatkan dengan cara menguapkan pelarutnya menggunakan *vaccum rotary evaporator* dengan tekanan rendah pada suhu 40°C kecepatan 110 rpm, dan tekanan 200 mBar sampai tidak ada lagi pelarut yang menetes (Sani *et al.*, 2014). Selanjutnya setelah didapatkan ekstrak yang diperoleh ditimbang beratnya untuk mengetahui rendemen ekstrak tersebut.

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kasar yang diperoleh}}{\text{Berat sampel yang digunakan}} \times 100 \%$$

4.6.2 Skrining Fitokimia

Pengujian fitokimia bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya kandungan metabolit sekunder yang ada pada *C. vulgaris* seperti alkaloid, saponin, tanin, steroid, triterpenoid (Fithriani *et al.*, 2015). Adapun langkah kerjanya adalah sebagai berikut (Setyowati *et al.*, 2014) :

a. Flavonoid

Skrining flavonoid dilakukan dengan melarutkan ekstrak pekat *C. vulgaris* dalam metanol panas dan ditambahkan dengan 0,1 gram serbuk Mg dan 5 tetes HCl pekat. Jika terbentuknya warna jingga maka ekstrak positif flavonoid.

b. Saponin

Skrining saponin, dilakukan dengan cara melarutkan ekstrak *C. vulgaris* dalam 10 mL air panas, kemudian kuat-kuat selama 10 detik. Adanya pembentukan buih secara stabil menegaskan bahwa ekstrak positif adanya saponin.

c. Tannin

Skrining tannin dilakukan dengan melarutkan ekstrak pekat *C. vulgaris* dalam 10 mL akuades lalu disaring dan filtrat ditambahkan dengan 3 tetes FeCl₃ 1%. Jika terbentuknya warna hijau-kehitaman menegaskan ekstrak positif mengandung adanya tannin.

d. Alkaloid

Untuk identifikasi senyawa alkaloid digunakan dengan menggunakan metode Mayer, Wagner dan Dragendorff, 0,5 gram ekstrak ditambahkan 1 mL HCl 2M dan 9mL akuades lalu dipanaskan selama 2 menit. Selanjutnya didinginkan dan disaring. Filtrat dibagi menjadi 3 bagian yang masing-masing ditambahkan dengan pereaksi Mayer, Wagner dan Degendorff. Jika terdapat endapan coklat atau merah (Wagner), warna endapan putih (Mayer) atau terbentuk warna jingga (Dragendorff) maka ekstrak tersebut positif mengandung alkaloid.

e. Triterpenoid

Terakhir, untuk skrining triterpenoid langkah yang dilakukan yaitu melarutkan ekstrak pekat *C. vulgaris* dalam 0,5 mL kloroform, lalu ditambahkan 0,5 mL anhidrida asetat dan meneteskan campuran dengan 2 mL H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung. Pembentukan lapisan coklat kemerahan di persimpangan dua solusi menegaskan adanya senyawa triterpenoid.

4.6.3 Analisis Spektroskopi UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis merupakan teknik analisis spektroskopik yang menggunakan sumber REM (Raadiasi Elektromagnetik) ultraviolet dekat (190-380 nm) dan sinar tampak (380-780 nm) dengan memakai instrumen spektrofotometer.

Berikut merupakan prosedur analisis spektroskopi UV-Vis (Mukti, 2012) :

1. Pembuatan Larutan Uji

- Pembuat konsentrasi larutan ekstrak kasar *C. vulgaris* dengan mencampurkan 1 gram ekstrak kasar *C. vulgaris* dengan larutan aquades.

2. Pembuatan Kurva Baku

- Mengatur spektro pada mode quantity dan tetapkan panjang gelombang sesuai hasil sebelumnya.

- Melakukan pengukuran serapan (absorbansi) untuk masing-masing larutan baku, serta mencatat setiap harga serapan untuk tiap larutan.
- Membuat kurva standar antar konsentrasi (M) vs absorbansi (A), menentukan persamaan garis dengan metode regresi linier.

3. Menetapkan Kadar Sampel

- Memasukkan larutan yang berupa larutan ekstrak *C. vulgaris* ke dalam kuvet.
- Mengukur serapan pada panjang gelombang maksimal, kisaran absorban yang terbaca pada spektrofotometer hendaklah antara 0.2 - 0.8 atau 15% sampai 70% jika dibaca sebagai transmitans. Bila hasil di luar rentang tersebut, lakukan pengenceran (bila terlalu besar harga serapan) atau pekatkan sampel (bila harga serapan terlalu kecil). Mencatat hasil yang diperoleh.
- Menghitung kadar sampel dengan memasukkan harga serapan pada persamaan garis kurva standar baku

4.6.4 Analisis FT-IR (*Fourier Transform Infra Red*)

FT-IR merupakan salah satu instrumen yang menggunakan prinsip spektroskopi. Spektroskopi adalah spektroskopi inframerah yang dilengkapi dengan transformasi fourier untuk deteksi dan analisis hasil spektrumnya.

Prosedur analisis menggunakan FT-IR seperti dilakukan dengan cara mengambil sejumlah ekstrak yang telah dikeringkan kemudian dicampurkan secara seragam dengan KBr membentuk pelet. Spektrum FTIR dibuat menggunakan spektrofotometer FTIR Tensor 37 (Bruker Optik GmbH, Karlsruhe, Jerman) dengan detektor DTGS (deuterated triglycine sulphate) di daerah inframerah tengah (4000 – 400 cm^{-1}) pada resolusi 4 cm^{-1} dengan jumlah payar 32 yang dioperasikan dengan peranti lunak OPUS versi 4.2 (Bruker Optik GmbH,

Karlsruhe, Jerman). Spektrum FTIR dalam format OPUS disimpan dalam format Data Point Table (DPT) (Purwakusumah *et al.*, 2014).

4.6.5 Aklimatisasi Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp)

Penelitian ini menggunakan 60 ekor Kerapu cantang (*Epinephelus* sp) dengan ukuran 7 -10 cm yang diperoleh dari salah satu hatchery di Kabupaten Situbondo. Dipilih ikan dengan ukuran 7 -10 cm karena pada pada fase tersebut sistem imun ikan telah terbentuk namun belum bekerja dengan maksimal sehingga masih rentan terhadap infeksi patogen. Pengujian dilakukan di Laboratorium Ilmu-ilmu Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

Sebelum diberi perlakuan, ikan diaklimatisasi untuk mencegah terjadinya stress dan agar ikan dapat beradaptasi dengan lingkungan yang baru. Proses aklimatisasi ini dilakukan selama 7 hari.

Aklimatisasi dilakukan dengan cara memasukkan kantong plastik berisi ikan kedalam calon media pemeliharaan. Kantong dibiarkan mengapung selama 10-15 menit, setelah itu ikatannya dibuka dan ikan dibiarkan keluar dari plastik dengan cara menenggelamkan setengah mulut plastik sehingga ikan keluar dengan sendirinya.

Pemberian pakan dilakukan setelah ikan terlihat sehat dan agresif. Pakan yang digunakan adalah ikan kembung segar yang dicacah kecil-kecil seukuran bukaan mulut ikan. Pemberian pakan dilakukan sekali dalam sehari yaitu pada pukul 14.00 WIB. Pemberian pakan dilakukan secara *adlibitum* yaitu memberikan pakan ke dalam perairan sedikit demi sedikit hingga ikan kenyang. Pemberian pakan ini bertujuan untuk menghindari penumpukan sisa pakan didasar perairan.

Hal ini bertujuan untuk menjaga kualitas air yang nantinya akan berpengaruh terhadap media pertumbuhan ikan.

Sebelum pemberian pakan, dilakukan pengukuran kualitas air seperti pH, suhu, salinitas dan DO untuk memastikan kondisi media penelitian dalam kondisi normal atau optimal. Pengukuran suhu pada perairan dengan menggunakan termometer dan untuk salinitas menggunakan refraktometer atago. Nilai DO perairan diperoleh dengan mengukur menggunakan DO meter dan nilai pH diperoleh dengan menggunakan pH meter.

A. Suhu

Alat yang digunakan dalam pengukuran suhu air adalah termometer standar.

Langkah dalam pengukuran suhu adalah (Rahayu, 2009):

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

B. Salinitas

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

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

C. Derajat Keasaman (pH)

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan alat pH meter, adapun cara pengukuran pH adalah (Hartanti, 2008):

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

D. *Disolved Oxygen* (DO) / Oksigen Terlarut

Pengukuran DO menggunakan DO meter. Prinsip kerjanya adalah (Salmin, 2005):

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

4.6.6 Uji *in-vivo* Ekstrak Kasar *C. vulgaris* pada Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp)

Pengujian dilakukan dengan metode oral (Sonde) dengan bantuan selang *feeding tube* yang dilakukan selama 3 kali yaitu pada hari ke-0, ke-5, dan ke-10.

Pemberian dosis perlakuan mengacu pada Yanuhar (2015), yaitu dengan pemberian 33 µg/mL (hasil uji klinis). Pada penelitian yang akan dilakukan menggunakan dosis yang berbeda, yakni dengan pemberian dosis 17 µg/mL, 33

µg/mL, dan 50 µg/mL. Ikan yang sudah dipelihara dan diberi perlakuan, dibedah untuk dianalisa organnya, yaitu organ otak ikan Kerapu cantang (*Epinephelus sp.*).

Analisa organ menggunakan metode RT-PCR.

4.6.7 Uji Tantang *in-vivo* VNN pada Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus sp.*)

Uji tantang dengan VNN dilakukan dilakukan pada hari ke-5 dan ke-10.

Pemberian VNN pada penelitian ini dengan cara memotong kecil-kecil daging ikan yang telah positif terinfeksi VNN sebanyak 5 gram per ekor ikan lalu diberikan secara oral. Kemudian dilakukan pengamatan, pengamatan ini bertujuan untuk melihat perubahan tingkah laku ikan dari normal sampai abnormal atau gejala spesifik seperti berenang yang tidak beraturan.

4.6.8 Deteksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN)

- Ekstraksi RNA (VNN)

Pada penelitian ini ekstraksi RNA digunakan untuk mendapatkan virus RNA *viral nervous necrosis* pada organ target ikan kerapu cantang. Organ target distribusi VNN pada benih ikan kerapu cantang yaitu organ otak. Tahapan berdasarkan (SNI 7546.1 : 2015) yaitu sebagai berikut :

- Mengisolasi organ target sebanyak 20-50 mg ke dalam mikrotube 1,5 ml.
- Menambahkan 500 µl larutan kit RNA *extraction solution* (TRIzol®) ke dalam mikrotube, kemudian menggerus dengan pastel penggerus sampai halus, selanjutnya di diamkan pada suhu 25-30 °C selama 5 menit.
- Menambahkan 100 µl kloroform dan vortex 15 detik kemudian menginkubasi pada suhu ruang 2-3 menit
- Mensentrifugasi pada kecepatan 12000 x g (12000 rpm r = 6 cm) selama 15 menit pada 4 °C

- Memindahkan 200 µl supernatan ke dalam mikrotube baru dan tambahkan 200 µl isopropanol, selanjutnya vortex selama 15 detik.

- Mensentrifugasi pada kecepatan 12000 x g selama 10 menit pada 4 °C.

- Kemudian supernatan dibuang, dan mencuci pelet dengan 500 µL alkohol 75 %, mensentrifugasi selama 5 menit pada 4 °C dengan kecepatan 7500 x g, lalu membuang supernatant dan mengeringkan pelet RNA selama 5-10 menit.

- Melarutkan pelet RNA di dalam 200 µl *nuclease free water* (DEPC ddH₂O).

- Apabila larutan RNA segera digunakan maka disimpan pada *deep freezer* suhu -20 °C, apabila digunakan dalam jangka waktu yang lama, maka disimpan pada suhu -80 °C.

• Amplifikasi

Pada penelitian ini untuk mendeteksi virus VNN menggunakan nested RT-PCR, adapun tahapannya yaitu :

- Setelah ekstraksi RNA, selanjutnya proses amplifikasi dengan urutan proses *nested* RT- PCR menggunakan Go Taq® Green Master Mix (promega) dengan primer yaitu :

VNN adalah 2 set primer spesifik (Thiery *et al.*, 1999) yaitu :

F2 : 5'-CGTGTCAGTCATGTGTCGCT-3'

R3 : 5'-CGAGTCAACACGGGTGAAGA-3'

NF2 : 5'-GTTCCCTGTACAACGATTCC-3'

NR3 : 5'-GGATTTGACGGGGCTGCTA-3'

Pasangan primer spesifik VNN antara F2 dan R3 serta NF2 dan NR3 terdeteksi pada 294 bp.

- Menyiapkan kontrol positif VNN dari contoh dan kontrol negatif atau *non template control*;

Menyiapkan bahan untuk pendukung RT-PCR yaitu sebagai berikut (Tabel 2).

Tabel 2. Susunan Bahan Amplifikasi

No	Reagen RT - PCR	Volume (µl)	Konsentrasi Akhir
1	Nuclease free water	14,725	-
2	5x PCR Buffer	5,00	1 x
3	MgCl ₂ 25 mM	1,50	1,5 mM
4	dNTP <i>mix</i> (10 mM)	0,50	200 µM
5	Primer F2 (10 µM)	0,50	0,2 µM
6	Primer R3 (10 µM)	0,50	0,2 µM
7	DNA Taq Polymerase 5 U/µl	0,125	0,625 U
8	RNase inhibitor (40 U/µl)	0,05	2 U
9	AMV Reverse transcriptase (10 U/µl)	0,10	1 U
10	RNA Template	2,00	0,4 ng - 4 ng
	Total	25	

- Menyebarkan bahan pada masing-masing mikrotube 0,2 ml dengan volume 23µl.
- Menambahkan *template* atau contoh uji RNA, termasuk kontrol positif dan kontrol negatif (ddH₂O), pada masing-masing tabung mikro sebanyak 2µl.
- Menghomogenkan dan memasukkan tabung mikro kedalam mesin PCR (*thermocycler*).
- Mengoperasionalkan amplifikasi (Tabel 3).

Tabel 3. Kondisi Amplifikasi nested RT-PCR

No	Reaksi	Suhu (°C)	Waktu	Jumlah Siklus
1.	Inkubasi	45	30	1
2.	Inaktivasi <i>Reverse-transcriptase</i>	94	2	1
3.	Denaturasi	94	30	40
4.	<i>Annealing</i>	60	30	
5.	<i>Extention</i>	72	45	
6.	<i>Final extention</i>	72	10	1

4.6.9 Deteksi *Heat Shock protein* (Hsp)

Deteksi untuk ekspresi *heat shock protein* dalam penelitian ini menggunakan RT-PCR. Prosedur RT-PCR seperti dibawah ini :

- **Ekstraksi (Hsp)**

Pada penelitian ini ekstraksi dilakukan dengan cara mengisolasi organ target ikan kerapu cantang. Organ target untuk deteksi Hsp pada ikan kerapu cantang yaitu organ otak. Tahapan berdasarkan (SNI 7546.1 : 2015) yaitu sebagai berikut:

- Mengisolasi organ target sebanyak 20-50 mg ke dalam mikrotube 1,5 ml.
- Menambahkan 500 μ l larutan kit *RNA extraction solution* (TRIzol®) ke dalam mikrotube, kemudian menggerus dengan pastel penggerus sampai halus, selanjutnya di diamkan pada suhu 25-30 °C selama 5 menit.
- Menambahkan 100 μ l kloroform dan vortex 15 detik kemudian menginkubasi pada suhu ruang 2-3 menit
- Mensentrifugasi pada kecepatan 12000 x g (12000 rpm r = 6 cm) selama 15 menit pada 4 °C
- Memindahkan 200 μ l supernatan ke dalam mikrotube baru dan tambahkan 200 μ l isopropanol, selanjutnya vortex selama 15 detik.
- Mensentrifugasi pada kecepatan 12000 x g selama 10 menit pada 4 °C.
- Kemudian supernatan dibuang, dan mencuci pelet dengan 500 μ L alkohol 75 %, mensentrifugasi selama 5 menit pada 4 °C dengan kecepatan 7500 x g, lalu membuang supernatant dan mengeringkan pellet RNA selama 5-10 menit.
- Melarutkan pellet RNA di dalam 200 μ l *nuclease free water* (DEPC ddH₂O).
- Apabila larutan RNA segera digunakan maka disimpan pada *deep freezer* suhu -20 °C, apabila digunakan dalam jangka waktu yang lama, maka disimpan pada suhu -80 °C.

• **Amplifikasi**

Pada penelitian ini untuk mendeteksi ekspresi Hsp menggunakan

RT-PCR adapun tahapannya yaitu :

- Setelah ekstraksi RNA, selanjutnya proses amplifikasi dengan urutan proses *reverse-transcriptase* PCR dilakukan menggunakan Access Quick-AMV® RT PCR (promega) dengan primer yang sama yaitu :

Tabel 4. Susunan Primer Penentuan HSP

Gene	Primer Sequences	PCR product
HSP 70	F : 5'-ATCCTGACCATTGAAGACGG-3' R : 5'-TGTTCA GTTCTCTGCCGTTG-3'	562 bp

- Menyiapkan kontrol positif Hsp dari contoh dan kontrol negatif atau *non template control*;
- Menyiapkan bahan untuk pendukung RT-PCR yaitu sebagai berikut (Tabel 5).

Tabel 5. Susunan Bahan Amplifikasi nested RT-PCR HSP

No	Reagen RT - PCR	Volume (µl)	Konsentrasi Akhir
1	Nuclease free water	14,725	-
2	5x PCR Buffer	5,00	1 x
3	MgCl ₂ 25 mM	1,50	1,5 mM
4	dNTP mix (10 mM)	0,50	200 µM
5	Primer F2 (10 µM)	0,50	0,2 µM
6	Primer R3 10 µM)	0,50	0,2 µM
7	DNA Taq Polymerase 5 U/µl	0,125	0,625 U
8	RNase inhibitor (40 U/µl)	0,05	2 U
9	AMV Reverse transcriptase (10 U/µl)	0,10	1 U
10	RNA Template	2,00	0,4 ng - 4 ng
	Total	25	

- Menyebar bahan pada masing-masing mikrotube 0,2 ml dengan volume 23µl.

- Menambahkan *template* atau contoh uji RNA, termasuk kontrol positif dan

kontrol negatif (ddH₂O), pada masing-masing tabung mikro sebanyak 2 μ l.

- Menghomogenkan dan memasukkan tabung mikro kedalam mesin PCR (*thermalcycler*).

- Mengoperasikan amplifikasi (Tabel 6).

Tabel 6. Kondisi Amplifikasi nested RT-PCR HSP

No	Reaksi	Suhu ($^{\circ}$ C)	Waktu	Jumlah Siklus
1.	Inkubasi	45	30	1
2.	Inaktivasi <i>Reverse-transcriptase</i>	94	2	1
3.	Denaturasi	94	30	
4.	<i>Annealing</i>	60	30	40
5.	<i>Extention</i>	72	45	
6.	<i>Final extention</i>	72	10	1

4.6.10 IHK

Prosedur IHK mengacu pada Nambiar *et al.*, 2016 sebagai berikut :

- Melakukan preparasi jaringan organ yang dipapar imunogenik
- Melakukan deparafinasi preparat dengan xilol 20 μ m selama \pm 5 menit
- Melakukan dehidrasi dengan alkohol absolut sebanyak 2 kali ulangan pada konsentrasi 90%, 80% dan 70% masing-masing selama 5 menit
- Membilas preparasi dengan dionize water 20 μ m sebanyak 3 kali ulangan, masing-masing 5 menit
- Menyimpan preparasi dalam refrigerator (overnight)
- Membilas preparat dengan PBS pH 7,4 20 μ m sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit
- Menginkubasi preparat dengan H₂O₂ 3% selama 10 menit
- Blocking unspesifik protein dan inkubasi dalam 5% PBS dengan 1-2% BSA
- Menyiapkan antibodi primer yang dilarutkan dalam larutan blotto dengan perbandingan 1:1000

- Mencuci dengan antibodi primer (mouse monoclonal HSP 70 atau Hsp 90 antibodi) (1:1000) overnight 4°C
- Menetesi preparat dengan antibodi primer dan diinkubasi overnight 4°C
- Preparat kemudian dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit
- Keringkan kembali sisa-sisa PBS yang masih menempel dan siapkan antibodi sekunder yang dilarutkan dalam larutan blotto dengan perbandingan 1:200
- Preparat kemudian ditetesi dengan larutan antibodi sekunder anti mouse conjugate pajotin dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang
- Preparat kembali dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit
- Keringkan kembali sisa-sisa PBS yang masih menempel
- Menginkubasi dalam SA-HRP dengan perbandingan 1:500 selama 40 menit
- Preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit
- Menggunakan kromagen DAB selama 20 menit
- Preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit
- Memberikan counterstain dengan majer *hemotoxilen* selama 10 menit
- Membilas preparat dengan DH₂O sebanyak 3 kali ulangan masing-masing selama 5 menit
- Mengeringkan preparat dengan cara diangin-anginkan
- Mengamati preparat hasil pewarnaan IHC dibawah mikroskop okuler dengan perbesaran 40x
- Mengambil gambar hasil IHC dengan menggunakan *olympus digital camera*
- Hasil gambar lalu di uji menggunakan software *ImunoRatio* untuk mendapatkan persentase nilai DAB.

4.6.11 Analisa Data

Analisa data pada penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) faktorial dengan 8 perlakuan dan 3 kali pengulangan. Langkah awal adalah menghitung prosentase DAB ekspresi Hsp pada setiap perlakuan. Selanjutnya data dianalisa dengan menggunakan cara statistik yaitu analisa keragaman (ANOVA), dengan tujuan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan pemberian perlakuan. Apabila dari analisa keragaman (sidik ragam) diketahui bahwa perlakuan menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata atau sangat berbeda nyata, maka untuk membandingkan nilai dilanjutkan dengan uji *Homogeneous subsets* untuk mengetahui perlakuan yang mana yang tidak seginifian. Analisa data dilakuakn dengan menggunakan SPSS.

Tabel analisa sidik ragam disajikan pada tabel sebagai berikut :

Tabel 7. Analisa sidik ragam

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3		
Perlakuan C1	(C1)1	(C1)2	(C1)3	TC1	TC1/3
Perlakuan C2	(C2)1	(C2)2	(C1)3	TC2	TC2/3
Perlakuan C3	(C3)1	(C3)2	(C1)3	TC3	TC3/3
Perlakuan CV1	(CV1)1	(CV1)2	(CV1)3	TCV1	TCV1/3
Perlakuan CV2	(CV2)1	(CV2)2	(CV2)3	TCV2	TCV2/3
Perlakuan CV3	(CV3)1	(CV3)2	(CV3)3	TCV3	TCV3/3
Kontrol Positif	(K+)1	(K+)2	(K+)3	TK+	TK+/3
Kontrol Negarif	(K-)1	(K-)2	(K-)3	TK-	TK-/3
Total				T	

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

K+, K-, C1, C2, C3, CV1, CV2,dan CV3 adalah perlakuan (t)

K+ : kontrol positif

K- : kontrol negatif

C1 : perlakuan ekstrak dosis 17 µg/mL

C2 : perlakuan ekstrak dosis 33 µg/mL

C3 : perlakuan ekstrak dosis 50 µg/mL

CV1 : perlakuan ekstrak dosis 17 µg/mL +VNN

CV2 : perlakuan ekstrak dosis 33 µg/mL +VNN

CV3 : perlakuan ekstrak dosis 50 µg/mL +VNN

4.6 Matriks Variabel Penelitian

Berikut rencana penelitian dilihat dari berbagai data yang akan diperoleh, dan diolah berdasarkan metode yang akan digunakan :

Tabel 8. Matriks Variabel Penelitian

No.	Tujuan Penelitian	Variabel (Parameter Uji)	Metode	Keterangan	Satuan
1.	Analisa kandungan bioaktif dalam ekstrak kasar mikroalga laut <i>C. vulgaris</i> .	- Residu - Filtrat	- Maserasi - Uji Fitokimia - Uji UV-Vis - Uji LC-MS	Untuk mengetahui hasil kandungan biokagtif yang sama	- Residu (gr) - Filtrat (ml)
2.	Mengetahui dan menganalisis manfaat ekstrak kasar <i>C. vulgaris</i> terhadap ekspresi dari Hsp sebagai inducer anti-inflamasi akibat infeksi VNN pada ikan kerapu cantang.	- VNN - Hsp	-Uji Nasted RT-PCR -Uji IHK	- Diagnosa laboratorium ikan positif (+) VNN - Pengamatan gejala klinis ikan kerapu cantang pada media pemeliharaan - Diagnosa laboratorium pada organ target untuk melihat ekspresi Hsp menggubakan uji IHK	- Nasted RT-PCR (bp) - IHK (%)

5. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Biologi Hewan Uji Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp)

Hewan uji dalam penelitian ini menggunakan ikan kerapu cantang (*Epinephelus* sp). Ikan kerapu cantang merupakan hasil persilangan antara ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dengan ikan kerapu kertang (*Epinephelus lanceolatus*) (Ismi *et al.*, 2014). Ikan kerapu yang digunakan dalam penelitian ini berukuran 7 cm-11 cm dengan berat rata-rata mencapai 162 gram.

Ikan kerapu cantang ini didapatkan dari salah satu *hatchery* di Kabupaten Situbondo. Gambar hewan uji ikan kerapu cantang pada penelitian ini dapat dilihat ada gambar 18 dibawah ini.

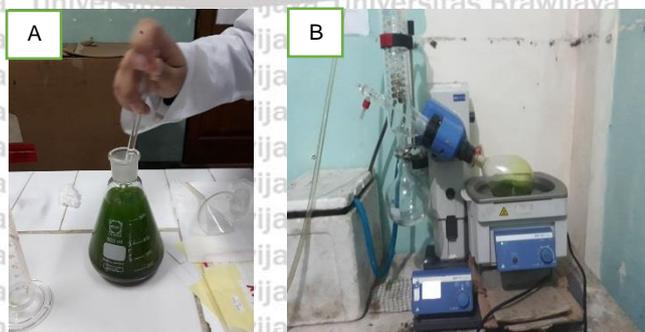


Gambar 18. Hewan uji penelitian, ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp)
(Sumber: Dokumentasi pribadi, 2018)

Dilihat dari segi morfologi, ikan ikerapu cantang ini memiliki bentuk dan ciri-ciri yang dimiliki oleh kedua induknya yaitu kombinasi dari ikan kerapu macan dan ikan kerapu kertang. Ikan kerapu cantang memiliki bentuk tubuh yang compres sedikit bulat dengan ukuran kepala hampir sama dengan ukuran badannya (gambar 18). Memiliki warna tubuh yang gelap yaitu abu-abu kehitaman dan memiliki bintik hitam hampir diseluruh tubuhnya termasuk di bagian kepala. Bentuk ekor dari ikan kerapu cantang ini adalah rounded dan memiliki gigi yang runcing (canine) karena ikan kerapu cantang ini merupakan jenis ikan karnivora.

5.2 Hasil Ekstraksi *Chlorella vulgaris*

Proses ekstraksi mikroalga laut *C. vulgaris* dimulai dengan proses penimbangan bubuk *C. vulgaris* sebanyak 300 gram. Selanjutnya bubuk *C. vulgaris* dimasukkan kedalam tabung erlenmeyer dan ditambahkan pelarut metanol p.a sebanyak 900 ml lalu diaduk dengan menggunakan spatula hingga tercampur rata. Setelah itu dilakukan homogenasi dengan bantuan *shaker* selama 4 jam. Hal ini dilakukan dengan tujuan agar semua bubuk *C. vulgaris* dapat terlarut dalam pelarut metanol. Setelah 4 jam larutan *C. vulgaris* tadi didiamkan selama 2x24 jam. Setelah 2x24 jam maserat dipisahkan dari ampas dengan cara disaring dengan menggunakan kertas saring (Whatman No. 41) hingga tidak ada lagi maserat yang menetes. Tahap selanjutnya yaitu maserat yang dihasilkan kemudian dipekatkan dengan cara menguapkan pelarutnya menggunakan *vaccum rotary evaporator* dengan tekanan rendah pada suhu 40°C kecepatan 110 rpm, dan tekanan 200 mBar sampai tidak ada lagi pelarut yang menetes. Hasil dari proses ekstraksi *C. vulgaris* dengan proses maserasi ini yaitu berupa pasta seberat 29 gram. Untuk analisa persentase rendemen ekstrak dapat dihitung berdasarkan perbandingan berat akhir (berat ekstrak yang dihasilkan) dengan berat awal (berat biomassa sel yang digunakan) dikalikan 100% (Sani *et al.*, 2014). Hasil rendemen ekstrak mikroalga *C. vulgaris* menggunakan pelarut metanol p.a sebesar 9,6%. Gambar proses ekstraksi dapat dilihat pada gambar 19 dibawah ini.



Gambar 19. (A) Proses Maserasi dan (B) Proses Evaporasi
(Sumber: Dokumentasi pribadi, 2018)

5.3 Hasil Analisis Skrining Fitokimia

Pada penelitian ini dilakukan identifikasi terhadap senyawa fitokimia yang diperkirakan terdapat pada ekstrak mikroalga *C. vulgaris*. Senyawa fitokimia tersebut adalah senyawa golongan flavonoid, saponin, tanin, alkaloid dan terpenoid. Hasil identifikasi pada ekstrak mikroalga *C. vulgaris* sebagaimana pada

Tabel 9.

Tabel 9. Hasil Uji Fitokimia ekstrak kasar *C. vulgaris*

Uji Fitokimia	Pereaksi	Hasil	Kesimpulan
Flavonoid	HCL Pekat + Mg	Tidak berwarna endapan	- (Negatif)
Alkaloid	Bouchardat	berwarna cokelat endapan	+ (Positif)
Terpenoid	Bouchardat	berwarna jingga kecoklatan	+ (Positif)
Tanin	FeCl ₃ 1%	cokelat kehitaman	+ (Positif)
Saponin	Air + HCL Pekat	Tidak adanya busa permanen	- (Negatif)

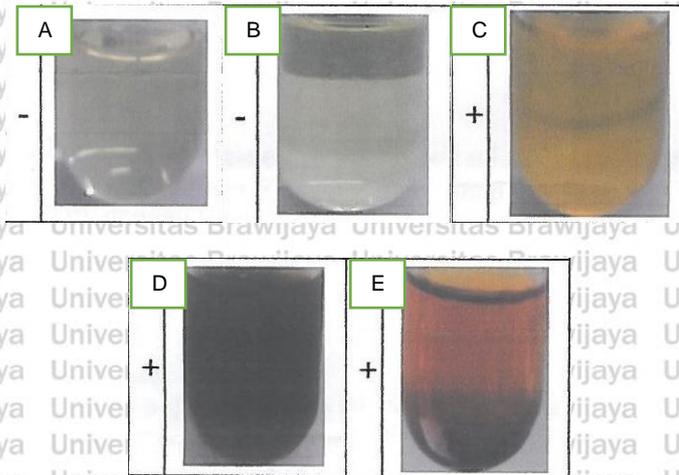
Pada pengujian senyawa fitokimia, hasil pembacaan noda warna tampak pada silika gel. Hasil senyawa yang positif terkandung pada ekstrak *C. vulgaris* hanya ada 3 dari 5 senyawa yang diujikan yaitu alkaloid, terpenoid dan tanin.

Senyawa yang negatif terdandung dalam ekstrak *C. vulgaris* ini adalah golongan senyawa flavonoid dan saponin. Hal ini berbeda dengan penelitian lain yang menyatakan pada hasil uji fitokimia ekstrak *C. vulgaris* mengandung senyawa golongan flavonoid dan saponin (Fithriani *et al.*, 2015). Perbedaan kandungan dalam spesies yang sama dapat saja terjadi. Kandungan senyawa fitokimia dipengaruhi berbagai faktor yaitu spesies, varietas, kondisi pertumbuhan, variasi musim, metode pengolahan dan penyimpanan (Pyo *et al.*, 2014).

Pada uji senyawa alkaloid tampak perubahan adanya endapan berwarna coklat yang menandakan uji positif pada golongan alkaloid. Alkaloid merupakan salah satu metabolisme sekunder yang terdapat pada tumbuhan. Alkaloid mempunyai efek dalam bidang kesehatan berupa pemicu sistem saraf, menaikkan tekanan darah, mengurangi rasa sakit, antimikroba, obat penenang, obat penyakit jantung dan lain-lain lain (Aksara *et al.*, 2013).

Pada uji senyawa terpenoid dalam penelitian ini, didapatkan hasil yang ditandai dengan adanya endapan berwarna jingga kecoklatan yang menandakan uji positif golongan terpenoid. Senyawa terpenoid ini berbentuk siklik atau asiklik dan sering memiliki gugus alkohol, aldehida, atau asam karboksilat. Tumbuhan yang mengandung senyawa terpenoid terdapat nilai ekologi karena senyawa ini bekerja sebagai anti fungus, insektisida, anti pemangsa, anti bakteri dan anti virus (Widiyati, 2006).

Begitu pula pada uji kandungan tanin pada penelitian ini, menunjukkan terdapat perubahan warna coklat kehitaman yang menandakan uji positif pada golongan tanin. Tanin merupakan suatu senyawa polifenol yang memiliki berat molekul besar yang terdiri dari gugus hidroksi dan karboksil (Sari *et al.*, 2015). Tanin mempunyai daya antibakteri di antaranya melalui reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim, dan destruksi atau inaktivasi fungsi materi genetik (Martono dan Setiono, 2014). Tanin juga memiliki peranan biologis yang kompleks mulai dari pengendap protein hingga pengkhelat logam. Tanin juga dapat berfungsi sebagai antioksidan biologis (Malangngi *et al.*, 2012).



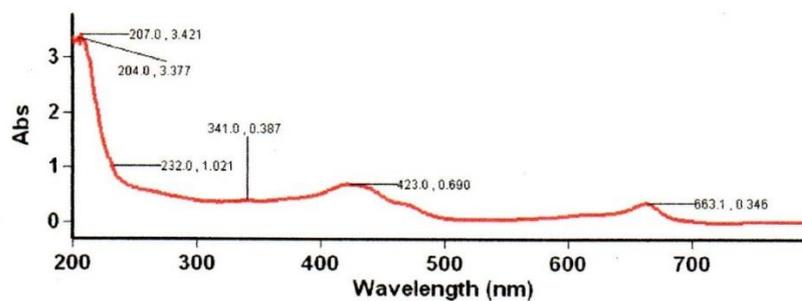
Gambar 20. (A) Uji Senyawa Flavonoid Negatif (-), (B) Uji Senyawa Saponin Negatif (-), (C) Uji Senyawa Tanin Positif (+), (D) Uji Senyawa Terpenoid Positif (+), (E) Uji Senyawa Alkaloid Positif (+)

5.4 Hasil Analisis Spektroskopi Uv-Vis

Hasil analisa spektroskopi UV-Vis ekstrak *C. vulgaris* menggunakan pelarut metanol p.a dengan rentang panjang gelombang 200-700 nm (Gambar 20).

Berdasarkan hasil pengukuran didapatkan beberapa puncak panjang gelombang maksimum. Pada hasil uji Uv-Vis ekstrak *C. vulgaris* menunjukkan panjang gelombang maksimum terdapat pada 207.0 nm dengan absorbansi maksimum

3.421. Hasil analisis spektroskopi UV-Vis dapat dilihat pada gambar 21 dibawah ini.



Gambar 21. Hasil Analisa Spektroskopi UV-Vis Ekstrak *C. vulgaris*

Pada penelitian ini didapatkan beberapa panjang gelombang yang muncul.

Terdapat panjang gelombang yang muncul pada 663.1 nm yang diduga teridentifikasi sebagai senyawa klorofil a. Absorpsi maksimal oleh klorofil a terjadi

dalam dua berkas panjang gelombang, yang puncaknya pada sekitar 430 dan 660 nm (Khotimah *et al.*, 2013). Pada panjang gelombang 423.0 nm diduga pula senyawa pigmen klorofil, hal ini seperti yang dijelaskan oleh Barazzouk *et al* (2012) yaitu pigmen klorofil memiliki panjang gelombang maksimum pada daerah biru 423 nm. Pada gambar 21 diatas juga terdapat panjang gelombang 341 nm, panjang gelombang tersebut diduga merupakan panjang gelombang dari senyawa tanin.

Pada uji uv- vis enyawa tanin muncul panjang gelombang 340 nm-347 nm (Sari *et al.*,2015). Terdapat pula panjang gelombang pada 232.0 nm. Pajang gelombang tersebut diduga merupakan panjang gelombang dari senyawa alkaloid. Senyawa alkaloid muncul pada panjang gelombang 237.0 pada uji menggunakan Uv-vis (Aksara *et al.*, 2013). Terdapat pula panjang gelombang 207.0 nm dan 204.0 nm.

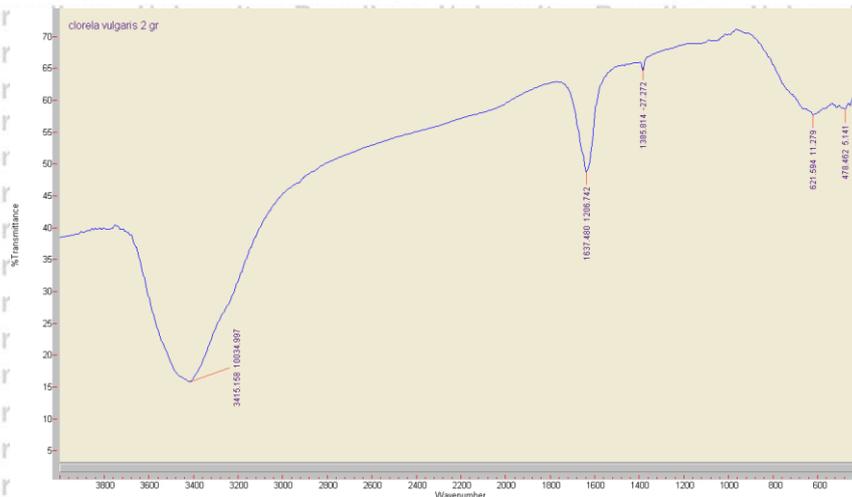
Panjang gelombang tersebut diduga merupakan panjang gelombang dari senyawa terpenoid. Dalam penelitian lain, panjang gelombang diatas 200,80 nm juga termasuk ikatan senyawa terpenoid (Zulfadli *et al.*, 2015). Panjang gelombang tersebut menunjukkan adanya transisi elektron $\pi-\pi^*$ yang merupakan serapan spektra UV khas untuk senyawa triterpenoid yang memiliki kromofor berupa ikatan rangkap yang tak terkonjugasi.

Tabel 10. Hasil Uji Uv-Vis Ekstrak *C. vulgaris*

Wavelength (nm)	Abs	Keterangan
663.1	0.346	Klorofil
423.0	0.690	klorofil
341.0	0.387	Tanin
232.0	1.021	Alkaloid
207.0	3.421	Terpenoid
204.0	3.377	Terpenoid

5.5 Hasil Analisis FT-IR (*Fourier Transform Infra Red*)

Hasil analisa menggunakan FTIR menunjukkan bahwa ekstrak *C. vulgaris* dengan pelarut metanol asetat memiliki serapan beberapa gugus fungsi, spektrum IR isolat ditunjukkan pada Gambar 22.



Gambar 22. Hasil Analisis FTIR Ekstrak *C. vulgaris*

Hasil spektroskopi IR ekstrak *C. vulgaris* menunjukkan adanya gugus fungsional suatu senyawa berdasarkan serapan spektrum elektromagnetik pada daerah IR, diantaranya bilangan gelombang 3415.158 cm^{-1} yang menunjukkan adanya gugus fenol dengan gugus O-H. Gugus fenol (gugus O-H) memiliki bilangan gelombang antara $3200\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ (Maharani *et al.*,2016). Adanya serapan ajam pada daerah bilangan 1637.480 cm^{-1} diduga dari gugus C=C *stretching* alifatik. Terdapat pula serapan pada bilangan gelombang 1385.814 yang diduga merupakan gugus C-H *bending* alifatik. Pita serapan lemah pada bilangan gelombang 621.594 cm^{-1} dan 478.462 cm^{-1} merupakan serapan dari gugus C-H. Sehingga dari hasil identifikasi senyawa ekstrak metanol *C. vulgaris* menggunakan FTIR ini didapatkan bahwa diduga termasuk senyawa golongan triterpenoid.

Tabel 11. Hasil FT-IR ekstrak *C. vulgaris*

Wavelength (cm ⁻¹)	Gugus Fungsional
3415.158	O-H
1637.480	C=C <i>stretching</i> alifatik
1385.814	C-H <i>bending</i> alifatik
621.594	gugus C-H
478.462	gugus C-H

5.6 Aklimatisasi Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp)

Proses aklimatisasi ikan kerapu cantang (*Epinephelus* sp) dilakukan untuk mencegah terjadinya stress dan agar ikan dapat beradaptasi dengan lingkungan yang baru. Dalam penelitian ini, pemeliharaan dilakukan dengan menggunakan 24 buah ember berukuran 80 liter. Setiap ember diisi dengan 5 buah ekor ikan kerapu cantang. Setelah itu diberikan tambahan aerasi. Proses aklimatisasi ini dilakukan selama 7 hari. Gambar proses aklimatisasi dapat dilihat pada gambar 23 dibawah ini.



Gambar 23. Ikan kerapu cantang dalam masa aklimatisasi

Dalam proses aklimatisasi dan pemeliharaan dilakukan pengukuran kualitas air media hidup ikan kerapu cantang. Hasil kualitas air media hidup ikan kerapu cantang (*Epinephelus* sp) dapat dilihat pada tabel 12 dibawah ini.

Tabel 12. Hasil kualitas air media hidup ikan kerapu cantang (*Epinephelus* sp)

Kode K.A	K+	K-	C1	C2	C3	CV1	CV2	CV3
Suhu (°C)	29-30	29-31	29-31	29-30	29-31	29-31	29-31	29-31
Salinitas (%o)	33-35	33-34	34-35	34-35	34-35	33-34	33-36	33-35
pH	8,1-8,4	8,0-8,4	8,0-8,4	8,1-8,4	8,0-8,3	8,2-8,3	8,0-8,3	8,0-8,4
DO (ppm)	8,9-9,2	8,6-9,0	9,0-9,2	8,9-9,2	8,9-9,3	8,7-9,1	8,8-9,0	8,8-9,0

Keterangan = K+ : kontrol positif, K- : kontrol negatif, C1 : perlakuan ekstrak dosis 17 µg/mL, C2 : perlakuan ekstrak dosis 33 µg/mL, C3 : perlakuan ekstrak dosis 50 µg/mL, CV1 : perlakuan ekstrak dosis 17 µg/mL +VNN, CV2 : perlakuan ekstrak dosis 33 µg/mL +VNN, dan CV3 : perlakuan ekstrak dosis 50 µg/mL +VNN.

Dari data pengamatan kualitas air media hidup ikan di atas diperoleh data bahwa semua parameter kualitas air masih dalam kondisi normal untuk kehidupan ikan kerapu cantang. Pada pengukuran parameter suhu diperoleh nilai suhu berkisar 29 °C-31 °C. Angka ini termasuk dalam kisaran suhu yang normal untuk lingkungan hidup ikan kerapu cantang. DKP (2007), menyebutkan suhu pemeliharaan ikan kerapu yang optimal berkisar 25°C - 32°C. Pada hasil pengukuran parameter salinitas didapatkan nilai 33 ‰ – 36 ‰. Nilai salinitas ini termasuk lebih tinggi dari nilai salinitas optimal untuk lingkungan hidup ikan kerapu yaitu 30-35 ‰ (Akbar dan Sudaryanto, 2001). Hasil pengukuran pH pada media hidup ikan kerapu cantang berkisar antara 8,0-8,4 Menurut Langkosono (2006), sebagian besar ikan menyukai lingkungan dengan pH yang berkisar antara 6,5 - 8,5. Nilai pH yang didapatkan dalam penelitian adalah optimal untuk pertumbuhan ikan. Sedangkan untuk pengukuran parameter DO didapatkan hasil berkisar antara 8,6 mg/l-9,2 mg/l. Hasil nilai DO ini masih dalam kondisi optimal untuk kehidupan ikan yaitu yang biasanya > 6 ppm (Langkosono, 2006). Untuk data hasil pengukuran kualitas air secara akurat dapat dilihat pada lapiran 2.

Kualitas air merupakan salah satu faktor yang berperan penting dalam kehidupan ikan kerapu cantang. Kualitas air yang buruk dapat menyebabkan infeksi beberapa virus yang dapat mengakibatkan kematian pada ikan. Virus dapat bertahan hidup dan akan berkembangbiak jika lingkungan pemeliharaan ikan tidak stabil seperti salah satunya adalah fluktuasi pada suhu air. Fluktuasi pada suhu air dapat mengakibatkan stress pada ikan sehingga rentan terhadap serangan VNN (Mahardika *et al.*, 2017).

5.7 Hasil Uji In-vivo Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp)

Pengujian in-vivo ekstrak *C. vulgaris* pada ikan kerapu cantang dilakukan selama 15 hari. Ikan uji menggunakan ikan kerapu cantang berukuran 7-10 cm. Pemberian ekstrak *C. vulgaris* pada ikan kerapu cantang dilakukan dengan

menggunakan metode sonde. Menurut Yanuhar (2009), metode sonde merupakan pemberian makanan kedalam tubuh ikan dengan cara memasukkan langsung kedalam mulut ikan. Untuk dosis yang digunakan adalah tiga dosis yang berbeda yaitu 17 µg/mL, 33 µg/mL, dan 50 µg/mL. Pemberian ekstrak *C. vulgaris* pada ikan perlakuan C1, C2, C3, CV1, CV2, dan CV3 dilakukan sebanyak 3 kali yaitu pada hari ke-0, hari ke-5 dan hari ke-10. Sedangkan untuk pemberian virus pada ikan perlakuan CV1, CV2 dan CV3 dilakukan sebanyak dua kali yaitu pada hari ke-5 dan hari ke-10. Selama pemeliharaan dilakukan pengamatan pada tingkah laku hewan uji untuk mengetahui perubahan dan perbedaan tingkah laku ikan disetiap perlakuan. Hasil pengamatan tingkah laku hewan uji dapat dilihat pada tabel 13 dibawah ini.

Tabel 13. Hasil pengamatan tingkah laku hewan uji

Perlakuan	Aktivitas	Respon	Keterangan
K+	Aktif berenang	Respon terhadap gerakan dan pakan	Normal
K-	Berenang didasar ember, terkadang bergerombol dekat aerasi	Krespon terhadap gerakan dan pakan kurang, nafsu makan menurun	Infeksi VNN menimbulkan kematian di hari ke-7
C1	Aktif berenang, bergerombol dekat aerasi	Respon terhadap gerakan dan pakan	Normal
C2	Aktif berenang, bergerombol dekat aerasi	Respon terhadap gerakan dan pakan	Normal
C3	Aktif berenang, bergerombol dekat aerasi	Respon terhadap gerakan dan pakan	Normal
CV1	Aktif berenang, bergerombol dekat aerasi	Respon terhadap gerakan kurang tetapi masih merespon pakan	Terjadi kematian di beberapa ikan pada hari ke-9
CV2	Aktif berenang, bergerombol dekat aerasi	Respon terhadap gerakan dan pakan	Tidak terjadi kematian pada ikan
CV3	Aktif berenang, bergerombol dekat aerasi	Respon terhadap gerakan dan pakan	Tidak terjadi kematian pada ikan

Keterangan = K+ : kontrol positif, K- : kontrol negatif, C1 : perlakuan ekstrak dosis 17 µg/mL, C2 : perlakuan ekstrak dosis 33 µg/mL, C3 : perlakuan ekstrak dosis 50 µg/mL, CV1 : perlakuan ekstrak dosis 17 µg/mL +VNN, CV2 : perlakuan ekstrak dosis 33 µg/mL +VNN, dan CV3 : perlakuan ekstrak dosis 50 µg/mL +VNN.

5.8 Hasil Amplifikasi nested RT-PCR VNN

Viral nervous necrosis (VNN) merupakan salah satu jenis penyakit yang menyerang ikan kerapu cantang. Virus ini merupakan salah satu contoh virus genom RNA. Sehingga dalam penelitian ini digunakan uji menggunakan nested RT-PCR. Kerja dari nested RT-PCR adalah dengan menggabungkan sintesis cDNA dengan template RNA dengan PCR untuk menyediakan metode cepat dan sensitif untuk menganalisis ekspresi gen (Santos *et al.*, 2004). Nested RT-PCR digunakan untuk mendeteksi atau mengukur ekspresi mRNA, dalam hal ini adalah VNN.

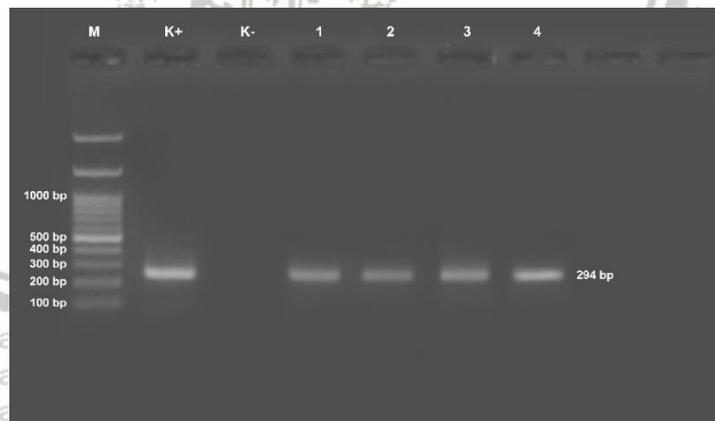
Dalam uji menggunakan nested RT-PCR ini digunakan 2 set primer spesifik VNN yaitu F2 : 5'-CGTGTCAGTCATGTGTCGCT-3'

R3 : 5'-CGAGTCAACACGGGTGAAGA-3'

NF2 : 5'-GTTCCCTGTACAACGATTCC-3'

NR3 : 5'-GGATTTGACGGGGCTGCTA-3'

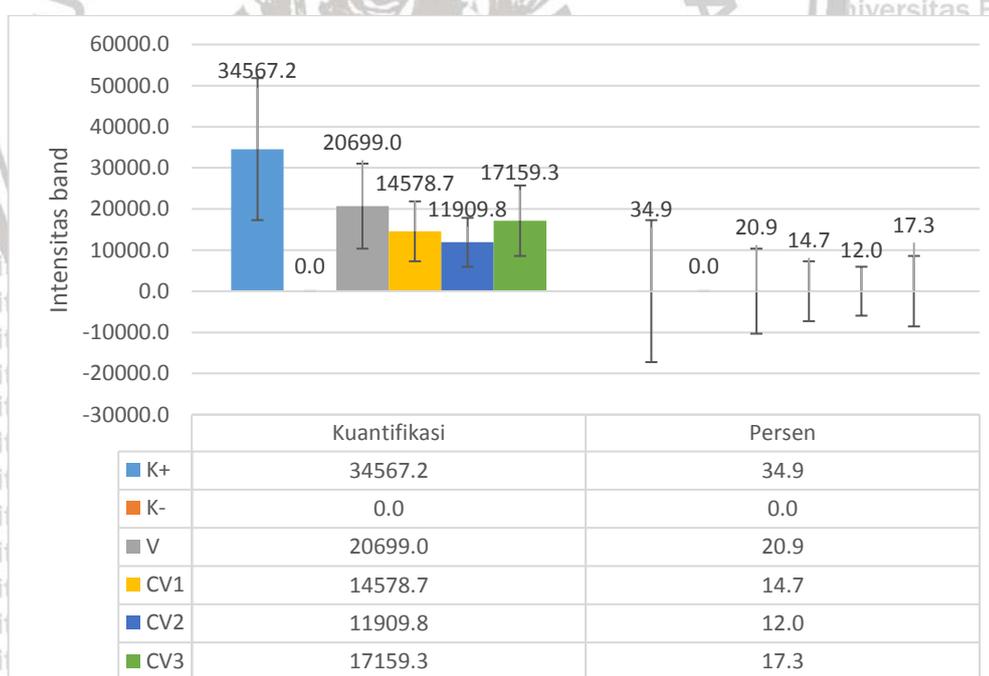
Hasil RT-PCR VNN pada organ otak ikan kerapu cantang dapat dilihat pada gambar 24 dibawah ini.



Gambar 24. Hasil amplifikasi nasted RT-PCR dengan band VNN 294 bp pada organ target VNN yaitu otak. Keterangan : (M) marker, (K+) kontrol positif VNN, (K-) kontrol negatif VNN, (1) ikan perlakuan infeksi VNN (K-), (2) ikan dengan perlakuan ekstrak *C. vulgaris* dengan dosis 17 µg/mL dan penginfeksian VNN (CV1), (3) ikan dengan perlakuan ekstrak *C. vulgaris* dengan dosis 30 µg/mL dan penginfeksian VNN (CV2), dan (4) ikan dengan perlakuan ekstrak *C. vulgaris* dengan dosis 50 µg/mL dan penginfeksian VNN (CV3).

Dari hasil uji *nasted* RT-PCR VNN pada gambar 24 diatas menunjukkan bahwa dari ke empat sampel yang diuji yaitu K-, CV1, CV2 dan CV3, semua sampel menunjukkan hasil positif VNN. Hal ini ditunjukkan oleh munculnya band pada 294 bp pada organ otak ikan kerapu cantang setiap perlakuan. Hasil *nasted* RT-PCR pada penelitian ini sama dengan yang dijelaskan pada penelitian Koesharyani dan Novita (2006) yang menyebutkan bahwa VNN muncul pada band 294 bp. Uji dengan menggunakan *nasted* RT-PCR memiliki tingkat sensitifitas yang lebih tinggi hingga 1000x jika dibandingkan dengan menggunakan metode PCR lainnya.

Selanjutnya dilakukan analisa semi kuantitatif dengan menggunakan imageJ untuk menghitung intensitas band virus RNA VNN dari metode *nasted* RT-PCR yang muncul. Hasil semikuantifikasi imageJ band RNA VNN dapat dilihat ada Gambar 25.



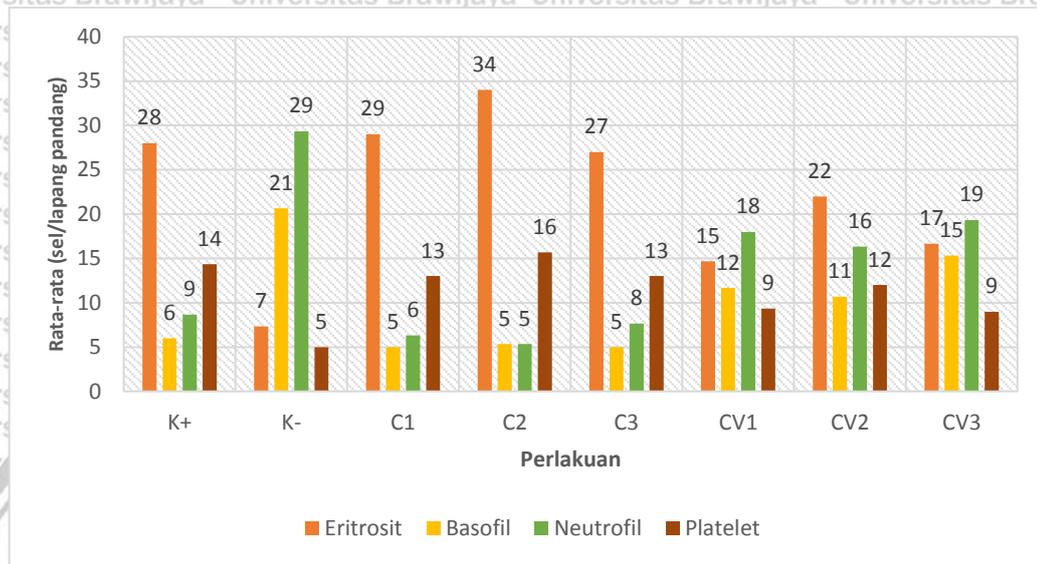
Gambar 25. Intensitas band 294 bp virus RNA VNN pada organ otak. Keterangan: (K+) kontrol positif VNN, (K-) kontrol negatif VNN, (V) ikan perlakuan infeksi VNN, (CV1) ikan dengan perlakuan ekstrak *C. vulgaris* dengan dosis 17 µg/mL dan penginfeksian VNN, (CV2) ikan dengan perlakuan ekstrak *C. vulgaris* dengan dosis 30 µg/mL dan penginfeksian VNN, dan (CV3) ikan dengan perlakuan ekstrak *C. vulgaris* dengan dosis 50 µg/mL dan penginfeksian VNN.

Hasil analisa semikualitatif dengan software imageJ pada gambar 25 diatas menjelaskan bahwa intensitas band dari 4 sampel yang diuji terjadi pada sampel yang terdeteksi positif (+) virus RNA VNN (V, CV1, CV2 dan CV3), didapatkan bahwa pada perlakuan CV2 menunjukkan intensitas yang rendah dengan nilai 11909,8 atau sekitar 12 %, hal ini dikarenakan penggunaan ekstrak kasar *C. vulgaris* dengan dosis 33 µg/ml mampu menghambat infeksi VNN, sehingga menunjukkan hasil intensitas VNN yang rendah. *C. vulgaris* memiliki potensi sebagai antivirus, hal ini ditunjukkan dengan kemampuannya yang mampu menghambat infeksi virus yang diuji secara in-vitro (Falaise *et al.*, 2016).

5.9 Respon Imunologi Sel Darah pada Organ Target

Respon imunologi merupakan respon yang terjadi didalam tubuh berupa urutan kejadian yang sangat kompleks sebagai akibat dari adanya serangan antigen dari luar dan berfungsi untuk mengeliminasi antigen tersebut. Respon imun ini terdiri dari satu set dari komponen selular dan humoral untuk mempertahankan tubuh terhadap zat asing seperti mikroorganisme, toksin atau sel ganas, yang merespon faktor-faktor seperti endogen atau komponen eksogen yang merangsang sistem ini (Takahashi dan Urbinatsi, 2013), dalam penelitian ini difokuskan pada infeksi VNN. Respon imunologi dalam tubuh salah satunya dapat dilihat dari sel darah. Sebagai akibat dari infeksi VNN, tubuh akan mengalami inflamasi, dimana inflamasi ini merupakan bentuk pertahanan sebagai respon nonspesifik kerusakan jaringan dan digunakan oleh sistem imun bawaan dan sistem imun adaptif untuk melawan patogen. Mediator-mediator inflamasi akan dilepas akan mengakibatkan meningkatnya aliran darah. Sel-sel darah yang berperan dalam kejadian inflamasi ini adalah sel darah putih atau leukosit dengan turunanya; neutrofil, basofil, eosinofil, limfosit, mastosit makrofag, dan sel plasma (Effendi, 2003). Dalam penelitian ini akan diamati perubahan sel darah yaitu

mencakup eritrosit, basofil, neutrofil dan platelet (trombosit) sebagai akibat dari pemberian setiap perlakuan. Hasil respon imunologi darah secara terperinci dapat dilihat pada lampiran 3. Berikut merupakan rata-rata sel darah sebagai respon imunologi dapat dilihat pada Gambar 26 dibawah ini.



Gambar 26. Grafik respon imunologi organ otak ikan kerapu cantang. Keterangan = K+ : kontrol positif, K- : kontrol negatif, C1 : perlakuan ekstrak dosis 17 µg/mL, C2 : perlakuan ekstrak dosis 33 µg/mL, C3 : perlakuan ekstrak dosis 50 µg/mL, CV1 : perlakuan ekstrak dosis 17 µg/mL +VNN, CV2 : perlakuan ekstrak dosis 33 µg/mL +VNN, dan CV3 : perlakuan ekstrak dosis 50 µg/mL +VNN.

1) Eritrosit

Eritrosit merupakan cakram bikonkaf yang tidak berinti yang berdiameter ± 8 µm, dengan tebal bagian tepi mencapai 2 µm dan ketebalan bagian tengah menjadi 1 µm. Komponen utama eritrosit adalah hemoglobin protein yang mengangkut sebagian besar oksigen (O₂) dan sebagian kecil fraksi karbon dioksida (CO₂) (Saparuddin *et al.*, 2017). Dari hasil pengamatan respon imunologi perhitungan sel eritrosit pada perlakuan K+, C1, C2 dan C3 dapat dilihat bahwa jumlah eritrosit masih tinggi jika dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Pada perlakuan K+ nilai jumlah rata-rata sel eritrosit sebesar 28 sel/lapang pandang (mm²), pada perlakuan C1 nilai jumlah rata-rata sel eritrosit sebesar 29 sel/lapang

pandang (mm^2), pada perlakuan C2 sebesar 34 sel/lapang pandang (mm^2) dan pada perlakuan C3 sebesar 27 sel/lapang pandang (mm^2). Hal ini karena pada kondisi normal tanpa adanya infeksi virus, eritrosit merupakan komponen darah yang jumlahnya paling banyak (Setiawan *et al.*, 2014). Sedangkan pada perlakuan K- jumlah sel eritrosit mengalami penurunan yang cukup signifikan yaitu hanya sebanyak 6 sel/lapang pandang (mm^2). Hal ini seperti yang dijelaskan oleh Esteban, (2001) dan Dugenci *et al* (2003) bahwa jumlah sel eritrosit menurun setelah terjadi infeksi. Pada perlakuan dengan penambahan ekstrak *C. vulgaris* dan infeksi VNN sepertipada perlakuan CV1, CV2 dan CV3 nilai eritrosit lebih meningkat jika dibandingkan pada ikan perlakuan K-. Pada perlakuan CV1 nilai rata-rata sel eritrosit sebanyak 15 sel/lapang pandang (mm^2), ada perlakuan CV2 nilai eritrosit sebesar 22 sel/lapang pandang (mm^2) dan pada perlakuan CV3 didapatkan nilai rata-rata sel eritrosit sebanak 17 sel/lapang pandang (mm^2). Hal ini menunjukkan bahwa penambahan ekstrak *C. vulgaris* dapat meningkatkan respon imunologi dalam ikan kerapu cantang yang telah diinfeksi VNN.

2) Basofil

Basofil adalah bagian dari leukosit yang berperan untuk membangkitkan proses perbarahan akut pada tempat deposisis antigen (Cahyaningsih dan Wijatagati, 1999). Jika dilihat dari hasil perhitungan rata-rata sel basofil (Gambar 25), pada perlakuan K+ jumlah rata-rata sel basofil sebanyak 6 sel/lapang pandang. Jumlah rata-rata sel basofil pada perlakuan C1, C2 dan C3 tidak berbeda jauh dengan jumlah rata-rata pada perlakuan K+ yaitu pada perlakuan C1 nilai jumlah rata-rata sel basofil sebesar 5 sel/lapang pandang (mm^2), pada perlakuan C2 sebesar 5 sel/lapang pandang (mm^2) dan pada perlakuan C3 juga sebesar 5 sel/lapang pandang (mm^2). Hal ini dikarenakan sel basofil merupakan bagian sel leukosit yang keberadaannya dipengaruhi oleh adanya infeksi. Jika terdapat infeksi virus maka jumlah sel basofil dalam darah meningkat. Ini dibuktikan oleh

hasil dari perlakuan K- yaitu memiliki nilai jumlah rata-rata sel basofil sebesar 21 sel/lapang pandang (mm^2). Pada perlakuan CV1 dan CV2 dan CV3 nilai sel basofil mengalami sedikit penurunan jika dibandingkan dengan perlakuan K- yaitu pada perlakuan CV1 nilai rata-rata sel basofil sebanyak 12 sel/lapang pandang (mm^2), ada perlakuan CV2 nilai basofil sebesar 11 sel/lapang pandang (mm^2) dan pada perlakuan CV3 didapatkan nilai rata-rata sel basofil sebanyak 15 sel/lapang pandang (mm^2). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *C. vulgaris* pada ikan kerapu yang diinfeksi VNN dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh yang ditunjukkan dengan naiknya jumlah eritrosit dan menurunnya jumlah sel basofil.

3) Neutrofil

Neutrofil merupakan jenis sel darah putih yang juga berperan dalam mekanisme pertahanan tubuh. Pada hasil perhitungan sel neutrofil pada penelitian ini didapatkan hasil yaitu pada perlakuan K+ jumlah rata-rata sel neutrofil sebanyak 9 sel/lapang pandang. Jumlah rata-rata sel neutrofil pada perlakuan C1, C2 dan C3 tidak berbeda jauh dengan jumlah rata-rata pada perlakuan K+ yaitu pada perlakuan C1 nilai jumlah rata-rata sel neutrofil sebesar 6 sel/lapang pandang (mm^2), pada perlakuan C2 sebesar 5 sel/lapang pandang (mm^2) dan pada perlakuan C3 juga sebesar 8 sel/lapang pandang (mm^2). Seperti halnya sel basofil, sel neutrofil akan terproduksi secara masal ketika terdapat infeksi, sedangkan pada kondisi normal jumlah produksi sel neutrofil rendah. Seperti pada perlakuan K- yaitu memiliki nilai jumlah rata-rata sel neutrofil sebesar 29 sel/lapang pandang.

Pada perlakuan CV1 dan CV2 dan CV3 nilai sel neutrofil mengalami sedikit penurunan jika dibandingkan dengan perlakuan K- yaitu pada perlakuan CV1 nilai rata-rata sel neutrofil sebanyak 18 sel/lapang pandang (mm^2), ada perlakuan CV2 nilai neutrofil sebesar 16 sel/lapang pandang (mm^2) dan pada perlakuan CV3 didapatkan nilai rata-rata sel neutrofil sebanyak 19 sel/lapang pandang (mm^2). Peningkatan jumlah neutrofil merupakan akibat dari mekanisme kekebalan tubuh

yang bekerja sebagai respon adanya infeksi dalam tubuh. Menurut Tizard (1988), hal ini berkaitan dengan fungsi utama neutrofil yaitu penghancuran bahan asing melalui proses fagositosis yaitu kemotaksis dimana sel akan bermigrasi menuju partikel, pelekatan partikel pada sel, penelanan partikel oleh sel, dan penghancuran partikel oleh enzim lisosim di dalam fagolisosom. Peningkatan jumlah sel neutrofil juga mengindikasikan adanya peningkatan kegiatan pengumpulan makrofag di tempat terjadinya infeksi, sehingga makrofag akan lebih mudah untuk menghancurkan partikel asing (Utami *et al.*, 2013).

4) Platelet

Platelet atau trombosit berperan penting dalam proses pembekuan darah.

Ciri khusus trombosit adalah adanya lingkaran sitoplasma tipis di sekeliling inti

yang akan berwarna ungu tua saat terwarnai Giemsa. Ukuran rata – rata trombosit

berkisar antara $4 \times 7 \mu\text{m}$ – $5 \times 13 \mu\text{m}$ (Utama, 2017). Pada penelitian ini, hasil

perhitungan sel platelet pada penelitian ini didapatkan hasil yaitu pada perlakuan

K+ jumlah rata-rata sel platelet sebanyak 14 sel/lapang pandang (mm^2). Jumlah

rata-rata sel trombosit pada perlakuan C1, C2 dan C3 tidak berbeda jauh dengan

jumlah rata-rata pada perlakuan K+ yaitu pada perlakuan C1 nilai jumlah rata-rata

sel trombosit sebesar 13 sel/lapang pandang (mm^2), pada perlakuan C2 sebesar

16 sel/lapang pandang (mm^2) dan pada perlakuan C3 juga sebesar 13 sel/lapang

pandang (mm^2). Hanya saja pada perlakuan K- jumlah trombosit mengalami

penurunan yaitu hanya sebanyak 5 sel/lapang pandang (mm^2). Dan pada

perlakuan CV1 nilai rata-rata sel platelet sebanyak 9 sel/lapang pandang (mm^2),

pada perlakuan CV2 nilai platelet sebesar 12 sel/lapang pandang (mm^2) dan pada

perlakuan CV3 didapatkan nilai rata-rata sel platelet sebanyak 9 sel/lapang

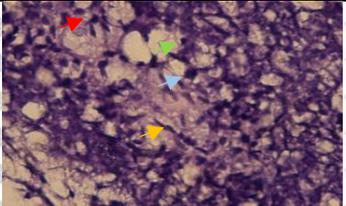
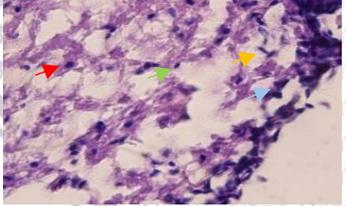
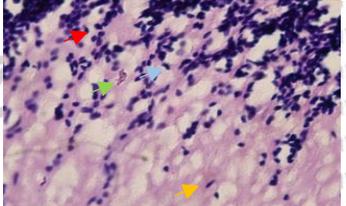
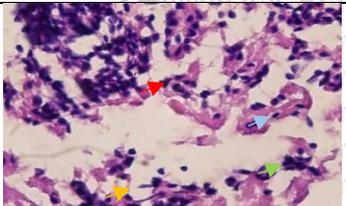
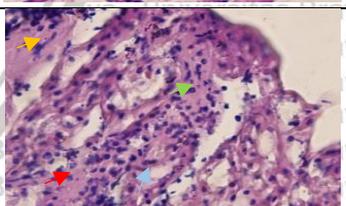
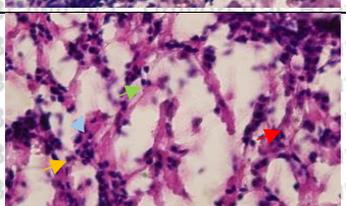
pandang (mm^2). Dari hasil ini tidak ada peningkatan secara signifikan. Hal ini

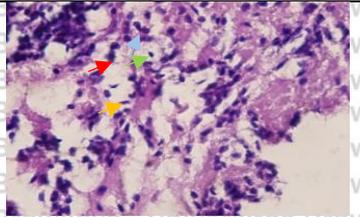
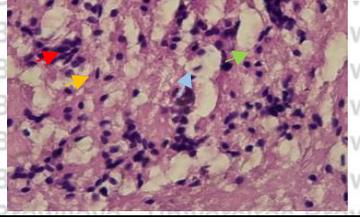
diduga karena pada infeksi VNN tidak mengakibatkan luka atau pendarahan pada

organ sehingga sel platelet yang dihasilkan tidak banyak. Jika dilihat dari

fungsinya, platelet penting dalam proses pembekuan darah (Saparuddin *et al.*, 2017).

Tabel 14. Hasil rata-rata penghitungan sel sebagai respon imunologi pada jaringan otak

Perlakuan	Jumlah rata-rata respon imunologi				Gambar
	Eritrosit	Basofil	Neutrofil	Platelet	
K+	28	6	9	14	
K-	7	21	29	5	
C1	29	5	6	13	
C2	34	5	5	16	
C3	27	5	8	13	
CV1	15	12	18	9	

CV2	22	11	16	12	
CV3	17	15	19	9	

Keterangan = K+ : kontrol positif, K- : kontrol negatif, C1 : perlakuan ekstrak dosis 17 µg/mL, C2 : perlakuan ekstrak dosis 33 µg/mL, C3 : perlakuan ekstrak dosis 50 µg/mL, CV1 : perlakuan ekstrak dosis 17 µg/mL +VNN, CV2 : perlakuan ekstrak dosis 33 µg/mL +VNN, dan CV3 : perlakuan ekstrak dosis 50 µg/mL +VNN. Panah biru : eritrosit, panah merah : neutrofil, panah hijau : basofil, panah kuning : platelet.

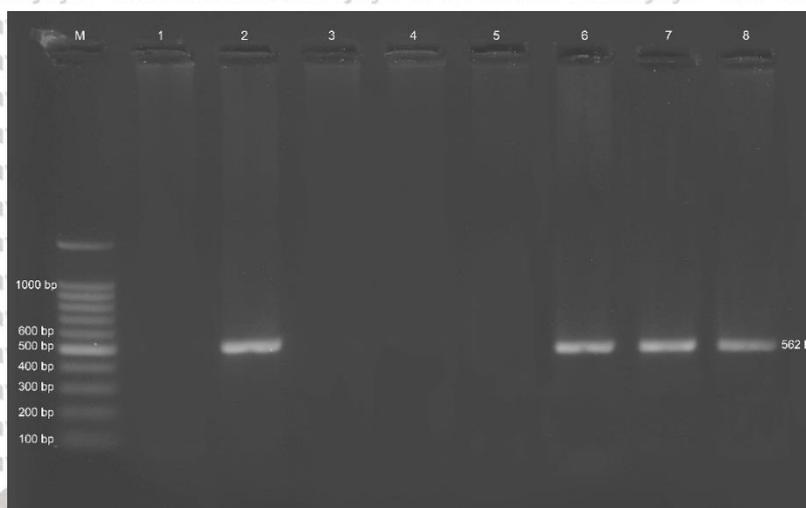
5.10 Hasil Amplifikasi RT-PCR dan Imunohistokimia Ekspresi *Heat Shock Protein*

Hsp merupakan protein seluler yang ditemukan di semua organisme hidup, termasuk ikan. Hsp disebut sebagai protein stres. Ekspresi Hsp dipengaruhi oleh beragam sel dan jaringan sel, sebagai respon baik untuk stressor biologis seperti patogen infeksius (Iwama *et al.*, 1998). Dalam penelitian ini hsp terekspresi akibat adanya infeksi dari VNN. Pada penelitian ini untuk uji ekspresi dari Hsp dilakukan dengan menggunakan dua macam uji yaitu pertama dengan uji RT-PCR untuk mengetahui ada tidaknya ekspresi Hsp pada organ target ikan kerapu cantang yaitu organ otak (kualitatif) dan yang kedua menggunakan imunohistokimia untuk mendapatkan persentase DAB (kualitatif). Persentase DAB ini mewakili persentase terekspresinya Hsp pada organ otak ikan kerapu cantang.

5.10.1 Hasil Amplifikasi RT-PCR Hsp70

Amplifikasi cDNA total untuk mendapatkan gen Hsp70 menggunakan sepasang primer yaitu F : 5'-ATCCTGACCATTGAAGACGG-3' dan R : 5'-TGTTCAAGTTCTCTGCCGTTG-3'. Pengujian ekspresi Hsp menggunakan RT-PCR hanya untuk melihat ada tidaknya ekspresi gen Hsp pada organ target yaitu

otak (kuantitatif). Hasil amplifikasi RT-PCR ekspresi Hsp70 pada organ otak ikan kerapu cantang dapat dilihat pada gambar 27 dibawah ini.

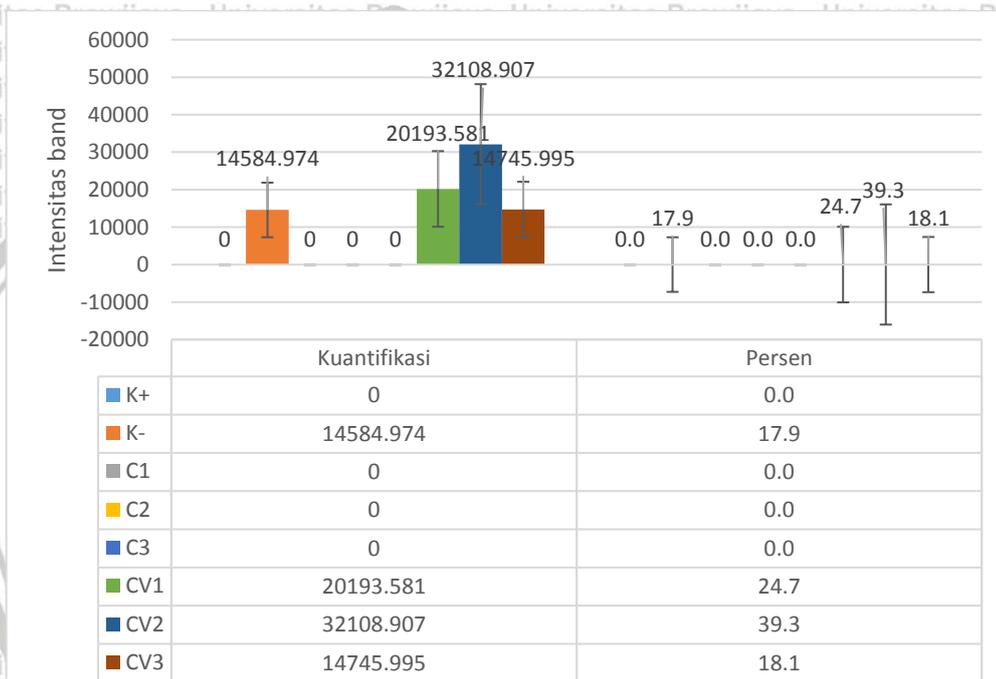


Gambar 27. Hasil amplifikasi RT-PCR ekspresi Hsp70 pada organ otak kerapu cantang. Keterangan : (M) marker, (1) ikan tanpa perlakuan (K+), (2) ikan perlakuan infeksi VNN (K-), (3) ikan dengan perlakuan pemberian ekstrak *C. vulgaris* dengan dosis 17 µg/mL (C1), (4) ikan dengan perlakuan pemberian ekstrak *C. vulgaris* dengan dosis 30 µg/mL (C2), (5) ikan dengan perlakuan pemberian ekstrak *C. vulgaris* dengan dosis 50 µg/mL (C3), (6) ikan dengan perlakuan pemberian ekstrak *C. vulgaris* dengan dosis 17 µg/mL dan penginfeksian VNN (CV1), (7) ikan dengan perlakuan pemberian ekstrak *C. vulgaris* dengan dosis 30 µg/mL dan penginfeksian VNN (CV2), dan (8) ikan dengan perlakuan pemberian ekstrak *C. vulgaris* dengan dosis 50 µg/mL dan penginfeksian VNN (CV3).

Ekspresi Hsp70 pada organ otak kerapu cantang yang diuji dengan RT-PCR menunjukkan band 562 bp. Dari hasil RT-PCR organ otak ikan kerapu cantang diatas (Gambar 26) dapat dilihat bahwa tidak semua perlakuan positif Hsp70. Perlakuan yang negatif Hsp70 yaitu pada organ ikan dengan perlakuan K+, C1, C2, dan C3, sedangkan perlakuan yang positif terekspresi Hsp70 yaitu pada ikan perlakuan K-, CV1, CV2 dan CV3. Hal ini dikarenakan pada ikan perlakuan K-, CV1, CV2 dan CV3 terdapat stressor yang mengakibatkan terekspresinya Hsp70. Stressor yang dimaksud adalah infeksi VNN. VNN dapat mengaktifkan ekspresi Hsp70 pada tubuh ikan. Sedangkan pada ikan yang tidak diinfeksi VNN tidak dapat mengaktifkan ekspresi HSp70. Hal ini karena pada keluarga hsp yang utama diinduksi ketika terjadi stress adalah Hsp70. Hsp70 memiliki fungsi sitoproteksi

penting yang membantu melipat kembali dan memperbaiki protein yang rusak (Deane dan Woo, 2004).

Selanjutnya dilakukan analisa semi kuantitatif dengan menggunakan imageJ untuk menghitung intensitas band Hsp70 dari metode RT-PCR yang muncul. Berikut merupakan gambar grafik hasil semikuantifikasi imageJ gen Hsp70. Hasil penghitungan semi kuantitatif pita cDNA ekspresi HSP 70 seperti pada Gambar 28.



Gambar 28. Hasil analisa semikuantitatif intensitas band 562 bp hsp70 pada organ otak. Keterangan = K+ : kontrol positif, V : perlakuan VNN, C1 : perlakuan ekstrak dosis 17 µg/mL, C2 : perlakuan ekstrak dosis 33 µg/mL, C3 : perlakuan ekstrak dosis 50 µg/mL, CV1 : perlakuan ekstrak dosis 17 µg/mL +VNN, CV2 : perlakuan ekstrak dosis 33 µg/mL +VNN, dan CV3 : perlakuan ekstrak dosis 50 µg/mL +VNN.

Hasil analisa semikualitatif dengan software imageJ pada gambar 28 diatas menjelaskan bahwa intensitas band dari 8 sampel, didapatkan bahwa pada perlakuan yang menunjukkan intensitas yang rendah adalah pada perlakuan K+, C1, C2 dan C3 karena ada perlakuan ini HSp70 sama sekali tidak tereksresi sehingga intensitas dari perlakuan ini adalah 0 %. Intensitas tertinggi yaitu pada

perlakuan CV2 dengan intensitas sebesar 39,3%. Hal ini dikarenakan pada perlakuan CV2 yaitu penggunaan ekstrak kasar *C. vulgaris* dengan dosis 33 µg/ml dan infeksi VNN dapat meningkatkan ekspresi Hsp70. VNN yang berperan sebagai stressor yang dapat mengaktifkan dari ekspresi Hsp70 dan ekstrak *C. vulgaris* juga berperan dalam co-inducer dari Hsp70 sehingga dengan penambahan perlakuan ini ekspresi dari Hsp70 juga dapat meningkat. Sebagai molekul anti-inflamasi, selama infeksi ekspresi *Heat shock protein 70* (Hsp70) meningkat sehingga memberikan sitoproteksi pada sel.

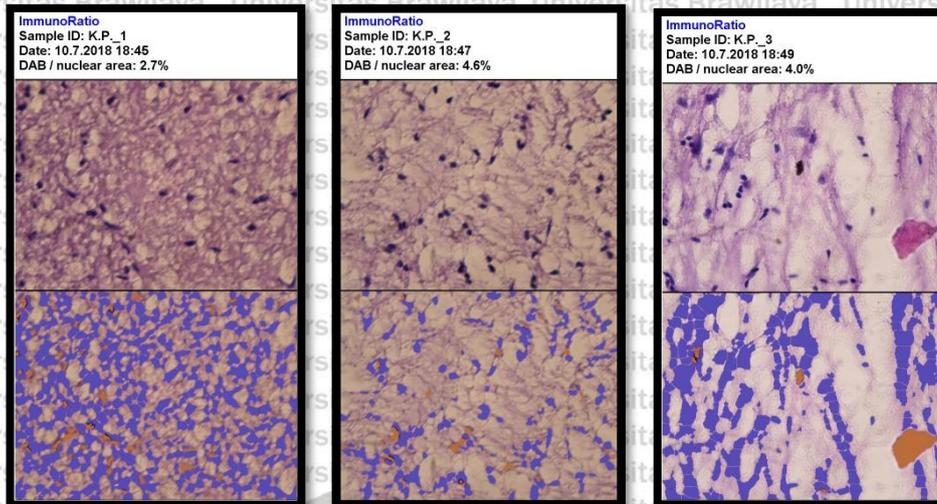
5.10.2 Hasil analisis Imunohistokimia Hsp

Ekstrak dari *C. vulgaris* mampu menekan peradangan pada saat infeksi virus VNN terjadi. Respon yang ditunjukkan oleh *heat shock protein* diidentifikasi dengan teknik imunohistokimia. Analisis ekspresi Hsp difokuskan pada organ target yaitu otak. Imunohistokimia mampu memvisualisasikan komponen sel, seperti protein atau makromolekul lainnya pada sampel jaringan. Analisis imunohistokimia menggunakan merangkat lunak immunoRatio menghasilkan persentase DAB yang berbeda setiap ikan perlakuan.

1) Ikan Kontrol Positif (K+)

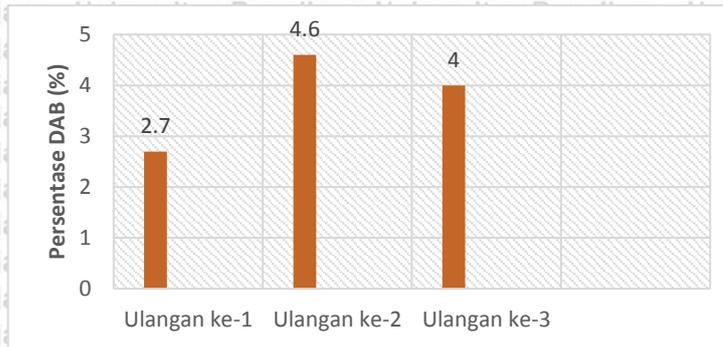
Ikan K+ merupakan ikan yang tanpa diberikan perlakuan ekstrak maupun VNN. Hasil pengamatan pada ikan dengan menggunakan imunohistokimia dan analisis lanjutan dengan menggunakan immunoRatio didapatkan persentase DAB.

Metode IHK yang digunakan pada penelitian ini adalah *indirect methode* yang menggunakan dua antibodi yaitu primer dan sekunder. IHK digunakan untuk mendeteksi keberadaan antigen spesifik didalam suatu sel jaringan dengan menggunakan prinsip pengikatan antara antibodi dengan antigen pada jaringan hidup (Hasdianah *et al.*, 2014). Hasil imunohistokimia organ otak ikan kerapucang kontrol positif dapat dilihat pada gambar 29 dibawah ini.



Gambar 29. Hasil ImmunoRatio Organ Otak Ikan Kerapu Cantang Kontrol (K+). Keterangan : (A) ikan K+ ulangan 1, (B) ikan K+ ulangan 2, dan (C) ikan K+ ulangan 3

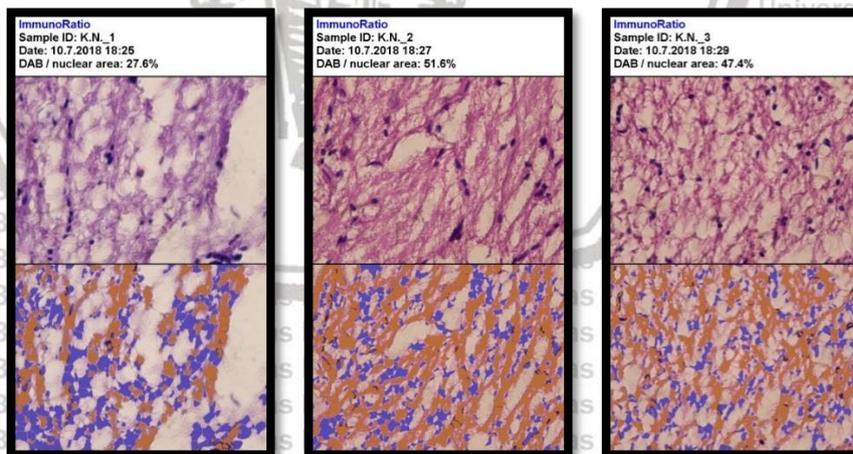
Jika dilihat dari gambar diatas, organ otak ikan K+ didapatkan rata-rata prosentase nilai DAB pada ketiga gambar diatas sebesar 3,7 % yang didapatkan dari prosentase gambar 29a sebesar 2,7 %, presentase gambar 29b sebesar 4,6% dan prosentase gambar 29c sebesar 4,0%. Nilai DAB merupakan nilai persentase terekspresinya gen Hsp70 pada organ otak ikan kerapu cantang. Nilai ini terbilang kecil, karena gen Hsp70 memang hanya akan aktif atau berekspresi ketika sel mengalami bahaya. HSP70 adalah protein yang terinduksi secara kuat setelah stres (Udiyanto *et al.*, 2013). Sehingga pada saat tubuh dalam kondisi normal tanpa adanya stress, gen hsp70 akan terekspresi dalam jumlah kecil. Kuantifikasi DAB hasil perlakuan K+ (tanpa ekstrak dan tanpa virus VNN) seperti terlihat pada Gambar 30.



Gambar 30. Grafik data persentase DAB pengulangan pada perlakuan K+ (tanpa pemberian perlakuan ekstrak *C. vulgaris* dan infeksi VNN)

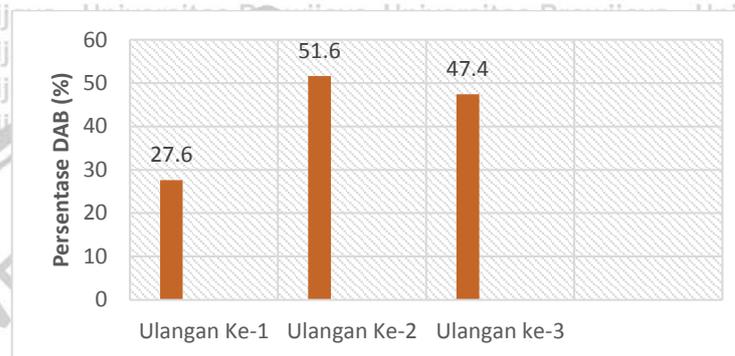
2) Ikan Kontrol Negatif (K-)

Ikan K- merupakan ikan yang diberi perlakuan infeksi VNN. Hasil imunohistokimia pada organ otak ikan perlakuan VNN didapatkan nilai persentase rata-rata nilai DAB pada ketiga gambar dibawah (Gambar 31) sebesar 42,2% yang didapatkan dari prosentase gambar 31a sebesar 27,6 %, prosentase gambar 31b sebesar 51,6% dan prosentase gambar 31c sebesar 47,4%. Hasil imunohistokimia organ otak ikan kerapu cantang kontrol negatif dapat dilihat pada gambar 31 dibawah ini.



Gambar 31. Hasil ImmunoRatio Organ Otak Ikan Kerapu Cantang Perlakuan VNN (K-). Keterangan : (A) ikan K- ulangan 1, (B) ikan K- ulangan 2, dan (C) ikan K- ulangan 3.

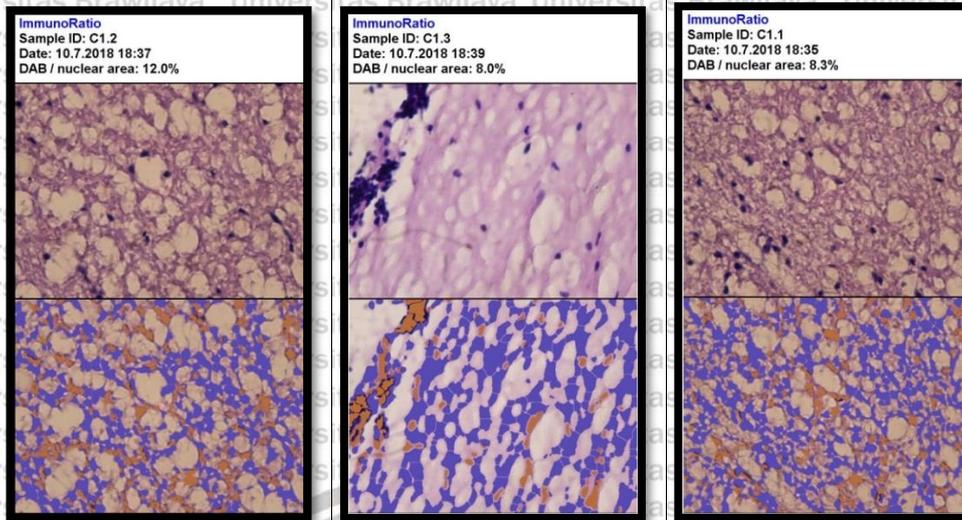
Dari hasil immunoRatio diatas, nilai ekspresi Hsp70 mengalami peningkatan, hal ini menunjukkan bahwa sel mengalami stress akibat infeksi VNN. VNN merupakan salah satu stressor yang mempengaruhi ekspresi Hsp70. Pada saat sel mengalami stress, maka Hsp akan mengalami peningkatan ekspresi karena Hsp tersebut berusaha melindungi sel agar tidak terjadi perubahan pembentukan struktur protein (Indah dan Soehardjo, 2006). Kuantifikasi DAB hasil perlakuan K- (pemberian virus VNN) seperti terlihat pada Gambar 32.



Gambar 32. Grafik data persentase DAB pengulangan pada perlakuan K- (perlakuan pemberian virus VNN).

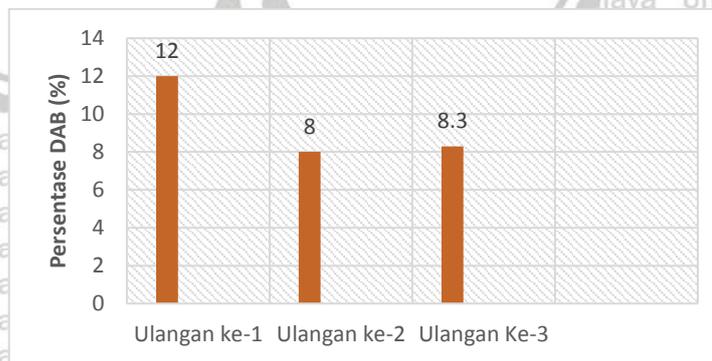
3) Ikan Perlakuan C1

Ikan perlakuan C1 merupakan ikan perlakuan pemberian ekstrak *C. vulgaris* dengan dosis 17 µg/mL. Hasil immunohistokimia pada organ otak ikan perlakuan C1 didapatkan nilai persentase rata-rata nilai DAB pada ketiga gambar dibawah (Gambar 33) sebesar 9,4 % yang didapatkan dari prosentase gambar 33a sebesar 12,0 %, presentase gambar 33b sebesar 8,0% dan prosentase gambar 33c sebesar 8,3%. Hasil immunohistokimia organ otak ikan kerapu cantang perlakuan C1 dapat dilihat pada gambar 33 dibawah ini.



Gambar 33. Hasil ImmunoRatio Organ Otak Ikan Kerapu Cantang Perlakuan C1. Keterangan : (A) ikan C1 ulangan 1, (B) ikan C2 ulangan 2, dan (C) ikan C3 ulangan 3.

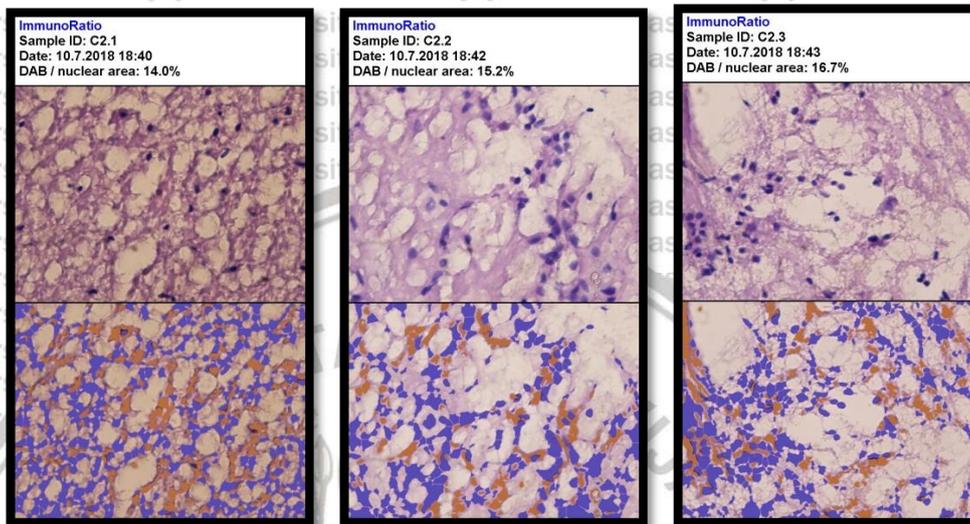
Dari data diatas, hasil nilai persentase DAB pada perlakuan C1 cenderung rendah karena pada perlakuan ini hanya diberikan penambahan ekstrak *C. vulgaris* yang sifatnya tidak berbahaya bagi tubuh ikan sehingga ekspresi Hsp70 cenderung tidak meningkat. HSP70 tidak diekspresikan pada setiap sel, karena protein ini akan terekspresi bila sel mengalami stress berat. Protein ini berperan sangat besar pada waktu tanslasi, tranlokasi. proteolisis dan *folding* ptoein (Indah *et al.*, 2006). Kuantifikasi DAB hasil perlakuan C1 (pemberian ekstrak *C. vulgaris* dengan dosis 17 $\mu\text{g/mL}$) seperti terlihat pada Gambar 34.



Gambar 34. Grafik data persentase DAB pengulangan pada perlakuan C1 (pemberian ekstrak *C. vulgaris* dengan dosis 17 $\mu\text{g/mL}$).

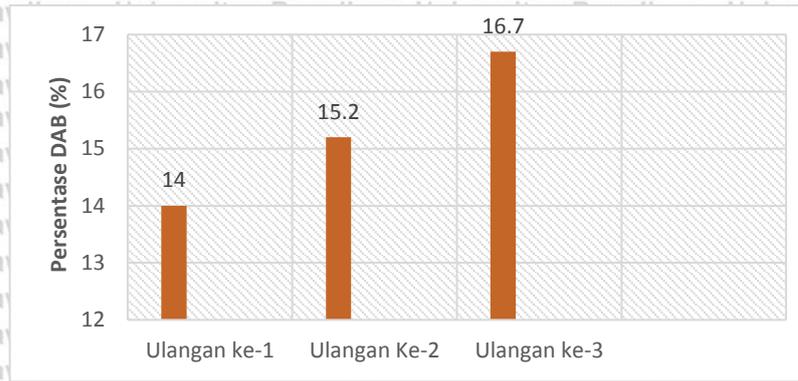
4) Ikan Perlakuan C2

Ikan perlakuan C2 merupakan ikan perlakuan pemberian ekstrak *C. vulgaris* dosis 33 µg/mL. Hasil ImmunoRatio dari perlakuan C2 dapat dilihat pada gambar 35 dibawah ini.



Gambar 35. Hasil ImmunoRatio Organ Otak Ikan Kerapu Cantang Perlakuan C2. Keterangan : (A) ikan C2 ulangan 1, (B) ikan C2 ulangan 2, dan (C) ikan C2 ulangan 3.

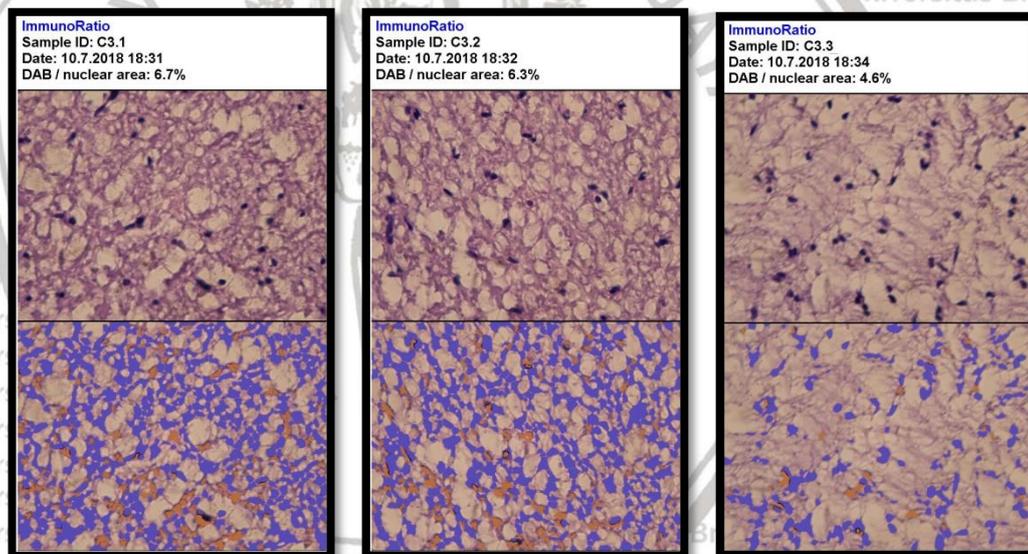
Hasil imunohistokimia pada organ otak ikan perlakuan C2 didapatkan nilai persentase rata-rata nilai DAB pada ketiga gambar dibawah (Gambar 35) sebesar 15,3 % yang didapatkan dari prosentase gambar 35a sebesar 14,0 %, presentase gambar 35b sebesar 15,2% dan prosentase gambar 35c sebesar 16,7%. Nilai persentase DAB ini cenderung kecil sama seperti hasil pada perlakuan C1 karena pada perlakuan ini hanya diberikan penambahan ekstrak *C. vulgaris* yang sifatnya tidak berbahaya bagi tubuh ikan sehingga ekspresi Hsp70 cenderung tidak meningkat. Kuantifikasi DAB hasil perlakuan C1 (pemberian pemberian ekstrak *C. vulgaris* dosis 33 µg/mL) seperti terlihat pada Gambar 36.



Gambar 36. Grafik data persentase DAB pengulangan pada perlakuan C2 (pemberian ekstrak *C. vulgaris* dosis 33 µg/mL)

5) Ikan Perlakuan C3

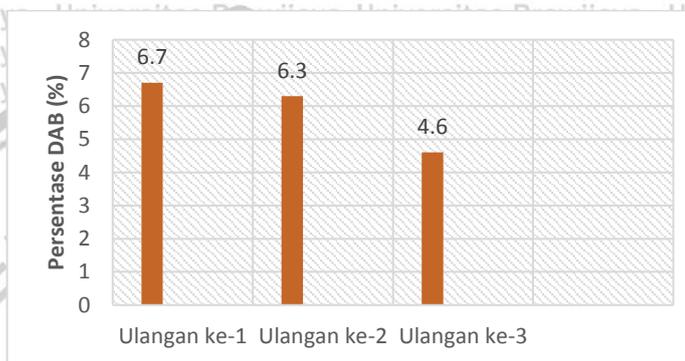
Ikan perlakuan C3 merupakan ikan perlakuan pemberian ekstrak *C. vulgaris* dosis 50 µg/mL. Hasil ImmunoRatio dari perlakuan C2 dapat dilihat pada gambar 37 dibawah ini.



Gambar 37. Hasil ImmunoRatio Organ Otak Ikan Kerapu Cantang Perlakuan C3. Keterangan : (A) ikan C3 ulangan 1, (B) ikan C3 ulangan 2, dan (C) ikan C2 ulangan 3.

Hasil imunositokimia pada organ otak ikan perlakuan C3 didapatkan nilai persentase rata-rata nilai DAB pada ketiga gambar dibawah (Gambar 37) sebesar 5,8 % yang didapatkan dari prosentase gambar 37a sebesar 6,7 %, presentase gambar 37b sebesar 6,3% dan prosentase gambar 37c sebesar 4,6%. Nilai

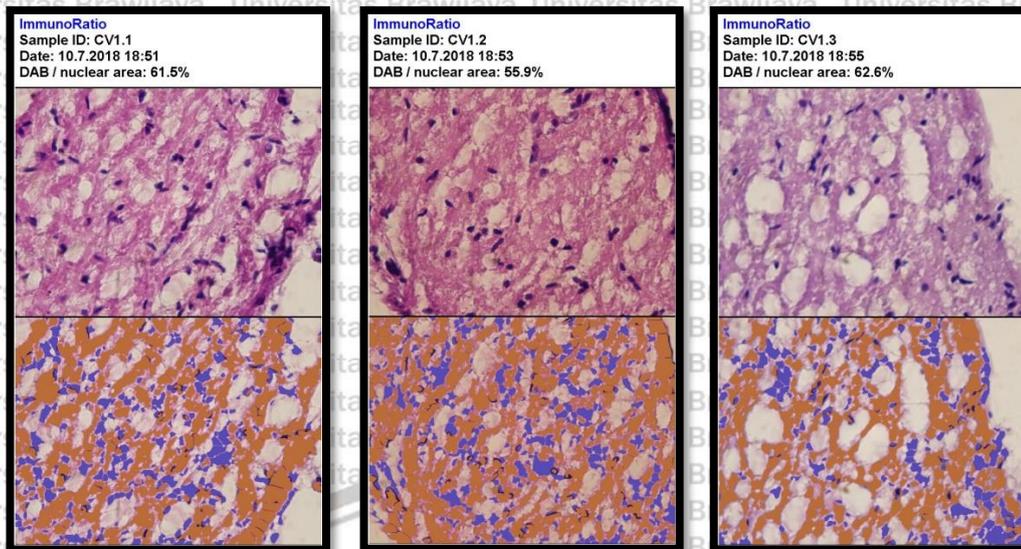
persentase DAB ini masih cenderung kecil sama seperti hasil pada perlakuan C1 dan C2 karena pada perlakuan ini hanya diberikan penambahan ekstrak *C. vulgaris* yang sifatnya tidak berbahaya bagi tubuh ikan sehingga tidak terjadi peningkatan dari ekspresi Hsp70 secara signifikan. Kuantifikasi DAB hasil perlakuan C3 (pemberian ekstrak *C. vulgaris* dengan dosis 50 µg/mL) seperti terlihat pada Gambar 38.



Gambar 38. Grafik data persentase DAB pengulangan pada perlakuan C3 (pemberian ekstrak *C. vulgaris* dengan dosis 50 µg/mL)

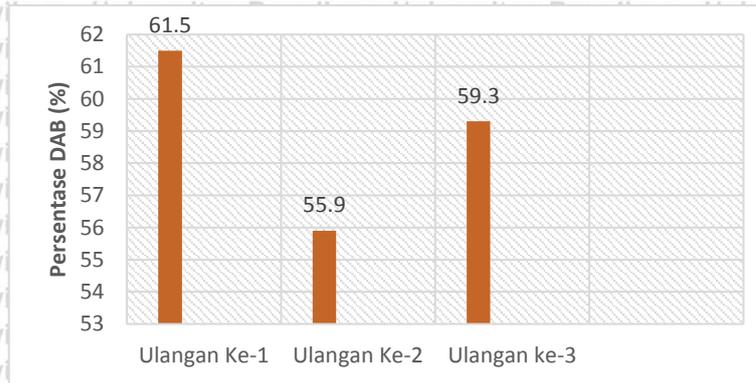
6) Ikan Perlakuan CV1

Ikan perlakuan CV1 merupakan ikan perlakuan pemberian ekstrak *C. vulgaris* dosis 17 µg/mL dan penginfeksi VNN. Hasil imunohistokimia pada organ otak ikan perlakuan CV1 didapatkan nilai persentase rata-rata nilai DAB pada ketiga gambar dibawah (Gambar 39) sebesar 60,0% yang didapatkan dari prosentase gambar 39a sebesar 61,5%, prosentase gambar 39b sebesar 55,9% dan prosentase gambar 39c sebesar 62,6%. Hasil imunohistokimia organ otak ikan kerapu cantang perlakuan CV1 dapat dilihat pada gambar 39 dibawah ini.



Gambar 39. Hasil ImmunoRatio Organ Otak Ikan Kerapu Cantang Perlakuan CV1. Keterangan : (A) ikan CV1 ulangan 1, (B) ikan CV1 ulangan 2, dan (C) ikan CV1 ulangan 3.

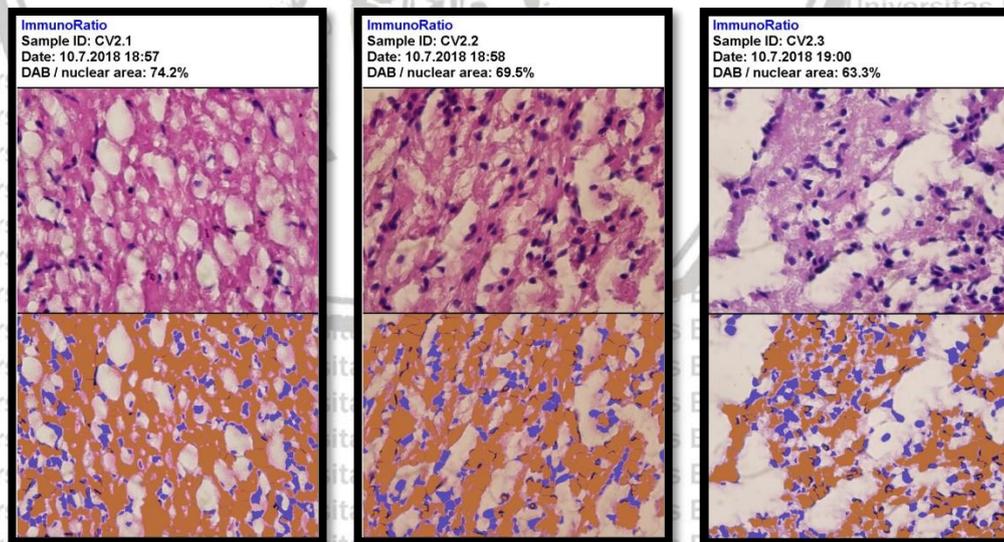
Dari hasil nilai persentase DAB diatas, nilai ini mengalami peningkatan yang cukup banyak jika dibandingkan dengan lima perlakuan sebelumnya yaitu seperti hasil pada perlakuan K+, K-, C1, C2 dan C3. Hal ini dikarenakan adanya penginfeksi VNN pada perlakuan ini yang dapat megaktifkan ekspresi Hsp70. Dan pemberian ekstrak *C. vulgaris* dengan dosis 17 µg/mL dapat lebih meningkatkan ekspresi Hsp70 untuk melakukan perannya sebagai agen yang memiliki sifat sitoproteksi. *Heat shock factor* dapat pula diaktifkan oleh co inducer (Wieten *et al.*, 2007). Salah satu jenis *co-inducer* yang menjadi aktifator HSF adalah ekstrak *C. vulgaris* yang diberikan ke dalam tubuh ikan kerapu cantang yang telah diinfeksi VNN. Pemberian ekstrak *C. vulgaris* dapat mengaktifkan HSF yang akan menginduksi ekspresi Hsp sebagai respon anti-inflamasi. Kuantifikasi DAB hasil perlakuan CV1 (pemberian ekstrak *C. vulgaris* dengan dosis 17 µg/mL dan infeksi VNN) seperti terlihat pada Gambar 40.



Gambar 40. Grafik data pengulangan pada perlakuan CV1 (pemberian ekstrak *C. vulgaris* dengan dosis 17 µg/mL dan infeksi VNN)

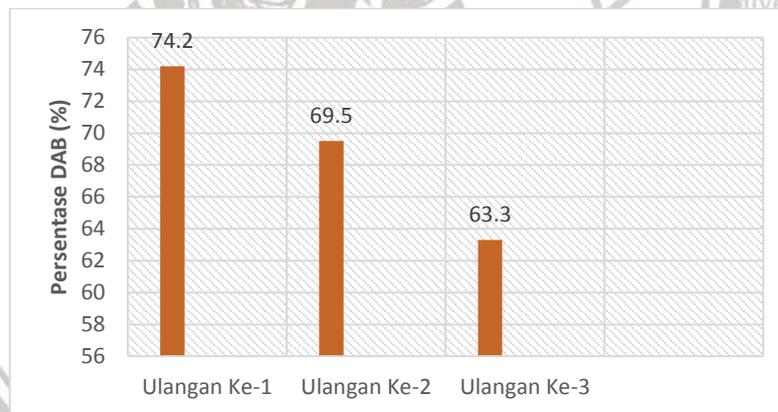
7) Ikan Perlakuan CV2

Ikan perlakuan CV2 merupakan ikan perlakuan pemberian ekstrak *C. vulgaris* dosis 33 µg/mL dan penginfeksi VNN. Hasil imunohistokimia pada organ otak ikan perlakuan CV2 didapatkan nilai persentase rata-rata nilai DAB pada ketiga gambar dibawah (Gambar 41) sebesar 69,0 % yang didapatkan dari prosentase gambar 41a sebesar 74,2 %, presentase gambar 41b sebesar 69,5% dan prosentase gambar 41c sebesar 63,3%.



Gambar 41. Hasil ImmunoRatio Organ Otak Ikan Kerapu Cantang Perlakuan CV2. Keterangan : (A) ikan CV2 ulangan 1, (B) ikan CV2 ulangan 2, dan (C) ikan CV2 ulangan 3.

Dari hasil nilai persentase DAB diatas, nilai ini mengalami peningkatan yang cukup banyak jika dibandingkan dengan enam perlakuan sebelumnya yaitu seperti hasil pada perlakuan K+, K-, C1, C2, C3 serta CV1. Hal ini dikarenakan adanya penginfeksi VNN pada perlakuan ini yang dapat mengaktifkan ekspresi Hsp70. Dan pemberian ekstrak *C. vulgaris* dengan dosis 33 µg/mL dapat lebih meningkatkan ekspresi Hsp70. Jika dibandingkan dengan perlakuan CV1 yang sama sama dilakukan penginfeksi VNN dan pemberian ekstrak *C. vulgaris*, pada perlakuan CV2 ini nilai DAB lebih tinggi, hal ini dimungkinkan bahwa pemberian ekstrak *C. vulgaris* dengan dosis 33 µg/mL lebih baik pengaruhnya dalam peningkatan ekspresi Hsp70 dalam tubuh ikan kerapu cantang. Kuantifikasi DAB hasil perlakuan CV2 (pemberian ekstrak *C. vulgaris* dengan dosis 33 µg/mL dan infeksi VNN) seperti terlihat pada Gambar 42.

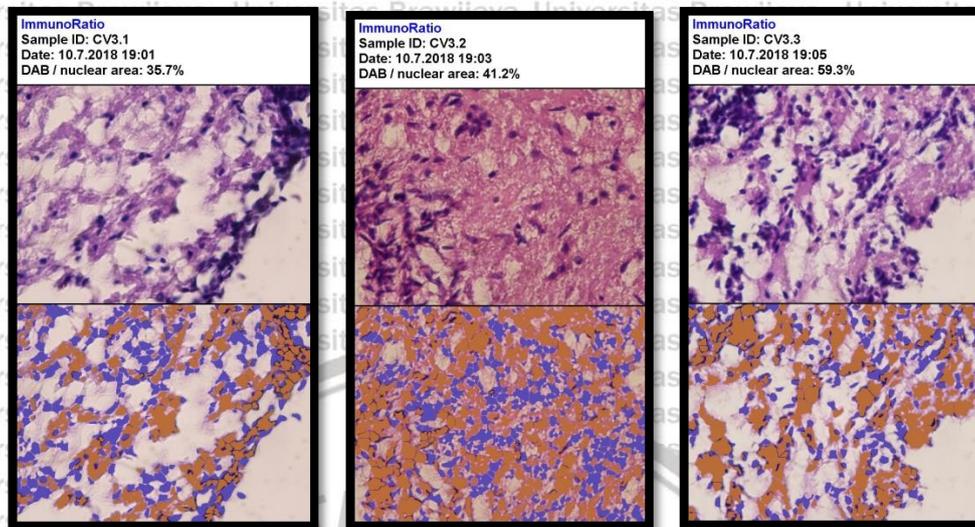


Gambar 42. Grafik data pengulangan pada perlakuan CV2 (pemberian ekstrak *C. vulgaris* dengan dosis 33 µg/mL dan infeksi VNN)

8) Ikan Perlakuan CV3

Ikan perlakuan CV3 merupakan ikan perlakuan pemberian ekstrak *C. vulgaris* dosis 50 µg/mL dan penginfeksi VNN. Hasil imunostokimia pada organ otak ikan perlakuan CV3 didapatkan nilai persentase rata-rata nilai DAB pada ketiga gambar dibawah (Gambar 43) sebesar 45,4 % yang didapatkan dari prosentase gambar 43a sebesar 35,7 %, presentase gambar 43b sebesar 41,2%

dan prosentase gambar 43c sebesar 59,3%. Hasil imunohistokimia organ otak ikan kerapu cantang perlakuan CV3 dapat dilihat pada gambar 43 dibawah ini.

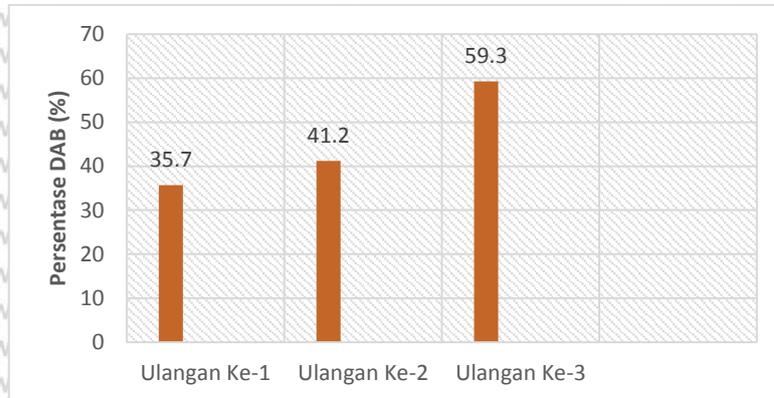


Gambar 43. Hasil ImmunoRatio Organ Otak Ikan Kerapu Cantang Perlakuan CV3. Keterangan : (A) ikan CV3 ulangan 1, (B) ikan CV3 ulangan 2, dan (C) ikan CV3 ulangan 3.

Dari hasil nilai persentase DAB diatas, nilai ini mengalami peningkatan yang jika dibandingkan dengan enam perlakuan sebelumnya yaitu seperti hasil pada perlakuan K+, K-, C1, C2, C3 namun mengalami penurunan jika dibandingkan dengan erlakuan CV1 dan CV2. Hal ini dikarenakan adanya penginfeksi VNN dan pemberian ekstrak *C. vulgaris* pada perlakuan ini yang dapat mengaktifkan ekspresi Hsp70. Namun jika dibandingkan dengan nilai DAB CV1 dan CV2, pada perlakuan ini mengalami penurunan ekspresi Hsp70, hal ini dimungkinkan bahwa penambahan ekstrak *C. vulgaris* dengan dosis 17 µg/mL dan 33 µg/mL lebih baik apabila dibandingkan dengan penambahan dosis 50 µg/ML.

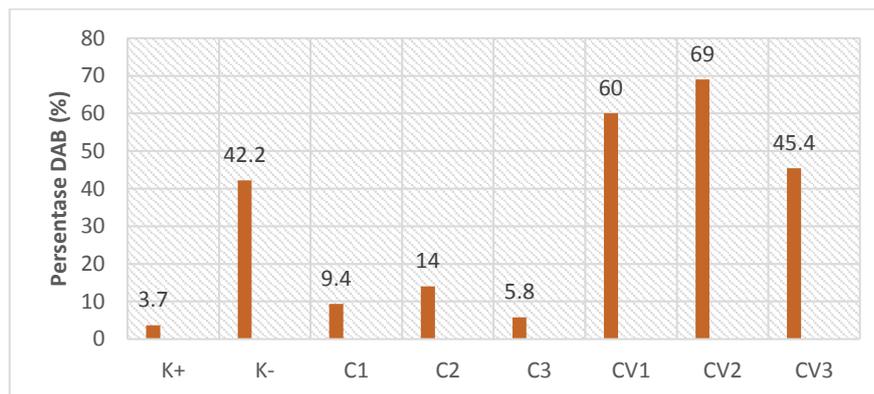
Sehingga dari ke delapan perlakuan yang dilakukan pada penelitian ini didapatkan bahwa perlakuan yang terbaik untuk meningkatkan ekspresi Hsp70 adalah perlakuan CV2 yaitu dengan perlakuan pemberian ekstrak *C. vulgaris* dosis 33 µg/mL dan penginfeksi VNN, Kuantifikasi DAB hasil perlakuan CV3

(pemberian ekstrak *C. vulgaris* dengan dosis 50 µg/mL dan infeksi VNN) seperti terlihat pada Gambar 44.



Gambar 44. Grafik data pengulangan pada perlakuan CV3 (pemberian ekstrak *C. vulgaris* dengan dosis 50 µg/mL dan infeksi VNN)

Dari hasil persentase DAB 8 perlakuan diatas, didapatkan perbedaan dari setiap perlakuan yang dilakukan. Setiap perlakuan yang diberikan memiliki nilai DAB yang berbeda-beda. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *C. vulgaris* berpengaruh terhadap peningkatan ekspresi gen Hsp70. Data rata-rata perubahan ekspresi Hsp70 pada setiap ikan kerapu cantang dapat dilihat pada gambar 45 dibawah ini.



Gambar 45. Grafik data nilai rata-rata perubahan ekspresi Hsp70 pada ikan kerapu cantang. Keterangan = K+ : kontrol positif, K- : kontrol negatif, C1 : perlakuan ekstrak dosis 17 µg/mL, C2 : perlakuan ekstrak dosis 33 µg/mL, C3 : perlakuan ekstrak dosis 50 µg/mL, CV1 : perlakuan ekstrak dosis 17 µg/mL +VNN, CV2 : perlakuan ekstrak dosis 33 µg/mL +VNN, dan CV3 : perlakuan ekstrak dosis 50 µg/mL +VNN.

Jika dilihat pada grafik diatas, hasil rata-rata ekspresi Hsp70 tertinggi yaitu pada perlakuan CV2 yaitu ikan dengan perlakuan penambahan ekstrak *C. vulgaris* dan penginfeksi VNN. Infeksi yang dilakukan oleh VNN memicu terjadinya inflamasi/peradangan pada jaringan ikan. VNN akan memicu aktifnya sel imun untuk melindungi jaringan dan sel pada ikan. Sel-sel dalam tubuh ikan akan mengalami stress yang akan menyebabkan munculnya respon stres dalam bentuk *respon heat shock* (Hsr). Dibawah kondisi stress, Hsp membuat agregasi protein, melipat kembali protein yang rusak dan menurunkan protein yang tidak dapat diperbaiki. Sebagai mediator pro-inflamasi, Hsp dapat melepaskan zat nekrotik dan non-nekrotik ke dalam lingkungan ekstraseluler, dan menghasilkan berbagai respon imun dan inflamasi, termasuk aktivasi efektor sistem kekebalan dan pelepasan sitokin (Yanuhar *et al.*, 2015).

Pemberian ekstrak mikroalga laut *C. vulgaris* dengan dapat menghambat perkembangan virus secara kualitatif dengan mampu menurunkan respon inflamasi jaringan pada ikan kerapu cantang. Senyawa dalam ekstrak *C.vulgaris* berperan sebagai *co-inducer* Hsp yang memiliki kemampuan untuk memblokir adhesi patogen. Senyawa aktif yang dalam ekstrak *Chlorella vulgaris* juga dapat digunakan sebagai antiinflamasi pada kerapu yang terinfeksi VNN ditunjukkan oleh respon ekspresi *heat shock protein* (Hsp). Jika dilihat dari hasil dalam penelitian ini ikan dengan perlakuan penambahan ekstrak mikroalga *C. vulgaris* 33 µg/ml dan VNN memiliki kemampuan meningkatkan ekspresi dari Hsp70 sebagai respon penanda anti-inflamasi.

Sebagai molekul anti-inflamasi, selama infeksi ekspresi *Heat shock protein* 70 (Hsp70) meningkat sehingga memberikan sitoproteksi dengan menghambat komponen jalur sinyal inflamasi, seperti faktor transkripsi NF-κB. Peningkatan kadar Hsp berfungsi untuk merangsang respon inflamasi melalui sejenis *Toll receptor 2* (TLR2)/ TLR 4/CD14 tergantung mekanisme yang mengarah pada

aktivitas NF- κ B, TNF- α , IL1- β dan produksi IL-6. HSR dapat memblokir jalur NF- κ B dengan meningkatkan ekspresi gen I- κ B. Knowlton (2006) menjelaskan bahwa Hsp dapat membangkitkan modulasi kekebalan tubuh dengan menyediakan target regulasi Sel T spesifik Hsp.

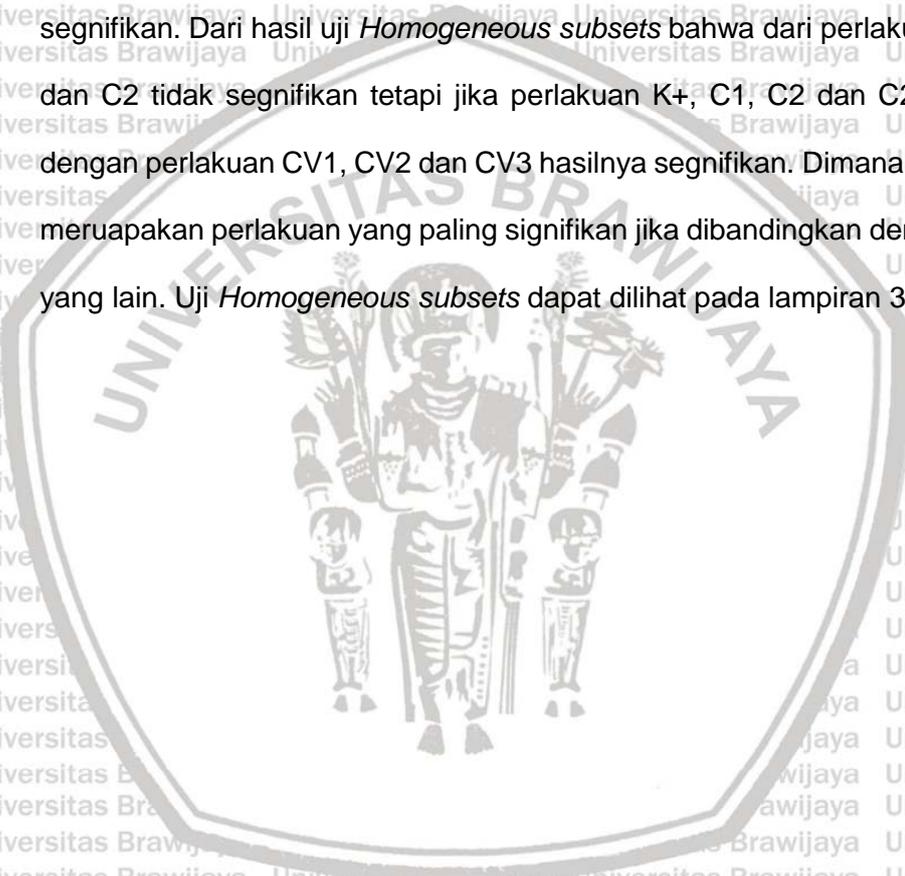
5.11 Analisa Data Hasil Penelitian

Analisa data pada penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) faktorial dengan 8 perlakuan yaitu pertama merupakan ikan kontrol positif, ikan kontrol negatif (pemberian VNN), ikan perlakuan ekstrak kasar *C. vulgaris* dengan dosis 17 μ g/mL (C1), ikan dengan perlakuan ekstrak kasar *C. vulgaris* dengan dosis 33 μ g/mL (C2), ikan dengan perlakuan ekstrak kasar *C. vulgaris* dengan dosis 50 μ g/mL (C3), ikan dengan perlakuan ekstrak kasar *C. vulgaris* dengan dosis 17 μ g/mL dan penginfeksi VNN (CV1), ikan dengan perlakuan ekstrak kasar *C. vulgaris* dengan dosis 33 μ g/mL dan penginfeksi VNN (CV2), serta ikan dengan perlakuan ekstrak kasar *C. vulgaris* dengan dosis 50 μ g/mL dan penginfeksi VNN (CV3), dengan 3 kali pengulangan setiap perlakuannya. Data yang digunakan dalam penelitian ini adalah data persentase DAB Hsp70 pada setiap perlakuan. Setelah didapatkan data tersebut, selanjutnya data dianalisa dengan menggunakan cara statistik yaitu analisa keragaman (ANOVA), dengan tujuan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan pemberian perlakuan. Setelah didapatkan data hasil penelitian, selanjutnya dilakukan analisa sidik ragam prosentase DAB hsp70 pada setiap perlakuan. Tabel analisa sidik ragam dapat dilihat dibawah ini. Sedangkan perhitungan analisa sidik ragam (ANOVA) dapat dilihat pada lampiran 3.

Berdasarkan analisa sidik ragam, diperoleh hasil $F_{hitung} > F_{tabel}$. Ini menunjukkan bahwa hasil pemberian perlakuan yang berbeda berpengaruh berbeda nyata dengan tingkat ekspresi Hsp70. Hal ini menandakan adanya

pengaruh pemberian perlakuan berbeda terhadap jumlah ekspresi gen Hsp70 yang ditunjukkan oleh besarnya prosentase DAB. Hal ini karena pemberian perlakuan yang berbeda sehingga jumlah ekspresi gen Hsp70 juga berbeda.

Setelah didapatkan hasil analisa sidik ragam bahwa pemberian perlakuan berbeda nyata dengan hasil prosentase Hsp70, selanjutnya dilakukan uji *Homogeneous subsets*. Uji *Homogeneous subsets* perlu dilakukan untuk mengetahui perlakuan mana yang mempunyai perbedaan yang tidak terlalu signifikan. Dari hasil uji *Homogeneous subsets* bahwa dari perlakuan K+, C1, C2 dan C2 tidak signifikan tetapi jika perlakuan K+, C1, C2 dan C2 dibandingkan dengan perlakuan CV1, CV2 dan CV3 hasilnya signifikan. Dimana perlakuan CV3 merupakan perlakuan yang paling signifikan jika dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Uji *Homogeneous subsets* dapat dilihat pada lampiran 3.



6. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa kandungan bioaktif yang terdapat dalam ekstrak kasar *C. vulgaris* yaitu melalui uji fitokimia senyawa dalam ekstrak *C. vulgaris* positif mengandung terpenoid, tanin dan alkaloid. Setelah dilakukan uji lebih lanjut melalui analisis Uv-Vis dan FTIR, senyawa yang dominan dalam ekstrak kasar *C. vulgaris* adalah senyawa dari golongan terpenoid dengan panjang gelombang 207.0 nm. Hasil uji in-vivo dari ekstrak *C. vulgaris* yang dilakukan pada ikan kerapu cantang didapatkan hasil bahwa pemberian ekstrak *C. vulgaris* dengan dosis 33 µg/mL merupakan dosis optimal dalam meningkatkan ekspresi dari Hsp70 dengan penginfeksi VNN. Sehingga ekstrak *C. vulgaris* dapat dijadikan sebagai inducer Hsp70 sebagai agen anti-inflamasi akibat infeksi VNN.

6.2 Saran

Dari penelitian ini disarankan perlunya dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui secara jelas kandung senyawa murni yang mampu meningkatkan ekspresi Hsp70 sebagai agen anti-inflamasi akibat infeksi *viral nervous necrosis* serta mekanisme senyawa terpenoid terhadap peningkatan ekspresi Hsp70 perlu dikaji lebih lanjut.

DAFTAR PUSTAKA

Adhoni, S.A., S.C. Thimmappa, B.B. Kaliwal. 2016. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of *Chorella vulgaris* isolated from Unkal Lake. *Journal of Coastal Life Medicine*, 4(5): 368-373.

Ahmed, A.U. 2011. An overview of inflammation: mechanism and consequences. *Front. Biol.* 6(4): 274–281.

Akbar S dan Sudaryanto. 2001. Pembenihan dan Pembesaran Kerapu Bebek. Jakarta : Penebar Swadaya.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4): 783–801

Aksara, R., W. J. A. Musa, dan L. Alio. 2013. Identifikasi Senyawa Alkaloid Dari Ekstrak Metanol Kulit Batang Mangga (*Mangifera indica* L). *J. Entropi*, vol. 8, no. 1, pp. 514–519,

Alcorn, S. V. Ostland, S. LaPatra, S. Harbell, C. Friedman, J. Winton. 2008. Measurement of the Innate Cellular Immune Responses of Hybrid Striped Bass and Rainbow Trout. *Regional Aquaculture Center (WRAC)*

Amiruddin H., K. Ridhlo.D. N. Robianta. 2012. Manajemen Induk Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) Sebagai Upaya Optimalisasi Produksi Telur Berkualitas. Balai Budidaya Laut Ambon.

Antoro, S., E. Widiastuti dan P. Hartono. 1998. Biologi Kerapu Macan. Dalam: Balai Budidaya Laut Kampung (Eds). Pembenihan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). Departemen Pertanian. Direktorat Jendral Perikanan. Balai Budidaya Laut Lampung. Lampung. Hal 4-18.

Arimoto, M., K. Mori, T. nakai, K. Muroga, I. Furusawa. 1993. Pathogenicity of the Causative Agent of Viral Nerous Necrosis disease in Striped Jack, *Pseudocaranx dentex*. *J. Fish Disease*. 16: 461-469.

Ashley, N.T., Z.M. Weil, R.J. Nelson. 2012. Inflammation : Mechanisms, costs and natural variation. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 43:385–406.

Astuti, M.D., E. M. Kuntorini, dan F. E. P. Wisuda. 2014. Isolasi Dan Identifikasi Terpenoid dari Fraksi n-Butanol Herba Lampasau (*Diplazium esculentum* Swartz). *Valensi*, vol. 4, no. 1, pp. 20–24

Azov, Y. 1982. Effect of pH on inorganic carbon uptake in algal cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 1300–1306.

Barazzouk, S., Bekale, L., dan Hotchandani, S. 2012. Enhanced Photostability of Chlorophyll-a using Gold Nanoparticles as an Efficient Photoprotector. *J. Material Chemistry*. 22:25316-25324

Becerra G, Menolasina S, Salvador A. 1999. Supercritical Fluid Extraction and Supercritical Fluid Chromatography of Vitamin E in Pharmaceutical Preparations. *J High Res Chromatog* 22:300-2.

Becker, E.W. 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol. Adv*, 25, 207–210.

Biller-Takahashi, J.D dan Elisabeth C.U. 2014. Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 86 (3) : 1483-1495

BKIPMSTATISTIK.2017. http://bkipm.kkp.go.id/bkipmnew/?r=stats/#_ops_volume/E/Ekor/m/0/2016/0/nm_umum.

Blinova, L., Alica B., Kristina G. 2015. Cultivation Of Microalgae (*Chlorella vulgaris*) For Biodiesel Production (Research Papers). Slovak University Of Technology No. 36 , 23.

Blum, J. S., P. A. Wearsch, P. Cresswell. 2013. Pathways of antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* 31: 443–473.

Bock, C., Lothar K., Thomas P. 2011. Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Fottea* 11(2): 293–312

Bols, N.C., John L.B., Rosemarie C.G., Lucila E.J.L. 2001. Ecotoxicology an innate immunity in fish. *Developmental and Comparative Immunology* 25, 853-873.

Brody, M. dan Vatter, A.E. 1959. Observations on cellular structures of *Porphyridium cruentum*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 5, 289–294.

Bulanin, U. 2003. Perkembangan Larva Ikan Kerapu Bebek, *Cromileptes altivelis*, Sampai Umur 50 Hari. *Mangrove Dan Pesisir* 3 (3)

Cahyadi, H., Endah, .T, Johan, L. 2004. Peranan *Heat Shock Protein* pada Patogenesis Penyakit Infeksi dan Penyakit Autoimun. *JKM*. Vol. 3, No.2.

Cahyaningsih, U Dan A.T. Wijatagati. 1999. Pengaruh Infeksi *Eimeria Tenella* Galur Precocious Dan Galur Tetua Terhadap Gambaran Darah Pada Ayam Petelur. Seminarsional Peternakan Dan Veteriner.

Cazzonelli, C.I. 2011. Carotenoids in nature: Insights from plants and beyond. *Func. Plant Biol.* 38, 833–847.

Cha KH, Koo SY, Lee DU. 2008. Antiproliferative Effects Of Carotenoids Extracted From *Chlorella ellipsoidea* and *Chlorella vulgaris* On Human Colon Cancer Cells. *J Agric Food Chem* (56):10521-6.

Chakrabarti, S., Forough J., and Jianping W. 2014. Food-Derived Bioactive Peptides on Inflammation and Oxidative Stress. *BioMed Research International* Volume 11.

Ch'ng, C.L., dan Senoo, S., 2008. Egg and larval development of a new hybrid grouper, tiger grouper *Epinephelus fuscoguttatus* × giant grouper *E. lanceolatus*. *Aquacult. Sci.* 56, 505–515.

Christaki E, Bonos E, Florou-Paneri P. 2015. Innovative microalgae pigments as functional ingredients in nutrition. In: Kim SK (ed.) *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. Elsevier Academic Press, London, UK, pp: 233-243.

Choi, S.K.; Park, Y.S.; Choi, D.K.; Chang, H.I. 2008. Effects of astaxanthin on the production of NO and the expression of COX-2 and iNOS in LPS-simulated BV2 microglial cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 1990–1996.

Chua, T. E. dan Teng, S. K. 1978. Effects of feeding frequency on the growth of young estuary grouper, *Epinephelus tauvina* Forskal, culture in floating net cages. *Aquaculture* (14) p.31 – 47.

Cohen-Bazire, G., & Bryant, D.A. 1982. Phy-cobilisomes: composition and structure. *The biology of Cyano-bacteria*, (pp 143–190). Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Converti, A., Casazza, A.A., Ortiz, E.Y., Perego, P., del Borghi, M. 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chem. Eng. Process.* 48, 1146–1151.

Csiszar, A., M.Wang, E. G. Lakatta, and Z. Ungvari. 2008. Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF- κ B. *Journal of Applied Physiology*, vol. 105, no.4, pp. 1333–1341.

Dahoklory, Nicodemus, Uun Yanuhar, Sukoso, and Sofi Permana. 2014. The Profile of Gill Protein Expression of Humpback Grouper (*Cromileptes Altivelis*) Injected with Per-Cp of Halimeda *Opuntia* and Viral Nervous Necrosis. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 8(10) (July): 145–50

Darwasito, S. 2002. Strategi Reproduksi Pada Ikan Kerapu (*Epinephelus* sp.). Program Pasca Sarjana/S3 Institut pertanian Bogor. Bogor : 10 hlm.

Deane, E.E., Woo, N.Y.S. 2004. Differential gene expression associated with euryhalinity in sea bream (*Sparus sarba*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R1054-R1063

Demekke A., dan A.Tassew. 2016. Heat Shock Protein and their Significance in Fish Health. Research & Reviews. *Journal of Veterinary Sciences* Vol 2

Dirjen Perikanan Budidaya KKP. 2016. p 176

Djamali, A., Mayunar, K.A. Aziz, M. Boer, J. widodo, A. Ghofar. 2001. Perikanan Kerapu di Perairan Indonesia. Institut Pertanian Bogor. Bogor : 75 hlm.

Dong C.W., Zhang Y.B., Zhang Q.Y., Gui J.F. 2006. Differential expression of three Hsp 40 genes in the flounder *Paralichthys olivaceus* in response to virus infection and heat shock. *Fish and Shellfish Immunology* 21, 146–158.

Dugencie, S. K., Arda, N and A. Canda. 2003. Some Medicinal Plants as Immunostimulant for fish. *Journal of ethnopharmacology*. **88** : 99-106.

Effendie, M. I. 1978. Biologi perikanan. Bagian I. Study natural history. Fakultas Perikanan Institut Pertanian Bogor. Bogor : 97 hlm.

Effendi, Z. 2003. Peranan Leukosit Sebagai Anti Inflamasi Alergik Dalam Tubuh. Fakultas Kedokteran, Universitas Sumatera Utara.

Ellis A.E. 2001. Immunology of fish. In: Fish Pathology, 3rd edn (ed. by R.J. Roberts), pp. 55–132. W. B. Saunders, London, UK.

Esteban, M. A., Cuesta, A., Betuna, J and J. Meseguer. 2001. *Immunomodulatory effects oddietary intake of chitin on Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L) Innate Immunesystem*. *J. Fish and Shellfish Immunology*. **11** : 303-313.

Fajriani, Nur N. 2011. Polimorfisme Ikan Kerapu Macan (*Ephinephelus fuscoguttatus* forsskal) yang Tahan Bakteri *Vibrio alginolyticus* dan Toleran Salinitas Rendah Serta Salinitas Tinggi. Universitas Hasanudin. Makassar.

Falaise, C. C. francois, M. Travers, B. Morga, J. haure, R. Tremblay, F. Turcotte, P. Pasetto, R. gasteineau, Y. Hardivillier, V. Leignel, J. Mouget. 2016. Antimicrobial Compounds from Eukaryotic Microalgae against Human Pathogens and Diseases in Aquaculture. *Mar. Drugs* 14, 159.

Fernandez-Sevilla, JM, Fernandez FG, Grima EM. 2012. Obtaining Lutein-Rich Extract From Microalgal Biomass At Preparative Scale. *Methods Mol Biol* (892) :307-14.

Firdaus, R.F., Leong-Seng L., Gunzo K., Rossita S. 2016. Assessment on the acceptability of hybrid grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂ to soybean meal-based diets. *AAFL Bioflux*, 9 (2).

Fithriani, D, S.Amini, S. Melanie, R. Susilowati. 2015. Uji Fitokimia, Kandungan Total Fenol Dan Aktivitas Antioksidan Mikroalga *Spirulina* sp., *Chlorella* sp., dan *Nannochloropsis* sp. *JPB Kelautan dan Perikanan* 10 (2) : 101–109.

Fogg, G.E, Thake B. 1987. Algal Cultures and Phytoplankton Ecology. Third Edition. London: *The University of Wisconsin Press*.

Gelse, K., E. Poßchl, T. Aigner. 2003. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55 : 1531–1546

Gino, L. V., Rijoly F., Khouw A. S., Manuputty G. D., Pattikawa J. A. 2017. The Diversity of Grouper (Epinephelinae) in Ambon Island, Maluku, Indonesia. *Occasional Papers* No.58.

Ginting M. K. 2012. Validasi Metode LC-MS/MS Untuk Penentuan Senyawa Asam Trans, Trans-Mukonat, Asam Hippurat, Asam 2-Metil Hippurat, Asam 3-Metil Hippurat, Asam 4-Metil Hippurat Dalam Urin Sebagai Biomarker Paparan Benzena, Toluena, Dan Xilena. FMIPA UI 2012

Goldman, J.C. 1973. Letter: Carbon dioxide and pH: Effect on species succession of algae. *Science* 182, 306–307.

Goldman, J.C., Azov, Y., Riley, C.B., Dennett, M.R. 1982. The effect of pH in intensive microalgal cultures. I. biomass regulation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 57, 1–13.

Gorgieva, S dan Vanja K. 2011. Collagen- vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility: Review and Perspectives. University of Maribor: Slovenia

Görs M, Schumann R, Hepperle D, Karsten U. 2009. Quality analysis of commercial *Chlorella* products used as dietary supplement in human nutrition. *J Appl Phycol* (22):265–76.

Ghosh, S, May MJ, Kopp EB. 1998. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16:225–60

Gouveia, L. V. Veloso, A. Reis, H. Fernandes, J. Novais, J. Empis. 1996. Evolution of Pigment Composition in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology* 57 : 157-163.

Gouveia, L.; Choubert, G.; Rema, P. 1998. Use of *Chlorella vulgaris* as a carotenoid source for rainbow trout: Effect of dietary lipid content on pigmentation, digestibility and retention in the muscle tissue. *Aquac. Int.* 279, 269–279.

Granado F, Olmedilla B, Blanco I. 2003. Nutritional and Clinical Relevance of Lutein In Human Health. *Brit J Nutr* (90) :487-502.

Griffiths, D.A dan D.J. Griffiths. 1969. The fine structure of autotrophic and heterotrophic cells of *Chlorella vulgaris* (Emerson strain). *Plant & Cell Physiol.*, 10, 11-19

Guedes, A.C., Amaro, H.M., Malcata, F.X. 2011. Microalgae as sources of carotenoids. *Mar. Drugs* 9, 625–64.

Hallare AV, Köhler HR, Triebkorn R. 2004. Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO. *Chemosphere*; 56:659-666.

Hartanti, N. 2008. Pencemaran Organik Limbah Tahu di Sungai Desa Kalisari Kecamatan Ajibarang Kabupaten Banyumas. *CERMIN*. Edisi 042. Hlm 4.

Haryani, E. dan M. Sukmasari. 2005. Teknik Pemisahan Komponen Ekstrak Purwoceng Secara Kromatografi Lapis Tipis. *Buletin Teknik Pertanian* 10 (2).

Hasdiana, P. Dewi, Y. Peristiawati dan S. Iman. 2014. Imunologi, Diagnosa dan Teknik Biologi Molekuler. Muha Medika. Yogyakarta

Healey, FP. 1973. The inorganic nutrition of algae from an ecological viewpoint. *eRe Critical Rev. Microbial*. 3: 69-113.

Mukti, K.W. 2012. Analisis Spektroskopi UV-Vis. Jurusan Fiksika, FMIPA Universitas Sebelas Maret : Surakarta.

Hulmes, D.J. dan Miller, A.1981. Molecular packing in collagen. *Nature* 293 234–239.

Indah, T. B. S, I. K, and Soehardjo. 2006. Peran Heat Shock Protein (Hsp) Terhadap Penyakit Rongga Mulut. *IJD*, vol. 14, 2006.

Iqbal, M. dan Zafar, S. 1993. Effects of photon flux density, CO₂, aeration rate, and inoculum density on growth and extracellular polysaccharide production by *Porphyridium cruentum*. *Folia Microbiol*. 38, 509–514.

Ismi, S., Yasmina N.A dan Daniar K. 2014. Peningkatan Produksi dan Kualitas Benih Kerapu dengan Program Hybridisasi. *Jurnal Oseanologi Indonesia* Vol.I (1)

Janeway, CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. 2005. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. New York: Garland Sci.

Juneja, A. Ruben M.C., Ganti S.M. 2013. Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review. *Energies* 6, 4607-4638.

Kang, So Young, Seok Ryel Kim, and Myung-joo Oh. 2008. In Vitro Antiviral Activities of Korean Marine Algae Extracts against Fish Pathogenic Infectious Hematopoietic Necrosis Virus and Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *Food Science and Biotechnology* 17 (5): 1074–78.

Kaufmann, S. H. E. 1990. Heat shock proteins and the immune response. *Immunol. Today* 11:129–136.

Khotimah, K., Darius, dan B. B. Sasmito. 2013. Uji aktifitas senyawa aktif alga coklat (*Sargassum fillipendulla*) sebagai antioksidan pada minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*). *Thpi Student J.*, vol. 1, no. 1, pp. 10–20.

Kim Sung-Sam; Rahimnejad, Samad; Kim Kang-Woong; Lee Bong-Joo; Lee Kyeong-Jun. 2013. Effects of Dietary Supplementation of Spirulina and Quercetin on Growth, Innate Immune Responses, Disease Resistance Against *Edwardsiella Tarda*, and Dietary Antioxidant Capacity in the Juvenile Olive Flounder *Paralichthys Olivaceus*. *Fisheries and Aquatic Sciences* 16 (1): 7–14. doi:10.5657/FAS.2013.0007.

Kitts, D. D., Weiler, K. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9: 1309–1323.

Knowlton, A.A. 2006. NF κ B, heat shock proteins, HSF-1, and inflammation. *Cardiovascular Research* 69, 7 – 8

Koesharyani, I., Roza, D., Mahardika, K., Johnny, F., Zafran, Yuasa, K. 2001. Manual for Fish Disease Diagnosis–II. Marine Fish and Crustacean Diseases in Indonesia. *Gondol Research Institute for Fisheries of Indonesia and Japan International Cooperation Agency*, Indonesia. 49 p.

Keosharyani, I., dan H.Novita. 2006. Diagnosa “Nested reverse Transcriptase-PCR Untuk Viral Nervous Necrosis Pada Benih Ikan Kerapu Bebek, *Cromileptes altivelis*. *Jurnal Riset Akuakultur* 1(3).

Konho, H., M.Duray and Sunyoto. 1990. A fiels Guide to Groupers of Southeast Asia. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perikanan PHP/KAN/PT. No.14. Jakarta: 26 hlm.

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

Kordi, M. dan A. B. Tanjung. 2005. *Pengelolaan Kualitas Air dalam Budidaya Perairan*. Jakarta : Rineka Cipta.

Kubilay. A dan G. Ulukoy. 2002. The Effects of Acute Stress on Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turkish Journal of Zoology* (26): 249-254.

Kum, C. dan Selim S. 2011. The Immune System Drugs in Fish: Immune Function, Immunoassay, Drugs. University of Adnan Menderes : Turkey

Langkosono. 2006, Laju Pertumbuhan Ikan Kerapu (Serranidae) Dan Kondisi Perairan Teluk Kodek, Des A Malaka Lombok Barat. *Berita Biologi*, VIII (1).

Lavens, P. dan Sorgeloos P. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. *FAO Fisheries Technical Paper*. No. 361. 295 p., ISBN 92-5-103934-8.

Lin, C., J.H. Lin, M. Chen, H. Yang. 2007. An oral nervous necrosis virus vaccine that induces protective immunity in larvae of grouper (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture* 268. 265–273.

Lordan S, Ross RP, Stanton C. 2011. Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Mar Drugs* 9:1056-100.

Lynn, A.K., I.V. Yannas, W. Bonfield. 2004. Antigenicity and Immunogenicity of Collagen. *Wiley InterScience*

Maeno, Y., de la Peña, L.D. and Cruz-Lacierda, E.R. 2002. Nodavirus infection in hatchery reared orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*: First record of viral nervous necrosis (VNN) in the Philippines. *Fish Pathol.* 37: 87-89.

Magnadóttir, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology*, (20) pp. 137-151

Magnadóttir, B. 2010. Immunological control of fish diseases. *Marine Biotechnology*, (12), pp. 361-379.

Maharani, T., D. Sukandar, dan S. Hermanto. 2006. Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi dari Ekstrak Etil Asetat Daun Namnam (*Cynometra Cauliflora* L.) yang Memiliki Aktivitas Antibakteri. *Jurnal Penelitian dan Pengembangan Ilmu Kimia*, 2(1), 55-62

Mahardika, K., I. Mastuti, dan Zafran. 2007. Pencegahan Infeksi Viral Nervous Necrosis (Vnn) Penyebab Black Body Disease Pada Kerapu Hibrid Dengan Vaksin Sederhana. Seminar Nasional Kelautan XII.

Malangngi, L.P., M. S. Sangi, dan J. J. E. Paendong. 2012. Penentuan Kandungan Tanin dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Buah Alpukat (*Persea americana* Mill). *J. Mipa Unsrat Online*, vol. 1, no. 1, pp. 5-10.

Markou, G., Iconomou, D., Sotiroudis, T., Israilides, C., Muylaert, K. 2015. Exploration of using stripped ammonia and ash from poultry litter for the cultivation of the cyanobacterium *Arthrospira platensis* and the green microalga *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.*, 196, 459-468.

Martono, B. dan T. Setiyono. 2014. Skrining fitokimia enam genotipe the. *J. Tird*, vol. 1, no. 2, pp. 63-68.

Maruyama I, Nakao T, Shigeno I, Ando Y, Hirayama K. 1997. Application of unicellular algae *Chlorella vulgaris* for the mass-culture of marine rotifer *Brachionus*. *Hydrobiologia* 358:133-8.

Marzuki. 1983. *Metodologi Research*. Yogyakarta: Fak. Ekonomi, UII.

Moller, G. 1988. Antigen processing. *Immunol. Rev.* 106, 1-223.

Mukti, K. 2012. Analisis Spektroskopi Uv-Vis Penentuan Konsentrasi Permanganat (KMnO₄). *Jurusan Fisika, FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta*

Nagendraprabhu, P., Sudhandiran, G. 2011. Astaxanthin inhibits tumor invasion by decreasing extracellular matrix production and induces apoptosis in experimental rat colon carcinogenesis by modulating the expressions of ERK-2, NFkB and COX-2. *Investig. New Drugs*, 29, 207–224.

Nair, P., D. Amsen, and J. M. Blander. 2011. Co-ordination of incoming and outgoing traffic in antigen-presenting cells by pattern recognition receptors and T cells. *Traffic* 12: 1669–1676.

Nakai T. 2002. Management of fishery Resources for Groupers (*Serranidae*) in Okinawa, Southern Japan. Departement of Global Agricultural Sciences, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, the University of Tokyo, Bukyo, Tokyo, Japan; 113 – 8657.

Nakai, T., K. Mori, T. Sugaya, T. Nishioka, K. Mushiake, H. Yamashita. 2009. Current Knowledge on Viral Nervous Necrosis (VNN) and its Causative Betanodaviruses. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh* 61(3).

Nakanishi, T., Yasuhiro S., Yuta M. 2015. T Cells in Fish. *Biology*, 4, 640-663.

Nambiar, S., V.C. Haragannavar., D. Augustine. 2016. Immunohistochemistry: A Brief Review. *Journal of Dental & Oro-facial Research* Vol 12

Nemcova, Y dan Tomas K. 2000. Cell wall development, microfibril and pyrenoid structure in type strains of *Chlorella vulgaris*, *C. kessleri*, *C sorokiniana* compared with *C luteoviridis* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Algological Studies* 100, 95-105

Nielsen, E.S. 1975. Marine Photosynthesis: With Special Emphasis on the Ecological Aspects. *Elsevier: Amsterdam, The Netherlands*; (13).

Noor, N. Md., Simon K.D, Zaidi C.C. Mazlan A.G. 2018. Effects of Salinities and Diets on Growth of Juvenile Hybrid Grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* × *E. lanceolattus*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 18: 1045-1051.

Novisa E., Tarsim., dan Harpeni E. 2015. Pengaruh Jintan Hitam (*Nigella Sativa*) Terhadap Histopatologi Organ Kakap Putih (*Lates Calcarifer*) Yang Terinfeksi *Viral Nervous Necrosis* Secara Buatan. *e-Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan*, 3(2):ISSN 2302-3600.

Ohno, S., Mitsuo T., Toshiyuki F., Shuhei U., Hirofumi K. And Naofumi N. 2002. Role of Stromal Collagen In Immunomodulation And Prognosis of Advanced Gastric Carcinoma. *Int. J. Cancer*: 97, 770–774.

Panahi Y, Pishgoo B, Jalalian HR, Mohammadi E, Taghipour HR, Sahebkar A. 2012. Investigation of the effects of *Chlorella vulgaris* as an adjunctive therapy for dyslipidemia: Results of a randomised open-label clinical trial. *Nutr Diet.*, 69:13-9.

Park H, Ahn IY, Lee HE.2007. Expression of Hsp70 in the thermally stressed Antarctic clam *Laternula elliptica*. *Cell Stress & Chaperons*; 12:275-282.

Patel, A., Sandhya, M., Pawar, R., Ghosh, P.K. 2005. Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein Expression and Purification*, 40 (2), 248–255.

Polla, BS, Hiltrud S., Salomé K., Isabelle M., Muriel R. J.1995. Differential induction of stress proteins and functional effects of heat shock in human phagocyte. *Inflammation* 19:368–378.

Prayogo, I., dan Isfanji, W. 2014. Teknik Pemeliharaan Larva Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus lanceolatus*). *Jurnal Ilmu Perikanan* Vol V (1).

Purnamawati, F.S., Tri R.S., Munifatul I. 2013. Pertumbuhan *Chlorella Vulgaris* Beijerinck Dalam Medium Yang Mengandung Logam Berat Cd Dan Pb Skala Laboratorium. *Seminar Nasional Biologi*

Purnomo, D., Sugiharto, dan Isroli.2016. Total leukosit dan diferensial leukosit darah ayam broiler akibat penggunaan tepung onggok fermentasi *rhizopus oryzae* pada ransum. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan* 25 (3): 59 - 68

Purwakusumah, E.D, Mohamad R.,Utami D.S. , Waras N., Muhammad A.Z.A. 2014. Identifikasi Dan Autentikasi Jahe Merah Menggunakan Kombinasi Spektroskopi FTIR dan Kemometrik. *AGRITECH*, 34 (1)

Putri, D. I. L., Agus T., Sukandar. 2013. Tingkah Laku Pemijahan, Pembenuhan, Pembesaran Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) Di Balai Budidaya Air Payau Situbondo. *Pspk Student Journal*, Vol. 1 (1) Pp 11-15.

Putri, R.R., U. Yanuhar, 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). *MSPi Student Journal*, Vol. I No. 1 pp 1-10.

Pyo, Y. H., Y. J. Jin, and J. Y. Hwang. 2014. Comparison of the effects of blending and juicing on the phytochemicals contents and antioxidant capacity of typical Korean kernel fruit juices. *Prev. Nutr. Food Sci.*, vol. 19, no. 2, pp. 108–114

Raghavan, G., Haridevi, C.K., dan Gopinathan, CP. 2008. Growth and proximate composition of the *Chaetoceros calcitrans f. pumilus* under different temperature, salinity, and carbon dioxide levels. *Aqua.Res.*, 39 : 1053-1058.

Rahayu. 2009. Monitoring Air di Daerah Aliran Sungai. World Argoforestry Centre. Hlm 38.

Raven, J.A. dan Geider, R.J. 1988. Temperature and algal growth. *New Phytol.* 110, 441–461.

Regista, Ambeng, Magdalena L. Muh. R.U. 2017. Pengaruh Pemberian Vermikompos Cair *Lumbricus rubellus* Hoffmeister Pada Pertumbuhan *Chlorella* sp. *Jurnal Biologi Makassar*, 2(1):1-8.

Risamasu, F.J.L. 2008. Inovasi Teknologi Penangkapan Ikan Karang dengan Bubu Dasar Berumpon. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 21 hlm.

Romay, Ch., González, R., Ledón, N., Ramirez, D., Rimbau, V. 2003. C-Phycocyanin: A Bili-protein with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects. *Current Protein and Peptide Science*, 4, 207-16.

Romo, M.R., Dayana P., Camila C. F. 2015. Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology*, 148, 125-139.

Rotatore, C. dan Colman, B. 1991. The acquisition and accumulation of inorganic carbon by the unicellular green alga *Chlorella ellipsoidea*. *Plant Cell Environ.* 14, 377-382.

Roza, D., F. Johnny, Trijdoko. 2006. Peningkatan respon Imn non-Spesifik benih Kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* dengan imunostimulan dan bakteri terhadap infeksi viral Nervous necrosis (VNN). *J. Fish Sci.* VII (1): 25-35.

Safafar, H. Patrick U.N., Anita L., Susan L.H., Charlotte, J. 2016. Enhancement of Protein and Pigment Content in Two *Chlorella* Species Cultivated on Industrial Process Water. *Journal of Marine Science and Engineering* 4, 84.

Safi C., Bachar Z., Othmane M., Pierre-Yves P., Carlos V. 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 35,265-278.

Sajeesh, T dan Parimelazhagan T. 2014. Analgesic, Anti-Inflammatory, and GC-MS Studies on *Castanospermum australe* A. Cunn. & C. Fraser ex Hook. *The Scientific World Journal*, Article ID 587807, 9 pages.

Salmin. 2005. Oksigen Terlarut (DO) dan Kebutuhan Oksigen Biologi (BOD) Sebagai Salah Satu Indikator untuk Menentukan Kualitas Perairan. ISSN 30 (30).

Sánchez, A. dan Vázquez, A. 2017. Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety* 1, 29-46

Sani, R.N., F.C. Nisa, R.D. Andriani, J.M. Maligan. 2014. Analisis Rendemen Dan Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Mikroalga Laut *Tetraselmis chunii*. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* 2 (2) p.121-126.

Santos, C.F., V.T Sakai, M.A.A.M. Machado, D.N. Schippers, A.S. Greene. 2004. Reverse Transcription And Polymerase Chain Reaction: Principles And Applications In Dentistry. *J Appl Oral Sci* 12(1): 1-11

Saparuddin, A. Ridwan, Z. Arham. 2017. Efektivitas Ekstrak Daun *Macaranga tanarius* Dalam Menginaktifasi Viral Nervous Necrosis Ikan Kerapu Tikus. *Biowallacea*, vol 4(1), 519-526.

Sapri, A. Fitriani, R.Nurulita. 2104. Pengaruh Ukuran Serbuk Simplisia Terhadap Rendemen Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Dengan Metode Maserasi. *Prosiding Seminar Nasional Kimia* ISBN: 978-602-19421-0-9.

Sari, P. P. W.S.Rita, N.M. Puspita. 2015. Identifikasi Dan Uji Aktivitas Senyawa Tanin Dari Ekstrak Daun Trembesi (*Samanea saman* (Jacq.) Merr) Sebagai Antibakteri *Escherichia coli* (*E. coli*). *J. Kim.*, vol. 9, no. 1, pp. 27-34

Segal B.H., Wang X.Y., Dennis C.G. 2006. Heat shock proteins as vaccine adjuvants in infections and cancer. *Drug Discovery Today* 11, 534-540.

Sekaran, U. 2006. Metodologi Penelitian Untuk Bisnis. Jakarta : Salemba Empat.

Sen B, Alp MT, dan Kocer MAT. 2005. Studies on growth of marine microalgae in batch culture: II. *Isochrysis galbana* (haptophyta). *Asian Journal of Plant Sciences*. 4(6): 639-641.

Senja, R.Y., E. Issusilaningyas, A.K. Nugroho, E.P. Setyowati. 2014. The Comparison Of Extraction Method And Solvent Variation On Yield And Antioxidant Activity Of *Brassica oleracea* L. var. *capitata f. rubra* Extract. *Traditional Medicine Journal*, 19(1),p 43-48.

Setiawan,A., E.Suryani, dan Wiharto. 2014. Segmentasi Citra Sel Darah Merah Berdasarkan Morfoogi Sel Untuk Mendeteksi Anemia Defisiensi Besi. *Jurnal ITSMART* 3 (1) : 2301-7201.

Setyanto, A.E. 2006. Memperkenalkan Kembali Metode Eksperimen dalam kajian Komnikasi. *Jurnal Ilmu Komunikasi* 3 (1): 37-48.

Setyowati, W.A.E., S.R.D. Ariani, Ashadi, B. Mulyani, C.P.Rahmawati. 2014. skrining fitokimia dan Identifikasi komponen Utama ekstrak Metanol Kulit Durian (*Durio zibethius* Murr.) Varietas Petruk.Seminar nasional Kimia dan Pendidikan kimia VI 271.

Singh, S.P. dan Priyanka S. 2015. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 50, 431-444

Slamet, B. Tridjoko, A. Prijono, T. Sehadharma dan K. Sugama. 1996. Penyerapan nutrisi endogen, Tabiat makan dan perkembangan morfologi larva ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis*. *J. Pen. Perikanan Indonesia*. 2 (2) : 13 - 21.

Springer, S. 2015. Transport and quality control of MHC class I molecules in the early secretory pathway. *Curr. Opin. Immunol.* 34: 83-90.

Standart Operational Procedure (SOP) UPT Pengembangan Budidaya Air Payau (PBAP) Bangil dengan spesifikasi metode IKM/5.4.27/UPT PBAP (PCR).

Subyakto, Slamet dan Cahyaningsih, S. 2003. Pembenuhan Kerapu Skala Rumah Tangga. Agromedia pustaka. Jakarta. 61 hml.

Sudaryatma, P.E., A.T. Lestari, N.L. Sunarsih, K.S. Widiarti, S.N. Hadayat, D. Srinoto. 2012. Imunositokimia *Streptavidin Biotin*: Deteksi Dini *Viral Nervous Necrosis Virus* pada Lendir Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Jurnal Sain Veteriner* 30 (1).

Sun, Z.; Li, T.; Zhou, Z.; Jiang, Y. 2016. Microalgae as a source of lutein: Chemistry, biosynthesis, and Carotenogenesis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 153, 37–58.

Takeda H. Classification of *Chlorella* strains by cell wall sugar composition. *Phytochemistry* 27 (6) :3823.

Tan, C., Huang, B., Chang, S.F., Ngoh, G.H., Munday, B., Chen, S.C., Kwang, J. 2001. Determination of the complete nucleotide sequences of RNA1 and RNA2 from greasy grouper (*Epinephelus tauvina*) nervous necrosis virus, Singapore strain. *J. Gen. Virol.*, 82, 647–653.

Takaichi, S. 2011. Carotenoid in Algae : Distributions, Biosyntheses and Functions. *Mar. Drug.* 211-0063. 9 pp.1101-1118.

Tanaka K, Konishi F, Himeno K, Taniguchi K, Nomoto K. 1984. Augmentation of Antitumor Resistance by A Strain of Unicellular Green Algae, *Chlorella vulgaris*. *Cancer Immunol Immun* (17) :90-4.

Tang G. dan Paolo M.S. 2011. Vitamin A, Nutrition, and Health Values of Algae: Spirulina, Chlorella, and Dunaliella. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*, 1, 111-118.

Tizard, I. R. 1988. Pengantar Imunologi Veteriner. Ed. 2. Penerbit Universitas Airlangga. Surabaya. 497 hlm.

Tort, L., J.C. Balasch, S. Mackenzie. 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología* Vol. 22 : 277-286

Triastuti, J., K T Pursetyo, A Monica¹, L Lutfiyah , D S Budi. 2017. Abnormalities of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus lanceolatus*) in Situbondo. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 137.

Udiyanto, H., B. Askanda, D. Fauziah. 2013. Ekspresi Heat Shock Protein 70 (HSP70) dan Caspase-3 sebagai Prediktor terhadap Operabilitas Kanker Serviks Stadium IIB setelah Mendapat Kemoterapi Neoadjuvant Paclitaxel-Carboplatin. *Indonesian Journal of Cancer* VII (3).

Ugwu, C. U., dan Aoyagi, H. 2012. Microalgal Culture Systems: An Insight into their Designs, Operation and Applications. *Biotechnology*, 11(3), pp. 127–132.

Uribe, C., H. Folch, R. Enriquez, G. Moran. 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni Medicina*, 56, (10): 486–503.

Utami, D.T, S.B. Prayitno, S. Hastuti, 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) 7-21.

Varela, J.C., Pereira, H., Vila, M., León, R. 2015. Production of carotenoids by microalgae: Achievements and challenges. *Photosynth. Res.*

Viegas, C.V., Hachemi, I., Mäki-Arvela, P. 2015. Algal products beyond lipids: Comprehensive characterization of different products in direct saponification of green alga *Chlorella* sp. *Algal Res.* 11, 156–164

Von der Mark, K. 1999. Structure, biosynthesis and gene regulation of collagens in cartilage and bone, Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism. *Academic Press*, Orlando pp. 3– 29.

Walia, A dan M.H. Balkhia. 2016. Heat shock proteins, Importance and expression in fishes. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, Volume 4; Issue 4;No. 29-35.

Walker, J.B. 1954. Inorganic micronutrient requirements of *Chlorella*. II. Quantitative requirements for iron, manganese, and zinc. *Arch. Biochem. Biophys.* 53, 1–8.

Wardana, I.K. dan Tridjoko. 2015. Mengenal Lebih Dekat Kerapu Bebek (*Cromileptes altivelis*) Hasil Budidaya. *Media Akuakultur* Vol. 10 (1): 23-29

Weber, M. dan Beaufort L.F. 1940. The fishes of the Indo-Australian Archipelago. *Leiden: EJ Brill*. Vols. 1-8.

Widi, R.K. 2010. Asas Metodologi Penelitian. Yogyakarta: Graha Ilmu.

Widiyati, E. 2006. Penentuan Adanya Senyawa Triterpenoid Dan Uji Aktivitas Biologis Pada Beberapa Spesies Tanaman Obat Tradisional Masyarakat Pedesaan Bengkulu. *J. Gradien*, vol. 2, no. 1, pp. 116–122.

Wiete, L., Femke B., Ruurd V.D.Z, Elles K.K., Jose e W., Willem V.D. 2007. Cell stress induced HSP are targets of regulatory T cells: A role for HSP inducing compounds as anti-inflammatory immuno-modulators?. *FEBS Letters* 581. 3716–3722

Wulandari, L. 2011. Kromatografi Lapis Tipis. Jember : PT. Taman Kampus Presindo.

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

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

Yanuhar, U. 2015. Effects of Pigment-Protein Fraction from *Nannochloropsis Oculata* on TNF α and IL-6 Which Act as an Anti-Inflammatory Against Viral Nervous Necrosis (VNN) Infection. *Procedia Chemistry* 14. Elsevier Ltd.: 437–43. doi:10.1016/j.proche.2015.03.059.

Yanuhar, U., R. Christiawan, M. Mahmudi, A. M. Sh, dan D. Arfiati. 2015. "Heat Shock Protein (Hsp) Response Within RNA Viral Nervous Necrosis (VNN) that Infect of the Humpback grouper *Cromileptes altivelis*," pp. 9–13.

Yanuhar, U., R. Christiawan, M. Mahmudi, A.M.S. Hadi, D. Arfiati. 2015. Heat Shock Protein (Hsp) Response Within RNA Viral Nervous Necrosis (VNN) that Infect of the Humpback grouper *Cromileptes altivelis*. *Agricultural and Medical Sciences*.10-15.

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

Yasuhara-bell, Jarred, Yongbo Yang, Russell Barlow, Hank Trapido-rosenthal, and Yuanan Lu. 2010. In Vitro Evaluation of Marine-Microorganism Extracts for Anti-Viral Activity, 1–11.

Yasui, Y., Hosokawa, M., Mikami, N., Miyashita, K., Tanaka, T. 2011. Dietary astaxanthin inhibits colitis and colitis-associated colon carcinogenesis in mice via modulation of the inflammatory cytokines. *Chem. Biol. Interact.*, 193, 79–87.

You, T., dan Barnett, S.M. 2004. Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum*. *Biochem. Eng. J.* 19, 251–258.

Yuanita, R., U. yanuhar, Hardoko. 2013. Pathognomonic of *Viral Nervous Necrotic* (VNN) Virulence on Larvae of Humpback Grouper (*Cromileptes altivelis*). *Advances in Environmental Biology*, 7(6): 1074-1081.

Zorriehzahra, M.E.J., M. Ghasemib, M. Ghiasi, S.Haghighi Karsidani, G. Bovo, A. Nazari, M. Adel, V. Arizza, K. Dhama. 2016. Isolation and confirmation of viral nervous necrosis (VNN) disease in golden grey mullet (*Liza aurata*) and leaping mullet (*Liza saliens*) in the Iranian waters of the Caspian Sea. *Veterinary Microbiology* 190, 27–37.

Zügel, U. Dan S.H.E. Kaufmann. 1999. Role Of Heat Shock Proteins In Protection From And Pathogenesis Of Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, P. 19–39 Vol. 12, No. 1.

Zulfadli, N. Ferdinal, dan B. Arifin. 2015. Isolasi Terpenoid Fraksi Aktif Antioksidan Dari Daun Andong (*Cordyline fruticosa* [L.] A. Cheval). *J. Kim. Unand*, vol. 4, no. 1, pp. 67–70.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Dokumentasi Selama Proses Penelitian

Kegiatan	Keterangan
 <p>(A)</p>	 <p>(B)</p> <p>Kegiatan proses ekstraksi. (A) Penimbangan bubuk <i>C. vulgaris</i> (B) Proses evaporasi</p>
 <p>(A)</p>	 <p>(B)</p> <p>Kegiatan pengenceran ekstrak untuk uji in-vivo (A) Proses penimbangan ekstrak (B) Hasil pengenceran ekstrak</p>
	<p>Kegiatan uji in-vivo ekstrak pada ikan kerapu cantang</p>

Kegiatan	Keterangan
	 <p>Kegiatan pengukuran kualitas air</p>
<p>(A)</p>	<p>(A) Pengukuran pH</p>
<p>(B)</p>	<p>(B) Pengukuran suhu</p>
<p>(C)</p>	<p>(C) Pengukuran salinitas</p>
<p>(D)</p>	<p>(D) Pengukuran DO</p>
	
<p>(A)</p>	<p>(A) Pembedahan ikan</p>
	<p>Kegiatan pembedahan dan pengambilan organ target</p>
<p>(B)</p>	<p>(B) Pengambilan organ target (otak)</p>
<p>(A)</p>	
<p>(B)</p>	<p>Kegiatan pengamatan IHK</p>
	

Lampiran 2. Data Kualitas Air Media Hidup Hewan Uji

1) Hasil pengukuran suhu pada media pemeliharaan ikan uji

Hari	K+	K-	C1	C2	C3	CV1	CV2	CV3
Ke-0	29	29	29	29	29	30	29	30
Ke-3	29	29	30	30	29	29	30	30
Ke-6	29	30	29	29	30	30	29	29
Ke-9	30	31	30	30	31	30	31	31
Ke-12	31	31	31	30	31	31	31	30
Ke-15	30	30	29	30	29	29	29	29

2) Hasil pengukuran salinitas pada media pemeliharaan ikan uji

Hari	K+	K-	C1	C2	C3	CV1	CV2	CV3
Ke-0	33	33	34	34	34	33	33	35
Ke-3	33	33	33	34	34	34	33	34
Ke-6	34	34	35	34	34	34	34	35
Ke-9	34	33	33	34	34	33	34	34
Ke-12	35	34	34	35	35	34	36	35
Ke-15	34	34	34	34	35	34	34	34

3) Hasil pengukuran pH pada media pemeliharaan ikan uji

Hari	K+	K-	C1	C2	C3	CV1	CV2	CV3
Ke-0	8,3	8,1	8,4	8,4	8,3	8,2	8,0	8,0
Ke-3	8,1	8,3	8,3	8,1	8,2	8,3	8,0	8,0
Ke-6	8,4	8,0	8,3	8,4	8,2	8,2	8,1	8,1
Ke-9	8,2	8,1	8,0	8,2	8,3	8,3	8,1	8,1
Ke-12	8,4	8,4	8,2	8,3	8,0	8,3	8,3	8,4
Ke-15	8,3	8,3	8,1	8,2	8,3	8,2	8,0	8,1

4) Hasil pengukuran DO pada media pemeliharaan ikan uji

Hari	K+	K-	C1	C2	C3	CV1	CV2	CV3
Ke-0	9,0	8,6	9,0	8,9	9,0	8,9	8,8	8,8
Ke-3	8,9	8,8	9,2	8,9	9,0	8,9	8,9	9,0
Ke-6	9,1	9,0	9,2	9,2	9,0	8,8	9,0	8,9
Ke-9	9,2	8,9	9,0	9,0	9,3	9,1	8,8	9,0
Ke-12	8,9	8,9	9,0	9,1	9,1	9,0	8,8	8,9
Ke-15	8,9	8,9	9,0	9,2	8,9	8,7	8,9	9,0

Keterangan = K+ : kontrol positif

K- : kontrol negatif

C1 : perlakuan ekstrak dosis 17 µg/mL

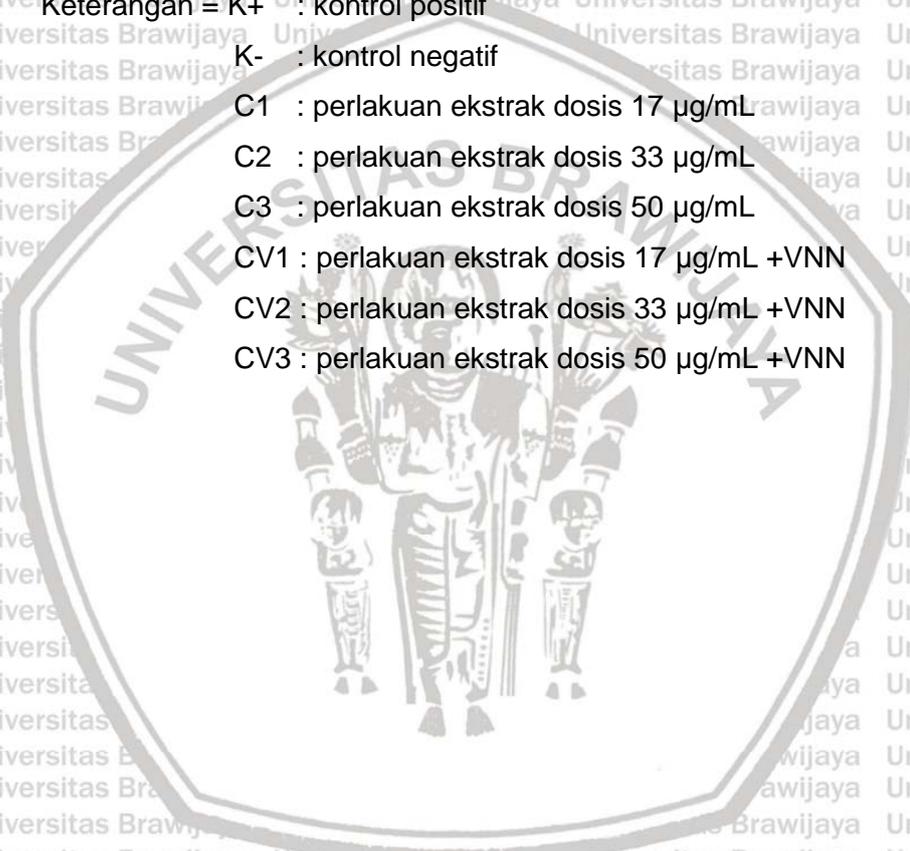
C2 : perlakuan ekstrak dosis 33 µg/mL

C3 : perlakuan ekstrak dosis 50 µg/mL

CV1 : perlakuan ekstrak dosis 17 µg/mL +VNN

CV2 : perlakuan ekstrak dosis 33 µg/mL +VNN

CV3 : perlakuan ekstrak dosis 50 µg/mL +VNN



Lampiran 3. Data Perhitungan Darah Pada Respon Imunologi Organ Otak

ERITROSIT				
Perlakuan	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Rata-rata
K+	25	31	28	28
K-	7	9	6	7
C1	27	38	22	29
C2	36	45	21	34
C3	27	23	31	27
CV1	18	14	12	15
CV2	20	19	27	22
CV3	11	18	21	17

BASOFIL				
Perlakuan	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Rata-rata
K+	4	7	7	6
K-	19	21	22	21
C1	4	3	8	5
C2	5	4	7	5
C3	7	4	4	5
CV1	15	11	9	12
CV2	11	9	12	11
CV3	18	11	17	15

NEUTROFIL				
Perlakuan	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Rata-rata
K+	6	9	11	9
K-	27	33	28	29
C1	7	5	7	6
C2	5	7	4	5
C3	6	9	8	8
CV1	15	20	19	18
CV2	13	19	17	16
CV3	20	16	22	19

PLATELET				
Perlakuan	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Rata-rata
K+	15	17	11	14
K-	6	4	5	5
C1	12	11	16	13
C2	14	16	17	16
C3	9	13	17	13
CV1	11	9	8	9
CV2	13	15	8	12
CV3	8	11	8	9

Keterangan = K+ : kontrol positif

K- : kontrol negatif

C1 : perlakuan ekstrak dosis 17 µg/mL

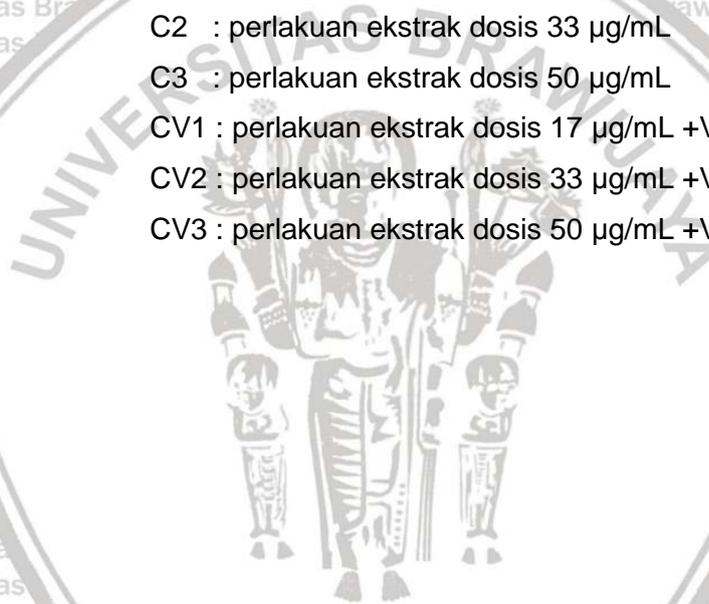
C2 : perlakuan ekstrak dosis 33 µg/mL

C3 : perlakuan ekstrak dosis 50 µg/mL

CV1 : perlakuan ekstrak dosis 17 µg/mL +VNN

CV2 : perlakuan ekstrak dosis 33 µg/mL +VNN

CV3 : perlakuan ekstrak dosis 50 µg/mL +VNN



Lampiran 4. Analisis data

Test of Homogeneity of Variances

Total			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.676	7	16	.002

ANOVA

Total					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	14170.400	7	2024.343	43.762	.000
Within Groups	740.127	16	46.258		
Total	14910.526	23			

Total

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Tukey HSD ^a				
C3	3	3.7667		
K+	3	5.8667		
C1	3	9.4333		
C2	3	14.6333		
K-	3		42.2000	
CV3	3		45.4000	
CV1	3		60.0000	60.0000
CV2	3			69.0000
Sig.		.536	.080	.733

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.