

## 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang *heatshock* protein pada ikan kerapu dengan treatment alga yang terinfeksi virus vnn dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

- Bahwa ikan yang terkena virus *Viral Nervous Necrosis*, Ekspresi HSP pada ikan kerapu yang dideteksi melalui imunohistokimia menunjukkan hasil pada jaringan otak menggunakan *N. oculata* 52,0%, *treatment C. vulgaris* sebesar 58,0% dan *treatment S. platensis* sebesar 64,5%. Pada histologi ditemukannya kerusakan jaringan pada organ otak dan mata berupa vakuola, nekrosis dan hemorage.
- Kualitas air juga berpengaruh terhadap ekspresi *Heat shock* pada ikan, semakin baik kualitas air maka ekspresi Heatshock akan semakin baik juga.

### 5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian diperlukan adanya pengontrolan kualitas air untuk menjaga kualitas air tetap pada kisaran yang baik untuk budidaya ikan kerapu agar tidak terserang penyakit dan perlu adanya penanganan yang baik dalam proses pembenihan ikan kerapu untuk mencegah masuknya virus dalam tubuh ikan kerapu untuk mendapatkan kualitas ikan kerapu yang baik.

## DAFTAR PUSTAKA

- Afandi, Y.V., 2003, "Uji Penurunan Kandungan Nitrat dan Fosfat oleh Alga Hijau (*Chlorella* sp) secara Kontinyu", Jurusan Teknik Lingkungan ITS, Surabaya.
- Agustyningtyas, Nina. 2014. Pemanfaatan Bakteri Heterotrof pada Budidaya Ikan Lele Dumbo (*Clarias* sp.) dengan Sistem Tanpa Ganti Air Terhadap FCR (*Food Conversion Rate*) dan Retensi Protein. *Skripsi*. Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga Surabaya.
- Ali, M. 2013. Monograf Degradasi Nitrat Limbah Domestik Dengan Alga Hijau (*Chlorella* sp). Surabaya. Upn veteran jatim.
- Amelia, N., dan S.B. Prayitno. 2012. Pengaruh Ekstrak Daun Jambu Biji (*Psidium guajava*) untuk Menginaktifkan *Viral Nervous Necrosis* (VNN) pada Ikan Kerapu Bebek (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 1(1), 264-278.
- Amiruddin, H., R. K. Dongoran, R. Nurhadi dan L. Darto. 2011. Manajemen Induk Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes Altivelis*) sebagai Upaya Optimalisasi Produksi Telur Berkualitas. Balai Budidaya Laut Ambon. 23 hal.
- Anon, Sen M.A.T., M.T. Kocer, & H. Erbas. 2009. Studies on Growth Marine Microalgae in Batch Cultures: *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyta). *Asian J. of Plant Sciences*. 4(6): 642-644.
- Andriyani, W. M. 2012. Uji Kemampuan Kandidat Vaksin DNA *Nervous Necrosis Virus* dalam Menginduksi Antibodi Ikan Kerapu cantang. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor. Tidak dipublikasikan.
- APEC/SEAFDEC (Asia–Pacific Economic Cooperation/Southeast Asian Fisheries Development Centre) 2001. Husbandry and health management of grouper. APEC: Singapore and SEAFDEC: Iloilo, Philippines.
- Armita, D., 2011. Analisis Perbandingan Kualitas Air Di Daerah Budidaya Rumput Laut Dengan-Daerah Tidak Ada Budidaya Rumput Laut, Di Dusun Malelaya, Desa Punaga, Kecamatan Mangarabombang, Kota Takalar. Skripsi. Program Studi Manajemen Sumberdaya Perairan Jurusan Perikanan Fakultas Ilmu Kelautan Dan Perikanan Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Asnita. 2012. Identifikasi Cacing Parasitik dan Perubahan Histopatologi pada Ikan Bunglon Batik Jepara (*Cryptocentrus leptocephalus*) dari Kepulauan Seribu. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor. Tidak dipublikasikan.
- Budhy, T. Indah, K. Istiati dan Soehardjo. 2006. Peran *Heat Shock Protein* (HSP) terhadap Penyakit Ronggamulut. *Edisi Khusus KPPIKG*. XIV: 435-438
- Cahyono, I., 2010. Budi Daya Ikan Tawar. Kanisius. Yogyakarta

- Cao, L., W. Wang, Y. Yang, C. Yang, Z. Yuan, S. Xiong and J. Diana. (2007). Environmental impact of aquaculture and countermeasures to aquaculture pollution in China. *Environmental Science in Pollution Res* 14 (7): 452-46.
- Chi Y, Huddleston MJ, Zhang X, Young RA, Annan RS, Carr SA, dan Deshaies RJ. 2001. Negative regulation of Gcn4 and Msn2 transcription factors by Srb10 cyclin-dependent kinase. *Genes Dev.* 15(9):1078
- Fachrullah MR. 2011. Laju Pertumbuhan Mikroalga Penghasil Biofuel Jenis *Chlorella* sp. dan *Nannochloropsis* sp. yang Dikultivasi Menggunakan Air Limbah Hasil Penambangan Timah di Pulau Bangka.[Skripsi] Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Fithriani, D., S. Amini, S. Melanie dan 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.
- Hutabarat, S. dan S. M. Evans. 1986. Pengantar Oseanografi. Cetakan ke-3. UI Press. Jakarta. Iahude, A. G. 1997. Sebaran Suhu, Salinitas, Sigma-T, dan Zat Hara Perairan Laut Cina Selatan. Hal 25-90. *In* Suyarso (ed.), Atlas Oseanologi Laut Cina Selatan. P3O-LIPI. Jakarta.
- Ira. 2014. Kajian Kualitas Perairan Berdasarkan Parameter Fisika Dan Kimia Di Pelabuhan Perikanan Samudera Kendari Sulawesi Tenggara. *Aquasains (Jurnal Ilmu Perikanan dan Sumberdaya Perairan).*
- Irianto, A. (2005). Patologi Ikan Teleostei. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Isnansetyo, A. dan Kurniastuti. 1995. *Teknik Kultur Phytoplankton Zooplankton Pakan Alami Untuk Pembenihan Organisme Laut.* Kanisius, Yogyakarta.
- Erlansyah, Hasim, dan Mulis. 2014. Pengaruh Pemberian Dosis Pakan Otohime yang Berbeda terhadap Pertumbuhan Benih Ikan Kerapu Bebek di BPBILP Lamu Kabupaten Boalemo. *Nikè: Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan.* Vol. 2 (1).
- Ernest, P. 2012. Pengaruh Kandungan Ion Nitrat terhadap Pertumbuhan *Nannchloropsis oculata*. Skripsi. Universitas Indonesia. Depok, Jakarta.
- Fulks, W. & K.L. Main. 1991. Rotifer and microalgae culture system. *Proceeding of a U.S – Asia Workshop.* Argent Laboratories.
- Hasegawa, T., Y .Yoshikai, M. Okuda. & K. Nomoto. 1990. Accelerated Restoration of The Leukocyte Number and Augmented Resistance Against Escherichia Coli in Cyclophosphamide-Treated Rats Orally Administered with A Hot Water Extract of Chlorella vulgaris. *International Journal of Immunopharmacology.* 12(8): 883-891.
- Hinton DE.1994. *Cells, Cellular Responses, and Their Markers in Chronic Toxicity of Fishes.* *Aquatic Toxicology,* p.207Á

- Hoole, D., D. Bucke., P. Burgess., and I. Wellby. 2001. *Diseases of carp and other cyprinid fishes*. Oxford, UK: Fishing News Books.
- Kuntari, A.G. 2014. Fungsi *Peridinin Cell Pigment (PCP) N. oculata* dalam Menginduksi Sistem Imun *Major Histocompatibility Complex (MHC I)* Ikan Kerapu cantang pada Organ Insang. Skripsi. Universitas Brawijaya. Malang. Tidak dipublikasikan
- Kurniawan, Andri. 2012. Penyakit Akuatik. UBB Press: Pangkalpinang.
- Labina, F.A.P., 1994, "Pengaruh Perbedaan Salinitas Terhadap Tumbuhan Populasi *Chlorella* sp di bak – bak percobaan", Jurusan Budidaya Perairan Universitas Hang Tuah, Surabaya.
- Laven, P., & P. Sorgeloos. 1996. Manual on The Production and Use of Live Food for Aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper. Rome.
- Lightner, D.V. 1996. *A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic pathology*. John Wiley & Sons. *Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp*. The World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana, USA.
- Mahyuddin, K. 2010. *Panduan Lengkap Agribisnis Patin*. Penebar Swadaya Grup.
- Nazir, M. 1998. Metode Penelitian. Ghalia Indonesia. Jakarta.
- Nguyen, H.D., Mekuchi, T., Imura, K., Nakai, T., Nishizawa, T. and Muroga, K. 1994. *Occurrence of Viral Nervous Necrosis (VNN) in Hatchery-Reared Juvenile Japanese Flounder Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Sci.*, 60:551-554.
- Nontji, A. 2003. *Tiada Kehidupan di Bumi Tanpa Keberadaan Plankton*. Pusat Penelitian Oseanografi – LIPI. Jakarta.
- Nurzam, Usman B, dan Mas E. 2015. Pengaruh Pemberian Pakan Komersial Terhadap Pertumbuhan Ikan Kerapu Bebek (*Cromileptes Altivelis*). Vol. 7 (1).
- Panigoro, N., I. Astute., M. Bahnan., P. D. Salfira dan K. Wakita. 2007. Teknik Dasar Histologi dan Atlas Dasar-dasar Histopatologi Ikan. Balai Budidaya Air Tawar Jambi. Jambi.
- Pikarsky, E., A. Ronen., J. Abramowitz., B. Levavi-Sivan., M. Hutoran., Y. Shapira., M. Steinitz., A. Perelberg., D. Soffer., and M. Kotler. 2004. Pathogenesis Acute Viral Disease Induced in Fish by Carp Interstitial Nephritis and Gill Necrosis Virus. *Journal of virology*. 78(17): 9544-9551.
- Prabowo, D. 2009. Optimalisasi Pengembangan Media untuk Pertumbuhan *Chlorella* sp. pada Skala Laboratorium. SKRIPSI. Institut Pertanian Bogor : Bogor. 95 hal

- Prihartini, N. C. 2015. Distribusi dan Analisis Filogenetik RNA Nervous Necrotic pada Benih Nila (*Oreochromis niloticus*). Tesis. Program Pasca Sarjana Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Malang. Tidak Dipublikasikan.
- Purnamawati. 2002. Peranan Kualitas Air Terhadap Keberhasilan Budidaya Ikan di Kolam. *Warta Penelitian Perikanan Indonesia*. 8(1): 1-34.
- Putri, R. R., U. Yanuhar., dan H.A.M. Suryanto. 2013. Perubahan Struktur Jaringan Mata dan Otak Pada Larva Ikan Kerapu Cantang yang Terinfeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN) dengan Pemeriksaan Scanning Electron Microscope (SEM). *Jurnal Mahasiswa Manajemen Sumberdaya Perairan*, 1(1), 1-10.
- Rahwanto, D., T. Tusihadi., T. Penataseputro., P. Ramdhani, R. Pumomowati., R. I. Wibisana. 2016. Penyakit Ikan Kerapu. LP2IL. Serang. 75 hlm.
- Ramadhani, B. 2010. Manajemen Pemeliharaan Benih Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) di Balai Budidaya Air Payau Situbondo Provinsi Jawa Timur. Praktek Kerja Lapang. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Randall, J.E., A Preliminary Synopsis on the Groupers (Perciformes : Serranidae, Epinephelinae) of the Indo-Pacific Region in J.J. Polovina, S. Ralston (Editors), *Tropical Snappers and Groupers : Biologi and fisheries management*. Westview Press, Inc. Boulder and London.
- Risamasu, F.J.L. 2008. Inovasi Teknologi Penangkapan Ikan Karang dengan Bubu Dasar Berumpon. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 21 hlm.
- Riyadi, M. 2007. Kebijakan Sumber Daya Pesisir Sebagai Alternatif Pembangunan Indonesia Masa Depan.
- Robert, R.J. 2012. *Fish pathology*. John Wiley & Sons.
- Roza, D., Johnny dan Yuasa K. 2003. Viral diseases of grouper in Indonesia. Makalah pada Training on Grouper Hatchery Seed Production. Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol – NACA Bangkok. Gondol 1 – 21 Mei 2003. 12 p.
- Salmin. 2005. Oksigen Terlarut (DO) dan Kebutuhan Oksigen Biologi (BOD) Sebagai Salah Satu Indikator Untuk Menentukan Kualitas Perairan. *Oseana Volume XXX No. 3, 2005*, hlm. 1-6.
- Sari, Septi D., Wardiyanto dan A. Setyawan. 2012. Profil Histopatologi Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) yang distimulasi Jintan Hitam (*Nigella Sativa*) dan diinfeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN). *Aquasains*. 207 – 212.
- Sari, S.D. and A. Setyawan. 2014. Profil Histopatologi Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) yang Distimulasi Jintan Hitam (*Nigella sativa*) dan Diinfeksi Viral Nervous Necrosis (VNN). *AQUASAINS*, 3(1).

- Setianto, Adi. 2011. Usaha Budidaya Ikan Kerapu. Pustaka Baru Press. Yogyakarta. 162 hml.
- Smith, H.A and T.C. Jones. 1961. *Veterinary Pathology*. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Sonida, A. 2014. Pengaruh Pemberian Jintan Hitam (*Nigella sativa*) Terhadap Respon Imun Spesifik Kakap Putih (*Lates calcalifer* B.) yang Diinfeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN). Skripsi. Fakultas Pertanian Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Spector, W.G., dan T.C. Spector. 1993. *Pengantar Patologi Umum*. Edisi ke-3. Soetjipto NS, Harsoyo, Hana A, Astuti P, Penerjemah; Moelyono MPE, Editor. Yogyakarta. Gadjah Mada University Press. Terjemahan dari: An Introduction to General Pathology 3rd.
- Sukadi, F. (2011). Kebijakan Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan dalam Mendukung Akselerasi Pengembangan Perikanan Budidaya. Dalam: Prosiding Pengendalian Penyakit Pada Ikan dan Udang Berbasis Imunisasi dan Biosecurity, UNSOED Purwokerto. Hal 1-7.
- Sunaryanto, Sulistyono, Chaidir dan Sudjiharno (2001) Pengembangan teknologi budidaya kerapu: Permasalahan dan kebijaksanaan. Prosiding Lokakarya Nasional. Pengembangan Agribisnis Kerapu. Peningkatan daya saing agribisnis kerapu yang berkelanjutan melalui penerapan IPTEK. Jakarta, 28-29 Agustus 2001: p.1-16.
- Surakhmad, Winarno. 1998. Pengantar Penelitian Ilmiah (Dasar, Metode dan Teknik). Tarsito. Bandung.
- Susilaningih, D., A.C. Djohan, D.N. Widyaningrum, & K. Anam. 2009. Biodiesel from Indigenous Indonesian Marine Microalgae *Nannochloropsis* sp. *Journal of biotechnology*. 2(2) Oct. 2009 ISSN: 1979-9756.
- Suwoyo, S.H. 2011. Kajian Kualitas Air Pada Budidaya Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) Sistem Tumpang Sari Di Areal Mangrove. *Berkala Perikanan Terubuk*. Vol. 39. No.2: hlm 25 – 40
- Telepata. L, D. 2011. Pertumbuhan Kultur *Chlorella spp* Skala Laboratorium Pada Beberapa Tingkat Kepadatan Inokulum. Prosiding. Pengembangan Pulau-Pulau Kecil.
- Theresia I. B. S., Istiati K., and Soehardjo. 2006. Peran Heat Shock Protein (HSP) Terhadap Penyakit Rongga Mulut. *Bagian Biologi Oral*. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.
- Thiery, R., J. Cozien, J. Cabon, F. Lamour, M. Baud, and A. Schneemann. 2006. Induction of a Protective Immune Response Against Viral Nervous Necrosis in the European Sea Bass *Dicentrarchus labrax* by Using Betanodavirus Virus-Like Particles. *Journal of Virology*. 80 (20): 10201–10207.
- Yanong, R. P. E. 2013. *Viral Nervous Necrosis (Betanodavirus) Infection in Fish*. University of Florida. 1-6.

- Yanuhar, Uun, Christiawan, R., M. Mahmudi, Agus Maizar SH dan Diana Arfianti. 2015. *Heat Shock Protein (HSP) Response Within RNA Viral Nervous Necrosis (VNN) that Infect of the Humpback grouper *Cromileptes altivelis*. International Conference on Chemical, Agricultural and Medical Sciences. 9 – 13.*
- Yukio, M., Leobert D. De La pena and Erlinda R. Cruz-lacierda. 2007. Susceptibility of Fish Species Cultured in Mangrove. Southeast Asian Fisheries Development Center (SEAFDEC).
- Yusrudin, Sumaryam. 2011. Analisis Kualitas Perairan Untuk Karamba Jaring Apung Ikan Kerapu di Kabupaten Situbondo. *Neptunus Jurnal Kelautan*. 17(1) : 17 – 26.
- Zipcodezoo. 2017. *Chlorella sp.* <http://zipcodezoo.com/index.php/Chlorella> diakses pada tanggal 01 Mei 2017 pukul 18:50

## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Alat dan Bahan Penelitian

Alat	Bahan
- Toples 10 L	- Starter <i>N. oculata</i>
- Aerator set	- Air laut
- Pipet volume	- Pupuk Walne
- Lampu	- Vitamin
- Plastik penutup	- <i>Clorine</i> (Cl <sub>2</sub> )
- Pipet tetes	- Natrium thio sulfat (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )
- <i>Washing bottle</i>	- Air sampel
- <i>Haemocytometer</i>	- Tissue
- <i>Cover glass</i>	- Ikan kerapu
- Mikroskop binokuler	- terinfeksi VNN
- <i>Handcounter</i>	- Aquades
- Kamera	- Ikan kerapu cantang
- Mortart dan alu	- Ekstraksi VNN
- Gelas ukur 25 ml	- <i>N. oculata</i>
- <i>Nanodrop-spectrophotometry</i>	- Kertas label
UV-VIS	
- Spatula	
- <i>Centrifuge</i>	
- Cuvet	
- Rak cuvet	
- Aquarium	
- Aerator set	
- Plastik penutup	
- pH meter	
- DO meter	
- Refraktometer	



**Lampiran 2.** Prosedur Pengujian *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

<p>Pembuatan Larutan TAE (stok 50x)</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Memasukkan masukkan 800 mL akuades steril ke dalam beaker glass ukuran 1 L</li> <li>2. Melarutkan 242 gram Tris base dengan 57,1 mL glacial acetic acid dan 100 mL EDTA 0,5 M (pH 8) ke dalam beaker glass yang berisi akuades steril</li> <li>3. Mengaduk larutan dengan Magnetic stirier sampai tercampur rata</li> <li>4. Menambahkan akuades steril sampai 1 L</li> <li>5. Cara membuat larutan TAE 1x (siap pakai) yaitu dengan melarutkan 1 bagian larutan stok dengan 49 bagian akuades steril.</li> </ol>
<p>Pembuatan EDTA</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Menambahkan 186,1 gram <i>Disodium Ethylenediaminetetra acetate</i> -2H<sub>2</sub>O dalam erlenmeyer yang berisi 800 ml akuades</li> <li>2. Mengaduk larutan dengan <i>Magnetic stirier</i> sampai tercampur rata</li> <li>3. Menunggu sampai nilai pH menjadi 8</li> <li>4. Menambahkan 20 g/L NaOH pellet</li> <li>5. Menyeterilkan larutan dengan menggunakan Autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C</li> </ol>
<p>Pembuatan Ethidium Bromide (10 mg/MI)</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Menambahkan 1 gram Ethidium Bromide kedalam 100 ml akuades</li> <li>2. Mengaduk dengan <i>Magnetic stirrer</i> selama beberapa jam sampai Ethidium Bromide larut</li> <li>3. Membungkus tabung yang berisi larutan dengan menggunakan aluminium foil atau memindahkan kedalam botol gelap</li> <li>4. Menyimpan larutan dalam suhu kamar</li> </ol>
<p>Pembuatan 2% Gel Agarose</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Menimbang 0,8 mg bubuk agarose</li> <li>2. Memasukkan bubuk kedalam erlenmeyer dengan ukuran 100 MI</li> <li>3. Melarutkan bubuk agarose dengan TAE 45 mL lalu memanaskannya diatas hotplate sampai mendidih atau larutan berubah warna menjadi bening</li> <li>4. Memindahkan larutan dari hot plate ke atas waterbath dengan suhu 60oC selama 10 menit</li> <li>5. Mencetak agarose di atas cetakan gel yang sudah dipasang sisir (comb) selama 20-60 menit</li> <li>6. Gel siap digunakan</li> </ol>
<p>Persiapan Sampel</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Menyiapkan alat (gunting, pinset, tabung, penggerus, sarung tangan, mikropipet, tip mikropipet, penggerus, rak (tempat dudukan)</li> </ol>

	<p>tabung) pada satu meja ekstraksi dengan keadaan steril.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>□ Sampel yang dalam keadaan beku dikeluarkan terlebih dahulu dari freezer kemudian dibiarkan sampai esnya mencair.</li> <li>Menggunakan gunting/pinset yang berbeda untuk sampel yang berbeda asal serta menggunakan sarung tangan</li> <li>Memberi label/kode sampel pada tabung/tube</li> </ol>
Proses Ekstraksi DNA	<ol style="list-style-type: none"> <li>Meletakkan organ yang akan di PCR (ginjal) sebanyak 20 mg ke dalam tabung ukuran 1,5 mL atau 2 mL</li> <li>Menambahkan 500 <math>\mu</math>L Lysis Buffer ke dalam tabung kemudian menghancurkan organ dan dicampur sampai rata</li> <li>Menginkubasi larutan dengan suhu 95°C selama 10 menit</li> <li>Melakukan sentrifugasi pada larutan dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit</li> <li>Memindahkan 200 <math>\mu</math>L supernatan ke dalam tabung baru ukuran 1,5 mL atau 2 mL dan menambahkan 400 <math>\mu</math>L alkohol 95%</li> <li>Larutan kemudian di vortex dan di sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit</li> <li>Membuang larutan alkohol sedangkan pelletnya dikeringkan</li> <li>Melarutkan pellet dengan DEPC ddH<sub>2</sub>O, TE Buffer atau DDW sebanyak 20 – 100 <math>\mu</math>L atau lebih sesuai dengan ketebalan pellet</li> <li>DNA telah siap digunakan, apabila masih belum digunakan maka DNA harus disimpan pada suhu -20°C.</li> </ol>
Reaksi PCR untuk mendeteksi VNN	<ol style="list-style-type: none"> <li>Menyiapkan reagen dalam keadaan cair dengan cara divortex</li> <li>Mencampurkan komposisi bahan pembuat larutan PCR untuk mendeteksi VNN</li> <li>membagikan larutan ke dalam mikrotube 0,2 mL dengan volume masing-masing 24 <math>\mu</math>L</li> <li>Menambahkan template DNA, termasuk kontrol positif (standart positif VNN) dan kontrol negatif (ddH<sub>2</sub>O), masing-masing sebanyak 1 <math>\mu</math>L.</li> <li>Melakukan vortex sebentar pada larutan sebelum dimasukkan kedalam mesin PCR (Thermalcycler)</li> <li>Memastikan bahwa program yang akan dijalankan adalah VNN</li> <li>Mengatur suhu pada Thermalcycler</li> </ol>

	<ol style="list-style-type: none"> <li>8. Mematikan mesin dan mengeluarkan tabung jika proses telah selesai</li> <li>9. Produk PCR siap dijalankan pada elektroforesis.</li> </ol>
Proses Elektroforesis	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Menyiapkan tabung yang sudah diamplifikasi kemudian menambahkan 5 <math>\mu</math>L <i>Loading Dye</i> pada masing-masing tabung. Pengambilan menggunakan <i>Loading Dye</i> untuk setiap tabung diusahakan menggunakan tip mikropipet yang berbeda</li> <li>2. Menghomogenkan larutan</li> <li>3. Sebelumnya meletakkan gel yang sudah dicetak diatas tangka electrophoresis lalu mengisi tangka dengan larutan TAE 1x sebanyak 500 mL (sampai gel terendam)</li> <li>4. Memasukkan produk PCR yang sudah tercampur dengan <i>Loading Dye</i> dengan mikropipet ke dalam sumuran gel sebanyak 5-10 <math>\mu</math>L.</li> <li>5. Meletakkan marker atau penanda DNA dengan berat molekul 100 bp sebanyak 5 <math>\mu</math>L pada bagian awal dan akhir deretan sumuran gel</li> <li>6. Setelah semua sampel berada dalam sumuran, selanjutnya memasang tutup elektroforesis dan menghidupkan listrik dengan voltase 120 V selama 30 menit.</li> </ol>
Pengamatan dan Dokumentasi	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Setelah proses elektroforesis kemudian gel diangkat</li> <li>2. Merendam gel dalam larutan <i>Ethidium Bromide</i> (EtBr) 0,05% selama 4 menit □ Merendam gel dengan akuades steril selama 10 menit</li> <li>3. Mengamati gel dengan UV Transilluminator</li> <li>4. Mendokumentasikan hasil gambar menggunakan kamera digital</li> </ol>
Pembacaan Hasil	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Hasil positif VNN bila terlihat garis perpendaran pita DNA (<i>band</i>) dengan ukuran 294 bp</li> <li>2. Hasil negative bila tidak terlihat garis perpendaran pita DNA (<i>band</i>) dengan ukuran 294 bp</li> </ol>

Lampiran 3. Data Pengukuran Kualitas Air

a. Tabel Pengukuran Suhu

- *N. oculata*

Hari ke-	Parameter Kualitas air	Treatment							
		N1	N2	N3	NV1	NV2	NV3	K	V
H0 (16-06-2017)	Salinitas (ppt)	36	35	35	36	35	36	35	36
	Suhu (°C)	25,8	25,5	25,8	25,6	25,7	25,8	25,1	26,7
	DO (mg/l)	6,17	6,04	6,27	6,23	6,39	6,47	5,76	6,02
	pH	7,8	8	8	7,9	7,9	7,9	7,9	7,6
H3 (19-06-2017)	Salinitas (ppt)	36	36	35	35	35	35	34	35
	Suhu (°C)	23,3	23,7	23,8	23,3	23,7	23,8	22,5	23,4
	DO (mg/l)	5,22	5,38	5,38	5,38	5,39	5,36	5,33	5,36
	pH	7,8	7,8	7,6	7,6	7,6	7,6	7,6	7,7
H6 (22-06-2017)	Salinitas (ppt)	30	30	28	30	30	31	35	30
	Suhu (°C)	24,2	24,4	24,7	24,2	24,4	24,8	23,3	24,4
	DO (mg/l)	5,21	5,45	5,46	5,84	5,51	5,49	5,40	5,32
	pH	7,2	7,8	7,7	7,8	7,9	7,8	7,3	7,8
H9 (25-06-2017)	Salinitas (ppt)	30	28	28	30	30	30	34	30
	Suhu (°C)	25,4	25,6	25,3	25,5	25,5	25,2	24,8	26,2
	DO (mg/l)	5,35	5,48	5,49	5,52	5,48	5,50	5,53	5,43
	pH	7,3	7,7	7,7	7,8	7,8	7,8	7,4	7,7
H0 (16-06-2017)	Salinitas (ppt)	29	28	28	28	28	29	35	28
	Suhu (°C)	24,6	25,2	24,8	24,9	25	24,7	23,5	23,6
	DO (mg/l)	5,40	5,47	5,48	5,49	5,52	5,47	5,45	5,42
	pH	7,5	7,8	7,5	7,7	7,7	7,7	7,5	7,6

- *C. vulgaris*

Hari ke-	Kualitas Air	Treatment							
		C2	C4	C6	CV2	CV4	CV6	V	K
H0 (17/06/2017)	Salinitas	34	34	33	33	32	34	33	33
	Suhu	25,4	25,6	25,5	25,5	25,6	26,1	26,5	25,1
	DO	6,51	6,15	6,50	6,23	6,31	6,47	6,02	5,76
	pH	7,9	7,9	7,8	7,8	7,9	7,9	7,8	7,8
H3 (20/06/2017)	Salinitas	35	33	35	35	33	35	33	34
	Suhu	23,6	23,5	23,5	23,4	23,4	23,6	23,4	22,5
	DO	5,11	5,54	5,90	5,32	5,43	5,34	5,4	5,3
	pH	7,6	7,8	7,8	7,7	7,7	7,7	7,6	7,7
H6 (23/06/2017)	Salinitas	30	29	29	32	30	29	29	33
	Suhu	24,3	24,1	24,2	24,2	24,2	24,1	24,7	23,3
	DO	5,41	5,53	5,43	5,41	5,52	5,41	5,32	5,40
	pH	7,8	7,9	7,8	7,8	7,9	7,8	7,8	7,8
H9 (26/06/2017)	Salinitas	35	36	37	35	35	36	35	35
	Suhu	23,6	23,4	23,4	23,6	23,5	23,5	23,6	22,6
	DO	5,20	5,53	5,30	5,32	5,35	5,36	5,50	5,37
	pH	7,7	7,8	7,8	7,7	7,7	7,7	7,8	7,7
H12 (29/06/2017)	Salinitas	30	30	30	30	31	29	30	34
	Suhu	24,4	24,2	24,6	24,5	24,3	24,3	24,5	23,3
	DO	5,45	5,49	5,45	5,52	5,43	5,41	4,32	5,40
	pH	7,8	7,9	7,7	7,9	7,9	7,8	7,4	7,8

- S. plantesis

Hari ke-	Parameter Kualitas ai	<i>Treatment</i>							
		K	V	S10 <sub>2</sub>	S10 <sup>4</sup>	S10 <sub>6</sub>	SV10 <sub>2</sub>	SV10 <sub>4</sub>	SV10 <sub>6</sub>
H0 (16-06-17)	Salinitas (ppt)	33	33	34	33	34	32	32	32
	Suhu (°C)	25	26	25,7	25	25,9	15,9	25,8	25,8
	DO (mg/l)	6,62	7,9	6,16	6,04	6,27	6,14	6,11	6,24
	pH	7,3	7,9	8	8	8	8	8	8
H3 (19-06-17)	Salinitas (ppt)	37	35	35	35	35	35	35	35
	Suhu (°C)	23,4	23,4	23,6	23,5	23,5	23,4	23,4	23,4
	DO (mg/l)	5,24	5,33	5,29	5,26	5,24	5,32	5,31	5,39
	pH	7,7	7,7	7,8	7,8	7,8	7,7	7,7	7,7
H6 (22-06-17)	Salinitas (ppt)	34	30	29	30	30	30	30	30
	Suhu (°C)	23,6	24,3	24,2	24,3	24,4	24,2	24,1	24,2
	DO (mg/l)	5,38	5,12	5,41	5,44	5,31	5,57	5,57	5,52
	pH	7,8	7,8	7,9	7,8	7,8	7,8	7,9	7,9
H9 (25-06-17)	Salinitas (ppt)	34	30	29	30	30	30	30	30
	Suhu (°C)	24,3	24	23,2	23,7	24,2	23,7	23,4	23,4
	DO (mg/l)	5,29	5,29	5,1	5,15	5,25	5,32	5,34	5,39
	pH	7,9	7,9	7,9	7,7	7,7	7,8	7,8	7,8
H12 (16-06-17)	Salinitas (ppt)	34	29	29	30	30	30	30	30
	Suhu (°C)	23,2	23,5	24,3	24,6	24,4	24,5	24,3	24,4
	DO (mg/l)	5,38	5,15	5,41	5,44	5,31	5,57	5,57	5,52
	pH	7,8	7,9	7,8	7,8	7,7	7,8	7,8	7,8

LAMPIRAN 4. Data Hasil pengamatan histopatologi

**Univariate Analysis of Variance**

**Descriptive Statistics**

Dependent Variable: Histopatologi

Kelompok	Alga	Mean	Std. Deviation	N
K	NO	9.00	2.646	3
	CV	9.00	2.646	3
	SP	4.33	.577	3
	Total	7.44	3.005	9
V	NO	24.00	3.606	3
	CV	24.00	3.606	3
	SP	11.33	1.528	3
	Total	19.78	6.870	9
S2	NO	9.33	3.786	3
	CV	9.67	2.082	3
	SP	4.67	1.528	3
	Total	7.89	3.333	9
S4	NO	8.00	1.000	3
	CV	9.00	1.000	3
	SP	4.00	1.000	3
	Total	7.00	2.449	9
S6	NO	10.33	.577	3
	CV	10.00	2.646	3
	SP	5.33	.577	3
	Total	8.56	2.789	9
SV2	NO	17.00	4.359	3
	CV	14.33	3.055	3
	SP	12.00	3.000	3
	Total	14.44	3.745	9
SV4	NO	12.33	3.055	3
	CV	12.33	2.082	3
	SP	13.00	2.000	3
	Total	12.56	2.128	9
SV6	NO	15.00	2.646	3
	CV	17.00	5.292	3
	SP	12.67	2.082	3
	Total	14.89	3.655	9
Total	NO	13.13	5.713	24
	CV	13.17	5.600	24
	SP	8.42	4.211	24
	Total	11.57	5.614	72

### Levene's Test of Equality of Error Variances<sup>a</sup>

Dependent Variable: Histopatologi

F	df1	df2	Sig.
1.036	23	48	.445

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+KLP+ALG+KLP \* ALG



**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Histopatologi  
Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K	V	-12.33*	1.250	.000	-16.29	-8.37
	S2	-.44	1.250	1.000	-4.40	3.51
	S4	.44	1.250	1.000	-3.51	4.40
	S6	-1.11	1.250	.986	-5.07	2.85
	SV2	-7.00*	1.250	.000	-10.96	-3.04
	SV4	-5.11*	1.250	.004	-9.07	-1.15
	SV6	-7.44*	1.250	.000	-11.40	-3.49
V	K	12.33*	1.250	.000	8.37	16.29
	S2	11.89*	1.250	.000	7.93	15.85
	S4	12.78*	1.250	.000	8.82	16.74
	S6	11.22*	1.250	.000	7.26	15.18
	SV2	5.33*	1.250	.002	1.37	9.29
	SV4	7.22*	1.250	.000	3.26	11.18
	SV6	4.89*	1.250	.006	.93	8.85
S2	K	.44	1.250	1.000	-3.51	4.40
	V	-11.89*	1.250	.000	-15.85	-7.93
	S4	.89	1.250	.996	-3.07	4.85
	S6	-.67	1.250	.999	-4.63	3.29
	SV2	-6.56*	1.250	.000	-10.51	-2.60
	SV4	-4.67*	1.250	.011	-8.63	-.71
	SV6	-7.00*	1.250	.000	-10.96	-3.04
S4	K	-.44	1.250	1.000	-4.40	3.51
	V	-12.78*	1.250	.000	-16.74	-8.82
	S2	-.89	1.250	.996	-4.85	3.07
	S6	-1.56	1.250	.914	-5.51	2.40
	SV2	-7.44*	1.250	.000	-11.40	-3.49
	SV4	-5.56*	1.250	.001	-9.51	-1.60
	SV6	-7.89*	1.250	.000	-11.85	-3.93
S6	K	1.11	1.250	.986	-2.85	5.07
	V	-11.22*	1.250	.000	-15.18	-7.26
	S2	.67	1.250	.999	-3.29	4.63
	S4	1.56	1.250	.914	-2.40	5.51
	SV2	-5.89*	1.250	.001	-9.85	-1.93
	SV4	-4.00*	1.250	.046	-7.96	-.04
	SV6	-6.33*	1.250	.000	-10.29	-2.37
SV2	K	7.00*	1.250	.000	3.04	10.96
	V	-5.33*	1.250	.002	-9.29	-1.37
	S2	6.56*	1.250	.000	2.60	10.51
	S4	7.44*	1.250	.000	3.49	11.40
	S6	5.89*	1.250	.001	1.93	9.85
	SV4	1.89	1.250	.798	-2.07	5.85
	SV6	-.44	1.250	1.000	-4.40	3.51
SV4	K	5.11*	1.250	.004	1.15	9.07
	V	-7.22*	1.250	.000	-11.18	-3.26
	S2	4.67*	1.250	.011	.71	8.63
	S4	5.56*	1.250	.001	1.60	9.51
	S6	4.00*	1.250	.046	.04	7.96
	SV2	-1.89	1.250	.798	-5.85	2.07
	SV6	-2.33	1.250	.579	-6.29	1.63
SV6	K	7.44*	1.250	.000	3.49	11.40
	V	-4.89*	1.250	.006	-8.85	-.93
	S2	7.00*	1.250	.000	3.04	10.96
	S4	7.89*	1.250	.000	3.93	11.85
	S6	6.33*	1.250	.000	2.37	10.29
	SV2	.44	1.250	1.000	-3.51	4.40
	SV4	2.33	1.250	.579	-1.63	6.29

Based on observed means.

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

**Grand Mean**

Dependent Variable: Histopatologi

Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
11.569	.312	10.941	12.198

LAMPIRAN 5. Data Hasil PCR



**KEMENTERIAN KELAUTAN DAN PERIKANAN**  
**LABORATORIUM PENGUJI**  
**BALAI KARANTINA IKAN, PENGENDALIAN MUTU DAN KEAMANAN HASIL PERIKANAN KELAS I SURABAYA I**  
 Jl. Raya Bandar Utara Ir. H. Juanda No. 23, Sidoarjo, 61254  
 Telp/fax : 031 - 888069 - 868118 - 6679471 E-mail : btkjuanda@yahoo.co.id

---

**LAPORAN HASIL UJI**  
Report of Analysis

**No.: 0029.UB / LHU / BKI-JS / VII / 2017**

**Nama Customer** : Dr. Uun Yanuhar  
Customer Name

**Pejabat yang Dihubungi** : Dr. Uun Yanuhar No.FPPS: 0029.UB/FPPS/BKI-JS/VII/2017  
Contact Person

**Alamat** : Universitas Brawijaya - Malang  
Address

**TanggalPenerimaan** : 07 Juli 2017  
Received Date

**TanggalPengujian** : 07 - 11 Juli 2017  
Date of Analysis

No.	JENIS SAMPEL TYPE OF SAMPLE	KODE SAMPEL CODE OF SAMPLE	PARAMETER UJI PARAMETER OF TEST	HASIL UJI TEST RESULT	SPEKIFIKASI METODE METHOD SPECIFICATION
1.	Ikan Kerapu	0029a / UB (Otak)	Viral Nervous Necrosis (VNN)	Negative	KMS.4.5BK1-JS (Realtime PCR)
2.	Ikan Kerapu	0029b / UB (Gajal)	Viral Nervous Necrosis (VNN)	Negative	KMS.4.5BK1-JS (Realtime PCR)
3.	Ikan Kerapu	0029c / UB (Uisat)	Viral Nervous Necrosis (VNN)	Negative	KMS.4.5BK1-JS (Realtime PCR)
4.	Ikan Kerapu	0029d / UB (Mata)	Viral Nervous Necrosis (VNN)	Negative	KMS.4.5BK1-JS (Realtime PCR)
5.	Ikan Kerapu	0029e / UB (Daging)	Viral Nervous Necrosis (VNN)	Negative	KMS.4.5BK1-JS (Realtime PCR)
6.	Ikan Kerapu	0029f / UB (Isiung)	Viral Nervous Necrosis (VNN)	Negative	KMS.4.5BK1-JS (Realtime PCR)
7.	Ikan Kerapu	0029g / UB (Hati)	Viral Nervous Necrosis (VNN)	Negative	KMS.4.5BK1-JS (Realtime PCR)

**Catatan / Note** :

1. Hasil uji ini hanya berlaku untuk sampel yang diuji.  
These analytical results are only valid for the tested sample.
2. Laporan Hasil Uji ini terdiri dari 1 (satu) lembar asli (reprint ASLI).  
This Report of Analysis consists of 1 (one) page original (ORIGINAL SIGN).
3. Laporan Hasil Uji ini tidak boleh dipandakan, kecuali secara lisan dan seijin tertulis/Manajer Pusat Balai KIPM Kelas I Surabaya / stempel COPY.  
The Report of Analysis shall not be reproduced (copied) except for the completed one and with the written permission of the Top Manager of Balai KIPM Kelas I Surabaya / (COPY sign).






Surabaya, 11 Juli 2017  
an. Kepala Balai KIPM Kelas I Surabaya I  
Manajer Teknik,



**SUPARDI API**  
NIP. 19660331 199303 1 003

Lampiran 6. Dokumentasi

	<p>Kultur mikroalga <i>N. oculata</i>, <i>C. vulgaris</i> dan <i>S. plantesis</i></p>
	<p>Pengamatan kepadatan sel <i>N. oculata</i>, <i>C. vulgaris</i> dan <i>S. plantesis</i></p>
	<p>Proses Ekstraksi Viral Nervous Necrosis (VNN)</p>
	<p>Pengukuran konsentrasi protein dari ekstraksi VNN menggunakan <i>anodrop-spectrophotometry</i> UV-VIS</p>
	<p>Proses aklimatisasi ikan kerapu cantang diakuarium</p>

	<p>Pengukuran kualitas air</p>
	<p><i>Treatment</i> penelitian pada bak-bak pemeliharaan</p>
	<p>Pembedahan Ikan dan pengambilan organ ikan kerapu (mata dan otak)</p>
	<p>Preparat Histologi dengan pewarnaan Hematoksilin dan Eosin</p>
	<p>Pengamatan Histologi di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran</p>