

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BAHAN AKTIF MIKROALGA
LAUT *Nannochloropsis oculata* SEBAGAI ANTIOKSIDAN YANG
TEREKSPRESI MELALUI MALONDIALDEHIDE (MDA) DAN
SUPEROKSIDA DISMUTASE (SOD) PADA GINJAL IKAN KERAPU
TIKUS (*Cromileptes altivelis*) YANG TERSERANG
BAKTERI *Vibrio alginolyticus***

**LAPORAN SKRIPSI
MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

Oleh :
**ATIEK RAHMAWATY
NIM. 0510810011**



**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
MALANG
2009**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BAHAN AKTIF MIKROALGA
LAUT *Nannochloropsis oculata* SEBAGAI ANTIOKSIDAN YANG
TEREKSPRESI MELALUI MALONDIALDEHID (MDA) DAN
SUPEROKSIDA DISMUTASE (SOD) PADA GINJAL IKAN KERAPU
TIKUS (*Cromileptes altivelis*) YANG TERSERANG
BAKTERI *Vibrio alginolyticus***

Laporan Skripsi Sebagai Salah Satu Syarat Untuk
Memperoleh Gelar Sarjana di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya

Oleh:

ATIEK RAHMAWATY
NIM. 0510810011

Dosen Penguji I

(Prof. Dr. Ir. Hj. Diana Arfiati, M.S)
NIP. 19591230 198503 2001
Tanggal:

Dosen Penguji II

(Ir. M. Mahmudi, M.S)
NIP. 19600505 198601 1004
Tanggal:

Menyetujui,
Dosen Pembimbing I

(DR. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si)
NIP. 19730404 200212 2001
Tanggal:

Dosen Pembimbing II

(Asus Maizar S, SPi. MP)
NIP. 19720529 200312 1001
Tanggal:

Mengetahui,
Ketua Jurusan

(DR. Ir. Happy Nursyam, MS)
NIP. 19600322 198601 1001
Tanggal:

RINGKASAN

ATIEK RAHMAWATY. Skripsi tentang pengaruh pemberian ekstrak bahan aktif mikroalga laut *Nannochloropsis oculata* sebagai antioksidan yang terekspresi melalui Malondialdehid (MDA) dan Superoksida dismutase (SOD) pada ginjal ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) yang terserang bakteri *Vibrio alginolyticus* (dibawah bimbingan **DR. Uun Yanuhar, S.pi, MSi** dan **Asus Maizar S.pi, MP**)

Alga merupakan kelompok tumbuhan yang berklorofil, terdiri dari satu atau banyak sel dan berbentuk koloni. Alga mengandung bahan-bahan organik seperti polisakarida, hormon, vitamin, mineral dan juga senyawa bioaktif (Bachtiar, 2007). Sejauh ini, pemanfaatan alga masih relatif kecil jika dibandingkan dengan keanekaragaman jenis alga yang ada di Indonesia. Salah satu jenis alga laut yang sering dimanfaatkan pada budidaya ikan laut Kerapu adalah *Nannochloropsis oculata*. Berdasarkan penelitian Natrah *et al.*, 2005, diketahui bahwa *Nannochloropsis oculata* memiliki aktivitas antioksidan. Radikal bebas dapat terbentuk akibat adanya serangan bakteri atau virus maupun benda asing terhadap organisme laut terutama pada ikan. Radikal bebas ini kemudian akan bereaksi dengan protein, lipid, karbohidrat, atau DNA. Reaksi antara radikal bebas dan molekul itu berujung pada timbulnya suatu penyakit (Jenny, 2008). Tingkat radikal bebas biasanya dapat dilihat dari kadar Malondialdehid (MDA). Oleh karena hal tersebut perlu adanya suatu cara alternatif yang efektif dan aman. Antioksidan alami merupakan solusi yang tepat dimana senyawa antioksidan akan menetralkan radikal bebas sehingga dapat menghentikan kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas (Kochhar dan Rossell, 1990 dalam Trilaksani, 2003). Tingkat antioksidan dalam tubuh biasanya dapat dilihat melalui pengukuran kadar Superoksida dismutase (SOD).

Tujuan dari penelitian skripsi ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian antioksidan dari ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* terhadap ekspresi radikal bebas berupa MDA dan antioksidan berupa SOD yang terekspresi pada ginjal ikan kerapu tikus yang terinfeksi bakteri *Vibrio alginolyticus*. Pelaksanaan penelitian ini dilakukan di Laboratorium Ilmu-Ilmu Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan dan Laboratorium Farmakologi Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya, yang dimulai pada bulan Mei sampai dengan Juli 2009.

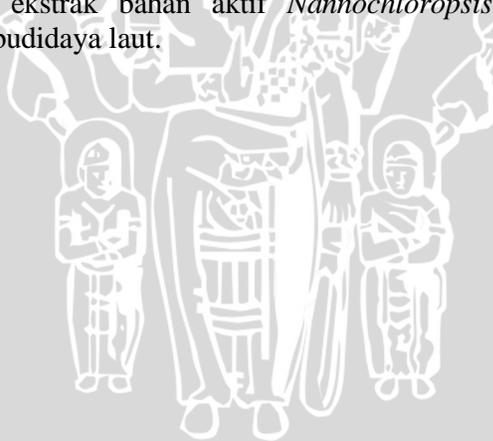
Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap. Penelitian terdiri dari 4 perlakuan dan 3 kali ulangan. Adapun perlakuannya meliputi: A) Ikan kerapu sehat (tanpa penginfeksi dan tanpa pemberian ekstrak bahan aktif); B) Ikan kerapu tanpa diinfeksi bakteri *Vibrio alginolyticus* dan diberi ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata*; C) Ikan kerapu diinfeksi *Vibrio alginolyticus* dan tanpa pemberian ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* dan; D) Ikan kerapu diinfeksi *Vibrio alginolyticus* dan diberi ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis*

oculata. Sampel diambil dari ginjal ikan kemudian dianalisa kadar MDA dan SOD serta sebagai parameter penunjang yaitu pengukuran kualitas air meliputi pH, salinitas dan suhu.

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini adalah ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* terbukti memiliki aktifitas antioksidan yaitu yang tereksresi dari penghambatan pembentukan MDA dan meningkatkan aktifitas enzim SOD pada ginjal ikan kerapu tikus yang terinfeksi *Vibrio alginolyticus*. Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa hubungan kadar MDA dan SOD adalah berbanding terbalik, dimana jika kadar MDA menurun maka kadar SOD mengalami peningkatan.

Data dari pengukuran kualitas air yang meliputi parameter salinitas, pH, dan suhu didapatkan nilai salinitas berkisar antara 30-32 ppm, pH berkisar antara 7.1-7.5 dan suhu berkisar antara 26-28°C. Hasil pemantauan kualitas air selama penelitian berlangsung tersebut dapat dikatakan homogen dan merupakan kondisi yang optimal bagi kehidupan ikan kerapu tikus.

Saran untuk penelitian ini adalah perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai efek ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* sebagai antioksidan yang tereksresi pada organ selain ginjal untuk mencari ekspresi optimal antioksidan pada ikan kerapu tikus yang terinfeksi bakteri. Dan perlu dilakukan penelitian lanjutan pada organ ginjal cranial, karena organ ginjal cranial letaknya berada di anterior dan darah setelah dari insang langsung menuju ginjal cranial, oleh karena itu ginjal cranial sering digunakan untuk mendeteksi adanya serangan bakteri atau penyakit pada ikan. Serta perlu adanya penelitian ke lapang mengenai aplikasi pemanfaatan ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* sebagai antioksidan pada ikan budidaya laut.



KATA PENGANTAR

Memanjatkan puji syukur kehadirat Alloh SWT atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya serta sholawat serta salam semoga tetap dilimpahkan kepada junjungan kita Nabi Muhammad SAW beserta keluarganya.

Dengan terealisasinya skripsi ini penulis menyadari masih banyak kekurangan akibat terbatasnya pengetahuan penulis. Namun atas bantuan dari beberapa pihak yang membantu dan menyumbangkan pengetahuan serta dukungan morilnya.

Seiring puji syukur kehadirat Alloh SWT, penulis ingin menghaturkan terima kasih yang teramat dalam kepada:

1. Ayahanda Nuruddin Musa Bc. Ip., S.H., M.H dan Ibunda Mursidah S.Ag., M.Ag., yang telah memberikan dukungan moril, spirituil, serta materiil yang tidak pernah putus hingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
2. Ibu Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.Si. selaku dosen pembimbing utama, yang telah dengan sabar membimbing dan mengarahkan penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
3. Bapak Asus Maizar, S.Pi., M.P. selaku dosen pembimbing kedua, atas bimbingan serta arahan di sela-sela kesibukannya hingga skripsi ini dapat terselesaikan.
4. Prof. Dr. Hj. Ir. Diana Arfiati, M.S. selaku dosen penguji pertama, atas masukan serta arahnya dalam menyempurnakan skripsi ini.
5. Ir. M. Mahmudi, M.Si. selaku dosen penguji kedua, atas kritik dan masukannya serta arahnya dalam menyempurnakan skripsi ini.
6. Marissa dan Bambang teman satu team penelitian, atas kerja sama team yang saling mendukung satu sama lain selama penelitian berlangsung hingga terselesaikannya laporan skripsi ini.
7. Rekan-rekan yang telah memberikan dorongan dan bantuan dalam penyusunan laporan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa setiap manusia mempunyai keterbatasan dalam segala hal dan skripsi ini masih sangat jauh dari sempurna sehingga masukan dan kritik akan selalu penulis harapkan untuk memperbaiki skripsi ini. Akhir kata penulis mohon maaf jika dalam pembuatan skripsi ini penulis melakukan kesalahan baik yang disengaja maupun yang tidak disengaja. Semoga Alloh SWT mengampuni kesalahan kita dan berkenan menunjukkan jalan yang benar.

Malang, November 2009

Penulis

DAFTAR ISI

RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Maksud dan Tujuan	5
1.4 Kegunaan	6
1.5 Lokasi dan Waktu Penelitian	6
II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Nannochloropsis oculata</i>	7
2.1.1 Klasifikasi	7
2.1.2 Morfologi	7
2.1.3 Pola pertumbuhan sel algae	9
2.2 Kandungan Antioksidan pada Algae	11
2.2.1 Malondialdehida (MDA)	12
2.2.2 Superoksida dismutase (SOD)	16
2.2.3 Organ ginjal pada Ikan	17
2.3 Ikan Kerapu Tikus	18
2.3.1 Klasifikasi	18
2.3.2 Morfologi	19
2.3.3 Manfaat antioksidan untuk ikan	19
2.4 <i>Vibrio alginolyticus</i>	20
2.4.1 Klasifikasi	20
2.4.2 Morfologi	21

2.4.3 Persebaran	21
2.4.4 Patogenisitas.....	22

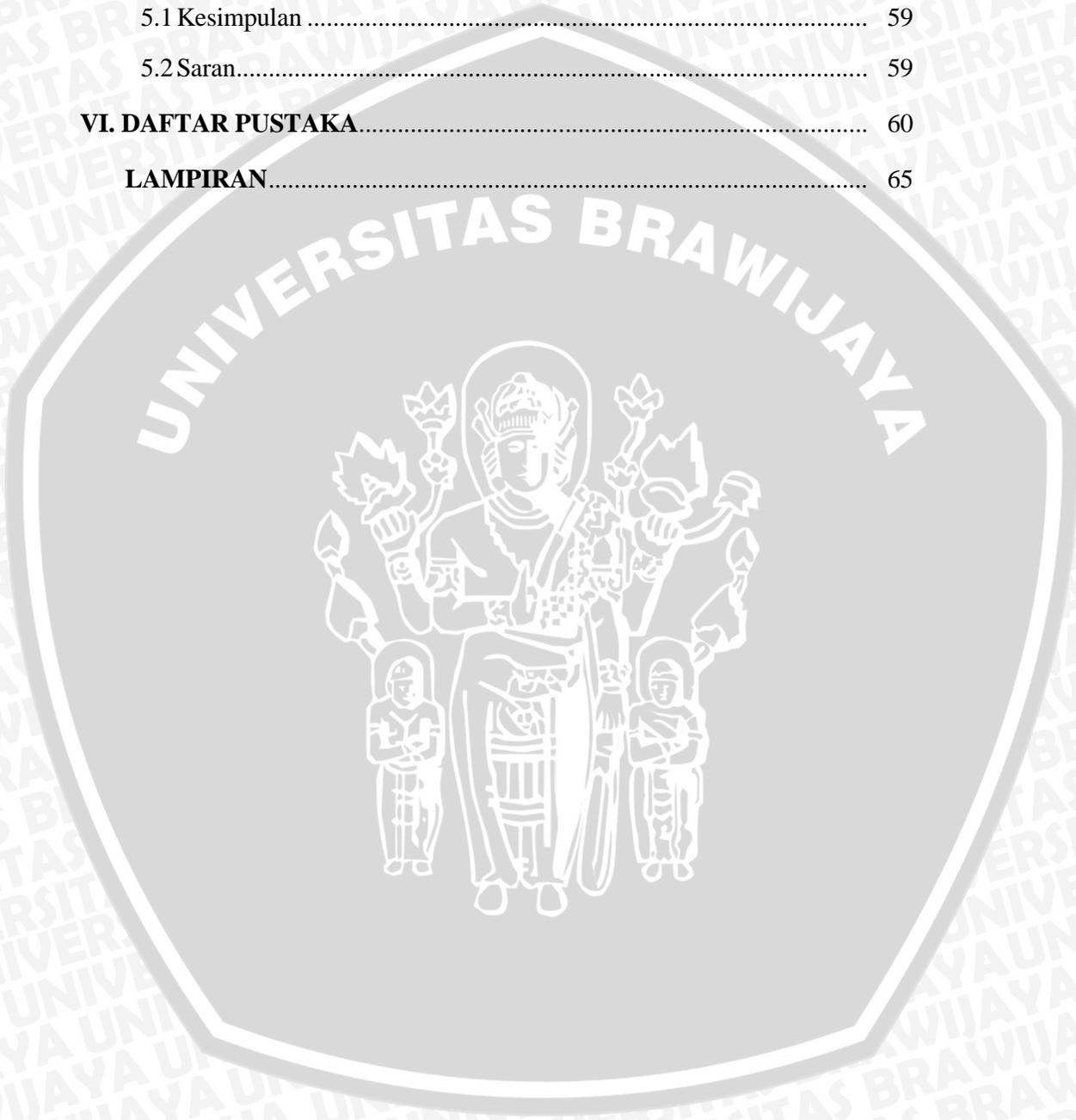
III MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian.....	23
3.1.1 Alat.....	23
3.1.2 Bahan	23
3.2 Metode dan Rancangan Penelitian.....	23
3.2.1 Metode penelitian.....	23
3.2.2 Rancangan penelitian.....	24
3.2.3 Denah percobaan.....	25
3.3 Prosedur Penelitian.....	26
3.3.1 Pengambilan sampel	26
3.3.2 Preparasi sampel <i>Nannochloropsis oculata</i>	26
3.3.3 Ekstraksi <i>Nannochloropsis oculata</i>	27
3.3.4 Pengukuran kualitas air.....	27
3.3.5 Ujiantang pada ikan kerapu tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>).....	27
3.3.6 Pengukuran kadar MDA (Malondyaldehid).....	28
3.3.7 Pengukuran aktivitas SOD (Superoksid dismutase)	29
3.4 Analisa Data.....	29

IV HASIL DAN PEMBAHASAN

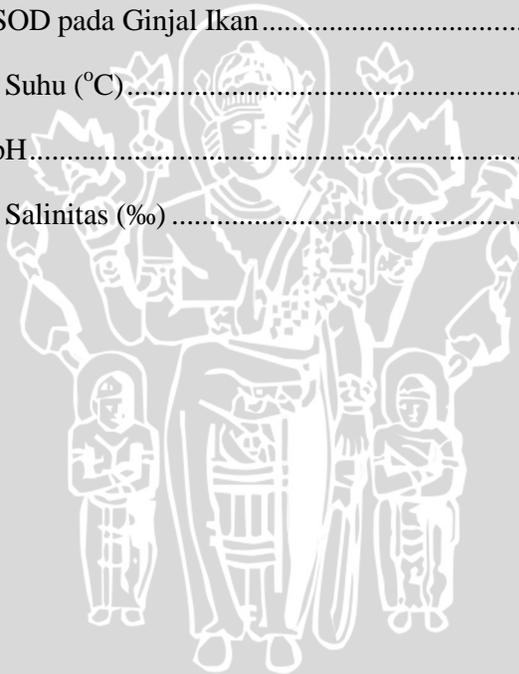
4.1 Perlakuan Ikan Kerapu Tikus	30
4.2 Kadar MDA pada Ginjal Ikan kerapu Tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>)	30
4.2.1 Analisa data kadar MDA ginjal ikan kerapu tikus.....	40
4.3 Kadar SOD Ginjal Ikan Kerapu Tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>).....	42
4.3.1 Analisa data kadar SOD pada ginjal ikan kerapu tikus.....	49
4.4 Ginjal Ikan.....	51
4.5 Hasil Perbandingan Antara Kadar MDA dan SOD pada Ginjal.....	54
4.6 Parameter Pendukung Kualitas Air	56
4.6.1 Suhu	56

4.6.2 pH.....	57
4.6.3 Salinitas.....	58
V.Penutup	59
5.1 Kesimpulan	59
5.2 Saran.....	59
VI. DAFTAR PUSTAKA	60
LAMPIRAN	65



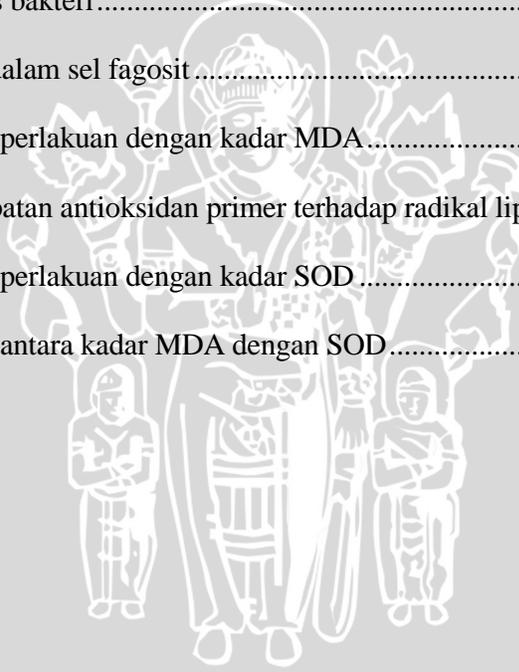
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Proximate Analysis (% of dry weight from algae).....	8
2. Hasil Pengukuran Kadar MDA pada Ginjal Ikan	31
3 Analisis Sidik Ragam Kadar MDA pada Ginjal Ikan	40
4. Uji Tukey kadar MDA pada Ginjal Ikan.....	41
5. Hasil Pengukuran Kadar SOD pada Ginjal Ikan	42
6. Sidik Ragam Analisis Data Kadar SOD pada Ginjal Ikan.....	50
7. Uji Tukey Kadar SOD pada Ginjal Ikan.....	50
8. Hasil Pemantauan Suhu (°C).....	59
9 Hasil Pemantauan pH.....	60
10 Hasil Pemantauan Salinitas (%)	61



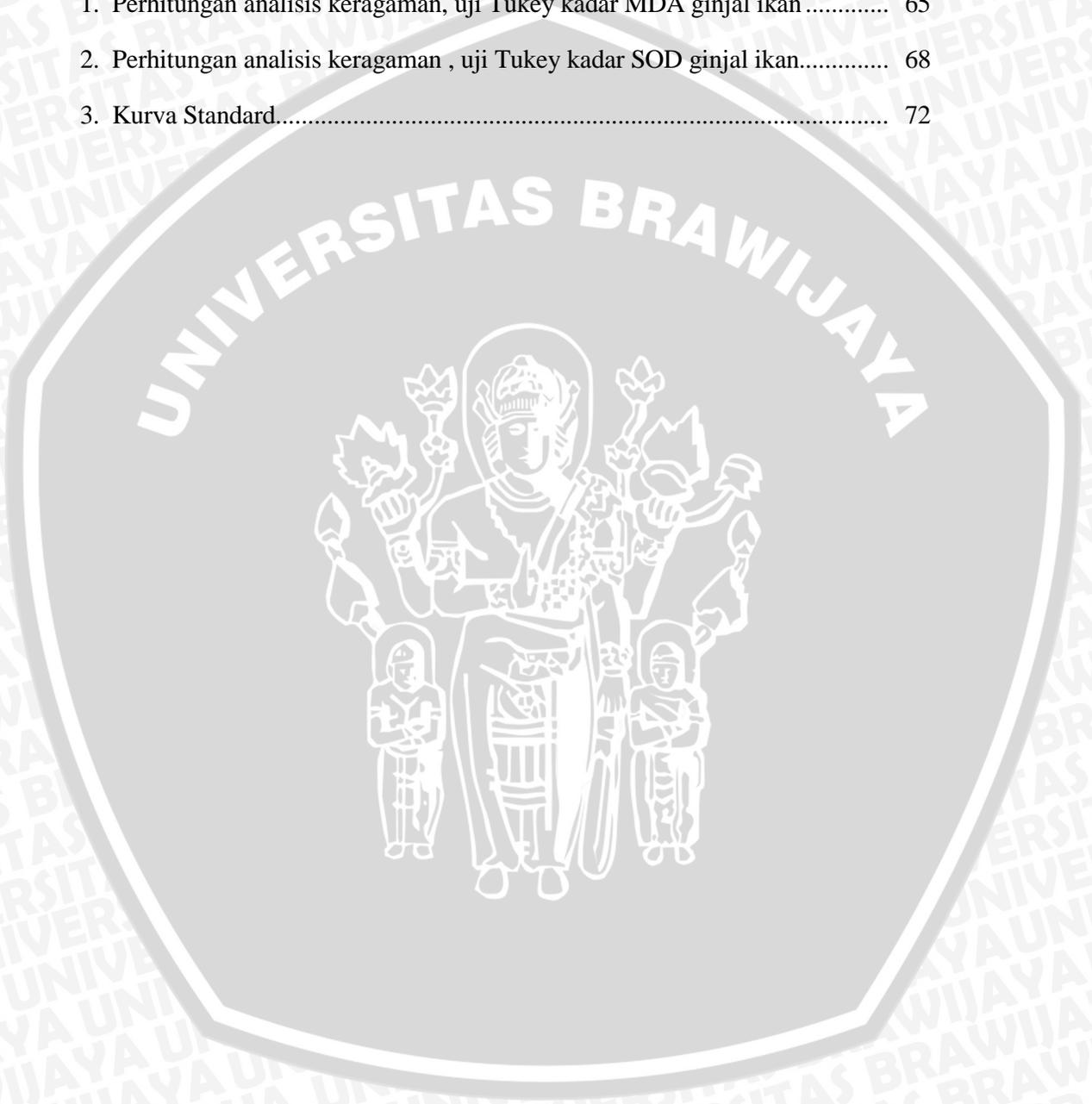
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Nannochloropsis oculata</i>	8
2. Mekanisme pembentukan radikal bebas dan reaksi antioksidan terhadap radikal bebas	13
3. Ikan kerapu tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>).....	19
4. Morfologi bakteri <i>Vibrio alginolyticus</i>	21
5. Denah percobaan.....	25
6. Proses fagositosis bakteri.....	34
7. Proses oksidatif dalam sel fagosit	35
8. Grafik hubungan perlakuan dengan kadar MDA	39
9. Reaksi penghambatan antioksidan primer terhadap radikal lipida	46
10. Grafik hubungan perlakuan dengan kadar SOD	49
11. Grafik hubungan antara kadar MDA dengan SOD.....	55



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Perhitungan analisis keragaman, uji Tukey kadar MDA ginjal ikan.....	65
2. Perhitungan analisis keragaman , uji Tukey kadar SOD ginjal ikan.....	68
3. Kurva Standard.....	72



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Dua pertiga luas wilayah Indonesia adalah lautan yang mempunyai potensi sumberdaya alam yang sangat penting bagi kehidupan bangsa. Potensi tersebut perlu dikelola secara tepat agar dapat dimanfaatkan secara optimal dan lestari bagi kesejahteraan rakyat.

Lingkungan laut Indonesia dengan berbagai macam habitat yang ada di dalamnya tersebar luas di antara dua wilayah laut, wilayah paparan dan wilayah laut dalam. Paparan luas di bagian Barat dan bagian Timur Indonesia yang dipisahkan oleh laut yang dalam memberikan gambaran akan tingginya keragaman makhluk hidup baik berupa tumbuhan air maupun hewan air (Bachtiar, 2007).

Salah satu makhluk hidup yang tumbuh dan berkembang di laut adalah alga. Menurut Bachtiar (2007), ada tiga divisi alga laut yaitu *Cholorophyta* (900 spesies), *Phaeophyta* (1000 spesies), dan *Rhodophyta* (2500 spesies). Ditinjau secara biologi, alga merupakan kelompok tumbuhan yang berklorofil yang terdiri dari satu atau banyak sel dan berbentuk koloni. Didalam alga terkandung bahan-bahan organik seperti polisakarida, hormon, vitamin, mineral dan juga senyawa bioaktif (Bachtiar, 2007). Sejauh ini, pemanfaatan alga masih relatif kecil jika dibandingkan dengan keanekaragaman jenis alga yang ada di Indonesia.

Kegunaan alga sangat beraneka ragam, diantaranya sebagai sumber nutrisi. Salah satu mikroalga yang sangat populer adalah *Spirulina* (*Arthrospira platensis*), termasuk golongan *Cyanobacteria* (*blue-green algae*). Jenis alga

lainnya yang memiliki nilai nutrisi yaitu; *Chlorella* (alga hijau), dan *Dunaliella salina*, mengandung betakaroten tinggi dan berfungsi sebagai suplemen vitamin C (wikipedia, 2006). Akhir-akhir ini penggunaan senyawa antioksidan berkembang dengan pesat baik untuk makanan maupun pengobatan. Hasil penelitian yang ditulis Ignacio Rodriguez-Gacia dan Jose Luis Guil-Guerrero dalam “The Journal Food Chemistry” menerangkan bahwa, ekstrak dari *Porphyridium cruentum*, *Phaeodactylum tricornutum* and *Chlorella vulgaris* berpotensi sebagai antioksidan alami, dan Ekstrak *C. vulgaris* menunjukkan adanya koefisien aktivitas antioksidan lebih tinggi daripada nilai koefisien aktivitas antioksidan yang berasal dari BHA, BHT, *P. Tricornutum* dan *P. cruentum* (Daniells, 2008).

Nannochloropsis oculata merupakan salah satu mikroalga bersel satu dan termasuk pakan alami yang banyak dimanfaatkan untuk pakan ikan yang saat ini telah berhasil diisolasi sebagai stok murni dan dapat dikultur dalam skala massal untuk pasokan pakan alami (Yunus, 2008). *Nannochloropsis* selain sebagai pakan juga dikenal sebagai sumber suplemen yang kaya akan kandungan omega-3 fatty acid (Sukenik *et al.* 1989 dalam <http://chloroplast.ocean.washington.edu>, 2009). Berdasarkan penelitian Natrah *et al.*, 2005, diketahui bahwa *Nannochloropsis oculata* juga memiliki aktivitas antioksidan dengan menghambat terbentuknya lipid peroksida dari asam linoleat. *Nannochloropsis oculata* juga dapat dimanfaatkan sebagai salah satu sumber antioksidan, utamanya dapat diaplikasikan pada ikan laut budidaya.

Sumber ROS (Reactive Oksidatif Species) juga dapat terbentuk akibat adanya serangan bakteri atau virus maupun benda asing terhadap organisme laut terutama pada ikan. Serangan bakteri atau virus dalam tubuh ikan nantinya akan

menimbulkan reaksi sistem pertahanan tubuh ikan. Pertahanan awal tubuh salah satunya adalah fagositosis oleh sel darah putih (neutrofil dan makrofag), yaitu sel-sel fagosit yang melawan bakteri dan virus (Gropper *et al*, 2005). Saat fagositosis berlangsung, sel fagosit akan mengkonsumsi sekitar 70-90 % O_2 , dan mengubahnya menjadi radikal oksigen yaitu superoksida (O_2^-) dan bersama dengan superoksida hidroksil ($^{\cdot}OH$) serta asam hipoklorit ($HOCl$) membentuk hidrogen peroksida (H_2O_2) dan hidroperoksil radikal yang bersifat toksik bagi organisme. Selanjutnya superoksida akan bereaksi dengan nitric oksid (NO^{\cdot}), menjadi peroksil nitrit ($ONOO^{\cdot}$), nitroksil, dan nitrogen dioksida (Gropper *et al.*, 2005). Senyawa yang terbentuk tersebut bersifat radikal bebas dan sangat reaktif. Radikal bebas tersebut kemudian akan bereaksi dengan protein, lipid, karbohidrat, atau DNA yang kemudian akan berujung pada timbulnya suatu penyakit (Jenny, 2008).

Malondialdehid (MDA) merupakan produk oksidasi asam lemak tidak jenuh oleh radikal bebas. Disamping itu MDA juga merupakan metabolit komponen sel yang dihasilkan oleh radikal bebas. Oleh sebab itu, konsentrasi MDA yang tinggi menunjukkan adanya proses oksidasi dalam membran sel (Conti, et al. (1991) serta Halliwell dan Gutteridge (1985) dalam Winarsi, 2007).

Superoksid dismutase (SOD) adalah enzim yang berfungsi sebagai katalisator reaksi dismutasi dari anion superoksida menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan oksigen (O_2) (Winarsi, 2007). Aktivitas enzim SOD memiliki peranan sangat penting dalam sistem pertahanan tubuh, terutama terhadap aktivitas senyawa oksigen reaktif yang dapat menyebabkan stress oksidatif (Beyer, et al., 1991; Bowler, et al., 1992; Scandalis, 1993; Winarsi, 2007).

Penyakit vibriosis dapat menyerang budidaya ikan kerapu dalam Keramba Jaring Apung Budidaya (KJA), ikan Kerapu adalah salah satunya. Vibriosis disebabkan oleh bakteri-bakteri yang tergolong dalam genus *Vibrio*. Beberapa spesies bersifat pathogen dan dapat menyebabkan penyakit *epizootic* yang serius, namun beberapa spesies yang lain hanya bersifat pathogen oportunistis yang menimbulkan penyakit apabila ikan mengalami luka fisik, luka akibat parasit dan stress (Zafran *et al.*, 1998 dalam Nitimulyo *et al.*, 2005). Ikan kerapu yang terserang vibriosis pada umumnya memberikan gejala penurunan nafsu makan, pembusukan sirip, pop eyes (penyakit mata terlihat membesar dan memerah), dan akumulasi cairan di bagian abdomen (Murtidjo, 2001). Seperti yang telah dijelaskan diawal, serangan bakteri pada organisme secara tidak langsung akan menyebabkan peningkatan produksi radikal bebas oleh sel fagosit. Radikal bebas ini akan menimbulkan radikal bebas lainnya sehingga timbul penyakit degeneratif.

Upaya penanggulangan radikal bebas ini perlu adanya suatu pemecahan yang tepat dan aman bagi ikan maupun lingkungan. Berbagai jenis antioksidan buatan maupun bahan kimia lainnya telah sering digunakan. Namun penggunaannya berdampak negatif yaitu terjadi penumpukan residu pada daging ikan dan udang serta pencemaran lingkungan (Wu, *et al.* 1981; Elis, 1988; Nitimulyo, 2005). Penggunaan antioksidan alami merupakan solusi yang tepat dimana antioksidan alami yang dapat diperoleh dari bahan alami seperti alga laut yang kaya akan senyawa aktif. Senyawa aktif ini dapat berperan sebagai antioksidan yaitu bereaksi dengan radikal bebas untuk mengubahnya menjadi senyawa yang tidak reaktif, sehingga dapat menghentikan kerusakan yang

disebabkan oleh radikal bebas dan mencegah terjadinya reaksi antioksidasi radikal bebas dalam oksidasi lipid (Kochhar dan Rossell, 1990 dalam Trilaksani, 2003).

Mikroalgae laut *Nannochloropsis oculata* merupakan salah satu kandidat sumber antioksidan yang potensial, namun penggunaannya masih jarang oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap ikan kerapu tikus yang terinfeksi bakteri *Vibrio alginolyticus*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang, dapat dirumuskan masalah, sebagai berikut:

- Apakah pemberian antioksidan dari hasil ekstraksi bahan aktif *Nannochloropsis oculata* dapat memberi pengaruh terhadap ekspresi MDA dan SOD pada ginjal ikan kerapu tikus yang terinfeksi bakteri *Vibrio alginolyticus* ?

1.3 Maksud dan Tujuan

1.3.1 Maksud

Maksud dari penelitian ini adalah:

- Mempelajari apakah pemberian antioksidan dari hasil ekstraksi bahan aktif *Nannochloropsis oculata* dapat terekspresi pada MDA dan SOD pada ginjal ikan kerapu tikus yang terinfeksi bakteri *Vibrio alginolyticus*.

1.3.2 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah:

- Untuk mengetahui pengaruh pemberian antioksidan dari hasil ekstraksi bahan aktif *Nannochloropsis oculata* terhadap ekspresi radikal bebas berupa MDA dan antioksidan berupa SOD yang terekspresi pada ginjal ikan kerapu tikus yang terinfeksi bakteri *Vibrio alginolyticus*.

1.4 Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang:

- Pemanfaatan ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* sebagai antioksidan untuk meningkatkan daya tahan ikan kerapu tikus yang terinfeksi bakteri *Vibrio alginolyticus*.

1.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Ilmu-Ilmu Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, yang dimulai pada bulan Mei sampai dengan Juli 2009.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Nannochloropsis oculata*

2.1.1 Klasifikasi

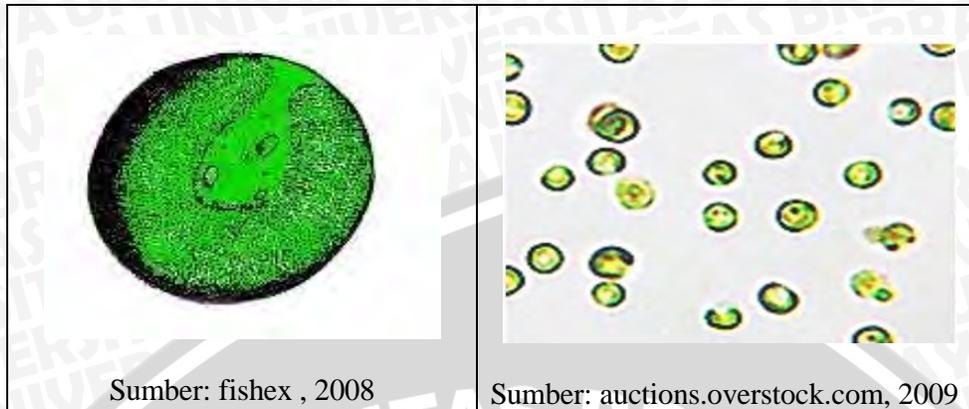
Berdasarkan Hibberd, 1981 *dalam* Guiry (2008), klasifikasi mikroalga

Nannochloropsis oculata dapat dijabarkan sebagai berikut:

Filum	: Ochrophyta
Subfilum	: Phaeista
Infrafilum	: Chrysista
Superklas	: Limnistia
Klas	: Eustigmatophyceae
Genus	: <i>Nannochloropsis</i>
Species	: <i>Nannochloropsis oculata</i>

2.1.2 Morfologi

Nannochloropsis oculata adalah alga bersel satu yang termasuk ke dalam kelas Eustigmatophyceae, yang biasa di kenal sebagai *marine chlorella* dan umumnya dibudidayakan di pembenihan ikan sebagai pakan rotifer. Memiliki klorofil a dan selnya berbentuk bulat serta soliter, ukuran selnya berkisar 4-6µm. (Fisher *et al.* 1998, *dalam* Chloroplast Ocean Washington.com, 2008). Spesies ini biasanya hidup di habitat air laut. *Nannochloropsis* merupakan spesies yang banyak digunakan sebagai pakan dalam budidaya dan telah diusulkan sebagai sumber utama asam lemak omega-3. (Sukenik *et al.* 1989, *dalam* Chloroplast Ocean Washington.com, 2008). *Nannochloropsis oculata* ada pada Gambar 1.



Sumber: fishex , 2008

Sumber: auctions.overstock.com, 2009

Gambar 1. *Nannochloropsis oculata*

Nannochloropsis oculata selnya berbentuk bola (bulat kecil), berukuran kecil dengan diameter 4-6 μm yang berwarna kehijauan, tidak motil, dan tidak berflagel (Chilmawati, 2007). Kandungan nutrisi sel *Nannochloropsis oculata* adalah seperti yang terdapat pada Tabel 1.

Tabel 1. Proximate Analysis (% of dry weight from algae)

	<u>Nannochloropsis</u>
Dry Weight	IA 2000 - 10.46% IA 4000 - 20.5%
Calories (from algae / 100 ml of <i>Instant Algae 4000</i>)	48.4
Vitamin C (Ascorbic Acid)	0.85%
Chlorophyll A	0.89%
Protein	52.11 %
Carbohydrate	12.32 %
Lipid	27.64 %
<u>EPA</u> (20:5n3) - % of Lipid	25%
<u>ARA</u> (18:2n-6) - % of Lipid	5.26%
<u>DHA</u> (22:6n3) - % of Lipid	0

Sumber : Toonen,1999

2.1.3 Pola pertumbuhan sel algae

Berdasarkan Chilmawati (2009) selama periode kultur sel mikro algae terjadi 5 tipe tahapan pertumbuhan yaitu:

1. Pertumbuhan *phase lag*, yaitu pertumbuhann fase awal dimana penambahan kelimpahan sel yang terjadi jumlahnya sedikit. Fase ini mudah diobservasi ketika suatu kultur algae ditransfer dari suatu tempat ke suatu media kultur. pada fase ini biasanya terjadi stressing fisiologi karena terjadi perubahan kondisi lingkungan media hidup dari satu media awal ke media yang baru. Dilain pihak kelarutan mineral dan nutrien mungkin lebih banyak daripada sebelumnya, sehingga akan mempengaruhi sintesis metabolik dari konsentrasi rendah ke konsentrasi yang tinggi. Dari perubahan-perubahan inilah maka sel algae mengalami proses penyesuaian.
2. Setelah *phase lag*, algae kultur akan mengalami pertumbuhan secara cepat, atau yang disebut fase pertumbuhan eksponensial. Hal ini ditandai dengan penambahan jumlah sel yang sangat cepat melalui pembelahan sel algae dan apabila dihitung secara matematis membentuk fungsi logaritma. Untuk kepentingan budidaya sebaiknya sel algae dipanen pada akhir fase eksponensial. Karena pada fase ini struktur sel masih normal secara nutrisi terjadi keseimbangan antara nutrien dalam media dan kandungan nutrisi dalam sel. Selain itu berdasarkan hasil penelitian, pada fase akhir exponensial, didapatkan kandungan protein dalam sel sangat tinggi, sehingga kualitas sel algae benar-benar terjaga untuk kepentingan kultivan budidaya lebih lanjut.

3. Pada tahapan *Declining Growth Phase*, pola pertumbuhan terjadi pengurangan kecepatan pertumbuhan sampai mencapai fase awal pertumbuhan yang stagnan. Fase ini ditandai dengan berkurangnya nutrisi dalam media sehingga mempengaruhi kemampuan pembelahan sel sehingga hasil produksi sel semakin berkurang. Kelimpahan sel masih terjadi pertumbuhan namun nilai nutrisi dalam sel mengalami penurunan, maka untuk kepentingan budidaya perikanan pada fase ini adalah alternatif kedua untuk dilakukan pemanenan.
4. *Stationery phase*, adalah fase pertumbuhan ketika kelimpahan sel mengalami pertumbuhan konstan akibat dari keseimbangan katabolisme dan anabolisme sel. Pada fase ini ditandai dengan rendahnya tingkat nutrisi dalam sel dan biasanya untuk kelimpahan sel algae yang rendah dalam kultur terjadi fase stationery yang pendek sehingga menyulitkan didalam pemanenan. Disarankan jangan melakukan pemanenan sel pada fase ini karena bukan merupakan sumber pakan yang mengandung nutrisi yang tinggi.
5. *Death phase*, adalah fase kematian sel karena terjadi perubahan kualitas air yang semakin memburuk, penurunan nutrisi dalam media kultur dan kemampuan sel yang sudah tua untuk melakukan metabolisme. Kenyataan ini biasanya ditandai dengan penurunan jumlah sel yang cepat. Secara morfologi pada fase ini sel algae banyak terjadi kematian dari pada melakukan pembelahan, warna air kultur berubah, terjadi buih di permukaan media kultur dan warna yang pudar serta gumpalan sel algae yang mengendap didasar wadah kultur. Untuk kepentingan budidaya perikanan pada fase ini dilarang untuk digunakan sebagai pakan kultivan budidaya.

2.2 Kandungan Antioksidan pada Alga

Antioksidan dapat menghentikan proses oksidasi dengan cara bereaksi dengan radikal bebas, mengikat ion logam dan juga sebagai penangkap radikal bebas. Antioksidan terdapat dalam tubuh (endogen) dan juga berasal dari luar tubuh (eksogen). Antioksidan eksogen dapat berasal dari makanan tambahan seperti vitamin C, vitamin E, betakaroten dan flavonoid yang dalam beberapa penelitian terbukti mampu mereduksi radikal bebas menjadi bentuk tidak toksik (Gitawati, 1995; Sidik, 1997 dalam Astuti (2009)).

Alga merupakan kelompok tumbuhan berklorofil yang terdiri dari satu atau banyak sel dan berbentuk koloni. Didalam alga terkandung bahan-bahan organik seperti polisakarida, hormon, vitamin, mineral dan juga senyawa bioaktif. Kemampuan alga untuk memproduksi metabolit sekunder terhalogenasi yang bersifat sebagai senyawa bioaktif dimungkinkan terjadi, karena kondisi lingkungan hidup alga yang ekstrem seperti salinitas yang tinggi atau akan digunakan untuk mempertahankan diri dari ancaman predator (Putra, 2003).

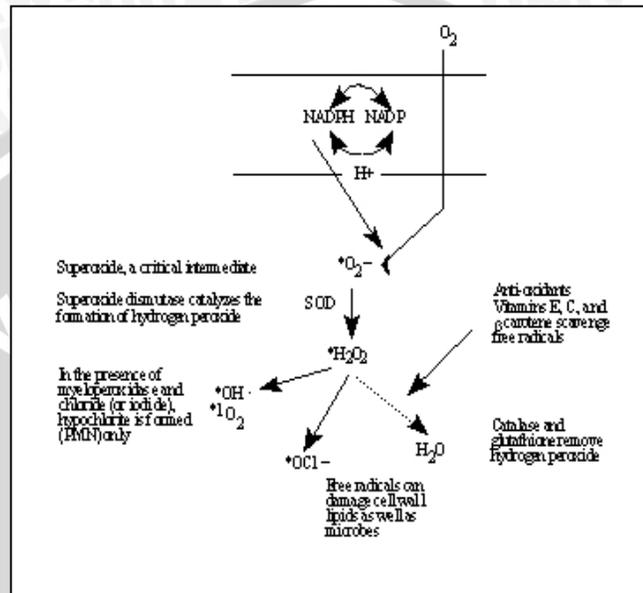
Trilaksani (2003) menjelaskan bahwa, terdapat banyak bahan pangan yang dapat menjadi sumber antioksidan alami, seperti rempah-rempah, teh, biji-bijian, buah-buahan, sayur-sayuran dan tumbuhan/alga laut. Bahan pangan ini mengandung jenis senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan, seperti asam amino, asam askorbat, golongan flavonoid, tokoferol, karotenoid, tannin, peptida, melanoidin, produk-produk reduksi, dan asam-asam organik lain (Pratt (1992) dalam Trilaksani, 2003). Tumbuhan laut yang diketahui mempunyai senyawa antioksidan adalah *Gelidiopsis* sp.

Hasil penelitian Natrah *et al.* (2003) menjelaskan bahwa, enam jenis mikroalga dalam ekstrak kasar methanol (*Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans*, *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata* dan *Tetraselmis tetrahele*) aktif dalam menghambat pembentukan lipid peroksidasi dari *linoleic acid*. Diantara semua mikroalga, *I. galbana* dan *C. calcitrans* menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi (>90%), hal ini diperkirakan bahwa mikroalga tersebut mengandung senyawa aktif untuk memberi perlindungan dari lipid peroksidasi. Kedua mikroalga tersebut diketahui kaya akan kandungan nutrisi. Contohnya, *I. galbana* persentase rata-rata komposisi protein, karbohidrat, dan lemak berturut-turut yaitu; 47.9 ± 2.5 ; 26.8 ± 0.2 ; $14.5 \pm 1.4\%$, sedangkan nilai dari *C. calcitrans* berturut-turut yaitu 36.4 ± 1.7 ; 27.4 ± 3.0 ; $15.5 \pm 0.9\%$. Mikroalga tersebut mengandung tingkat tinggi omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) ($28.0\% \pm 0.7$ dalam *I. galbana* dan $28.5\% \pm 1.4$ pada *C. calcitrans*), omega-6 PUFA ($6.5\% \pm 1.8$ pada *I. galbana* dan $23.0\% \pm 2.5$ pada *C. calcitrans*).

2.2.1 Malondialdehyde (MDA)

Malondialdehyde adalah senyawa organik dengan bentuk $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$. Struktur senyawa ini lebih kompleks daripada struktur yang diperkirakan. Pembentukan senyawa reaktif ini secara natural dan merupakan penyebab terjadinya stres oksidatif (Wikipedia, 2009). Gropper *et al.*, (2005) menjelaskan bahwa, radikal bebas merupakan atom atau molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Ketidakeimbangan elektron pada orbital menimbulkan radikal bebas yang sangat reaktif. Salah satu penyebab

pembentukan radikal bebas karena terjadinya infeksi bakteri sehingga memicu proses fagositosis. Mekanisme pembentukan radikal bebas yang disebabkan fagositosis sel bakteri dan mekanisme antioksidan ditunjukkan pada gambar 2.



Gambar 2. Mekanisme pembentukan radikal bebas dan Reaksi Antioksidan terhadap radikal bebas. www.pkukmweb.ukm.html

Mekanisme pembentukan radikal bebas dan reaksi antioksidan pada Gambar

3 dapat dijelaskan sebagai berikut:

1. Proses oksidatif diawali dengan peningkatan pengambilan oksigen oleh fagosit dan dimulainya suatu proses kompleks yang mengaktifkan enzim oksidase NADPH (*NADPH-dependent oxidase*) pada membran. Enzim ini menurunkan O_2 menjadi $O_2^{\bullet -}$ (superoksida), yang akan dirembeskan ke dalam fagosom.
2. Dalam fagosom, $O_2^{\bullet -}$ akan membantu pengrusakan bakteri, virus, dan benda asing lainnya di dalam leukosit. Proses ini menghasilkan radikal H_2O_2 (hidrogen peroksida).

Propagasi mengikuti tahap inisiasi dengan menghasilkan bentuk suatu reaksi yang akan digunakan sebagai pereaksi dalam reaksi lainnya. Contohnya oksigen, dapat bereaksi dengan radikal lipid carbon terpusat untuk menjadi radikal peroksil seperti dibawah ini:



Oksigen juga dapat bereaksi dengan polyunsaturated fatty acids (LH) untuk membentuk radikal karbon terpusat dan radikal hidroksil:



Pada reaksi propagasi, radikal peroksil kemungkinan menyerang polyunsaturated fatty acid lainnya (L'H) dalam membrane sel yang menjadi lipid peroksid (LOOH) dan radikal karbon terpusat lainnya:



Peroksida lipid (LOOH) bersifat tidak stabil. Dengan adanya logam katalisator Fe atau lainnya, senyawa LOOH akan berpartisipasi dalam reaksi fenton dan mengawali pembentukan radikal alkoksi yang reaktif. Keberadaan Fe tidak hanya menyebabkan propagasi, namun lebih dari itu akan menyebabkan reaksi amplifikasi sehingga membentuk 2 radikal. Winarsi (2007) menjelaskan reaksi tersebut sebagai berikut:

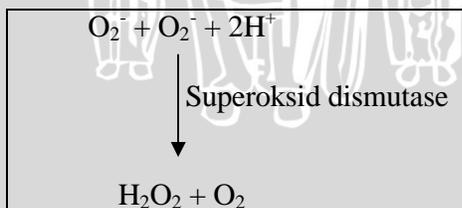
- a. $LOOH + Fe^{++} \longrightarrow OH^- + LO' + Fe^{++}$
- b. $LOO' + LH \longrightarrow L' + LOOH$
- c. $\cdot R + O_2 \longrightarrow LOO'$
- d. $\cdot OH + LH \longrightarrow L' + H_2O$

2.2.2 Superoksid dismutase (SOD)

Superoksida dismutase (SOD) merupakan enzim yang dikenal sebagai protein yang mengandung Cu. Enzim SOD melindungi sel-sel tubuh dan mencegah terjadinya proses peradangan yang diakibatkan oleh radikal bebas. Enzim ini terdapat dalam semua organisme aerob, dan sebagian besar berada dalam tingkat subseluler (intraseluler). Organisme aerob selalu membutuhkan oksigen untuk hidupnya, namun dalam setiap aktivitasnya dapat menimbulkan senyawa oksigen reaktif atau radikal bebas oksigen (Winarsi, 2007).

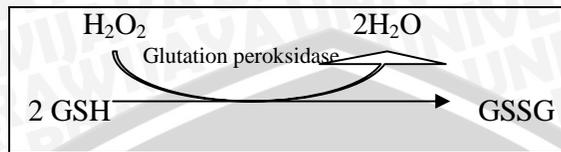
SOD mempunyai substrat yang spesifik yaitu ion superoksida. Aktifitas SOD terhadap ion superoksida akan dihasilkan hidrogen peroksida. Di dalam sel, terdapat dua macam SOD yaitu Cu-Zn SOD yang aktif di dalam sitosol dan Mn SOD yang aktif di dalam mitokondria. Peran tembaga sebagai kofaktor maupun pengatur enzim SOD cukup besar (Kumalaningsih, 2007).

Yuad (2008) menjelaskan, bahwa peranan enzim Superoxide Dismutase (SOD) mengkatalisis dismutasi dari superoksid menjadi hidrogen peroksida dan oksigen. Reaksi tersebut ditunjukkan sebagai berikut:



Kazuko, 2003. Rayman MP., 2004 dalam Yuad (2008) menjelaskan bahwa reaksi selanjutnya konversi H_2O_2 menjadi $2\text{H}_2\text{O}$ dan O_2 oleh *glutation peroksidase*, Enzim *glutation peroksidase* mengkatalisa berbagai hidroperoksida, lipid peroksida, dan lipid peroksinitrit. *Glutation peroksidase* mereduksi H_2O_2 menjadi

H_2O dan *glutation disulfide* (GSSG) dengan bantuan *glutation tereduksi* (GSH) reaksi terjadi sebagai berikut:



Gropper *et al.*, 2005 menjelaskan bahwa katalase merupakan enzim yang dapat menghilangkan hidrogen peroksid. Enzim katalase ditemukan pada peroksisom dan terdapat juga dalam jumlah kecil pada sitosol, mitokondria, dan sel mikrosom. Neutrofil dan sel darah putih lainnya mengandung katalase dalam jumlah besar untuk membuang hidrogen peroksid yang tidak dibutuhkan dalam respiratory burst untuk fagositosis bakteri, virus dan fungi. Reaksi katalis oleh enzim katalase terjadi sebagai berikut:



2.3 Organ Ginjal pada Ikan

Anatomi ginjal ikan secara keseluruhan bervariasi pada setiap spesies. Ginjal ikan terdiri dari dua bagian yang terpisah secara jelas yaitu ginjal cranial (anterior) dan ginjal caudal (posterior). Struktur *excretory* ginjal bergantung pada apakah ikan itu spesies air tawar atau laut. Ginjal spesies ikan laut, memproduksi sejumlah kecil urine kental, memiliki sedikit atau tidak memiliki glomeruli, dan aktif mensekresi ion. Ginjal ikan laut cenderung kekurangan tubula distal, dan memiliki peran yang spesifik untuk sekresi magnesium dan sulfat selain produk metabolisme seperti ammonia. Karena ginjal merupakan saringan yang sempurna, sering digunakan untuk mendeteksi toksin dan bakteri. Meskipun semua bagian

ginjal memiliki jaringan hemopoietic, reticuloendothelia, endocrine, dan exocrine, namun ginjal cranial lebih utama hemopoietic dan ginjal caudal lebih utama *excretory* (Fujaya, 2004).

Ginjal merupakan organ ekskresi pada semua hewan vertebrata. Ginjal mensekresi produk metabolisme seperti ammonia dan berfungsi penting dalam memelihara homeostasi (Panigoro, dkk., (2007) dalam Dominius, 2009). Unit ginjal yang digunakan sebagai organ ekskresi adalah nefron (unit terkecil ginjal). Nefron terdiri dari glomerulus dan tubulus. Glomerulus berfungsi menyaring cairan, sedangkan tubulus mengubah cairan yang disaring menjadi urin. Dengan demikian nefron dapat membersihkan plasma darah dari zat-zat yang tidak dikehendaki ketika melalui ginjal. Filtrasi dapat terjadi pada glomerulus karena jaringan kapiler peritubulus adalah jaringan bertekanan rendah (Fujaya, 2004).

2.3 Ikan Kerapu Tikus

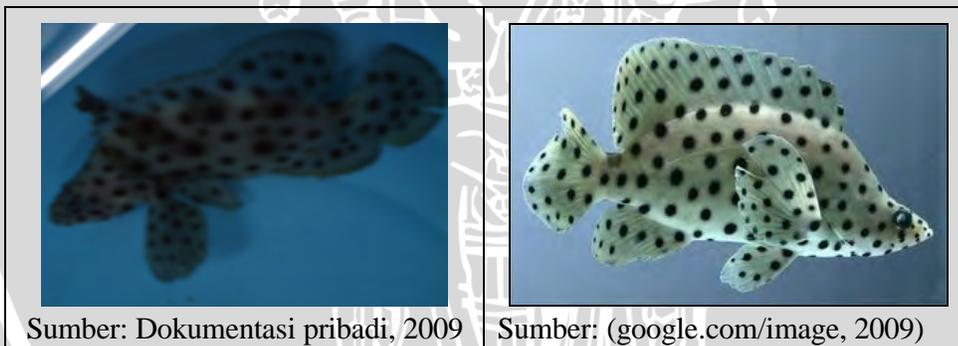
2.3.1 Klasifikasi

Berdasarkan Fishbase (2009) ikan kerapu tikus dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Phylum	: Chordata
Class	: Actinopterygii
Ordo	: Perciformes
Sub Ordo	: Percoidei
Famili	: Serranidae
Genus	: <i>Cromileptes</i>
Spesies	: <i>Cromileptes altivelis</i>

2.3.2 Morfologi

Morfologi Kerapu Tikus yaitu memiliki sirip dorsal (punggung), sirip anal (perut), sirip pectoral (dada), sirip garis lateral (gurut sisi), dan sirip caudal (ekor). Selain sirip, dibagian tubuhnya terdapat sisik yang berbentuk sikloid. Bentuk tubuh bagian punggung meninggi dengan bentuk cembung (concave). Ketebalan tubuh sekitar 6,6-7,6 cm dari panjang spesifik dan panjang tubuh maksimalnya mencapai 70 cm. Ikan ini tidak memiliki gigi canine (gigi yang terdapat pada geraham ikan). Kulitnya berwarna terang abu-abu kehijauan dengan bintik-bintik hitam diseluruh kepala, badan dan sirip. Pada kerapu tikus muda, bintik hitam lebih besar dan sedikit (Akbar dan Sudaryanto, 2002 dalam Hidayati, 2005). Ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) ditampilkan pada Gambar 3.



Sumber: Dokumentasi pribadi, 2009

Sumber: (google.com/image, 2009)

Gambar 3. Ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*)

2.3.3 Manfaat antioksidan untuk ikan

Sumber antioksidan yang sering diberikan pada ikan adalah dari golongan vitamin. Vitamin merupakan zat organik yang diperlukan tubuh ikan dalam jumlah yang sedikit, tetapi sangat penting untuk mempertahankan pertumbuhan dan pemeliharaan kondisi tubuh ikan. Fungsi spesifik vitamin antara lain; vitamin B1, B6, dan B12 untuk menunjang pertumbuhan dan merangsang nafsu makan

ikan. Vitamin B2 berperan dalam pertumbuhan dan pertukaran zat-zat makanan dari sel-sel dalam tubuh ikan serta untuk proses reproduksi. Vitamin A berfungsi untuk menunjang kesehatan mata. Vitamin E berpengaruh terhadap pergerakan ikan maupun dalam proses reproduksi. Vitamin C berpengaruh terhadap kemampuan tubuh dalam mengalami stress dan pertumbuhan ikan. Vitamin C dan E diketahui mempunyai kemampuan meningkatkan aktivitas fagositik makrofag ikan (Hardi *et al.*, 1990 dalam Kordi, 2007).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa salah satu fungsi Vitamin C adalah meningkatkan daya tahan tubuh ikan terhadap stres. Menurut Montero *et al.*, 1999 dalam Kordi (2007), pemberian pakan ikan dengan suplemen asam askorbat (Vitamin C) 300 mg/100g dapat meningkatkan ketahanan tubuh terhadap stres akibat kandungan oksigen terlarut rendah pada ikan japeses parrot.

2.4 *Vibrio alginolyticus*

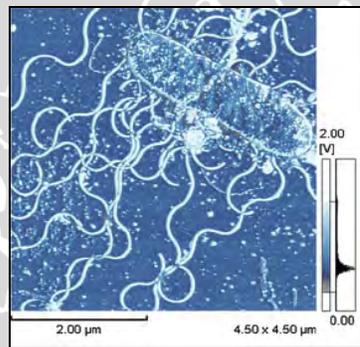
2.4.1 Klasifikasi

Salle (1954) menjelaskan klasifikasi dari bakteri *Vibrio alginolyticus* yaitu:

Phylum	: Protophyta
Class	: Schizomycetes
Ordo	: Pseudomonadales
Sub Ordo	: Pseudomonadineae
Famili	: Spirillaceae
Genus	: <i>Vibrio</i>
Species	: <i>Vibrio alginolyticus</i>

2.4.2 Morfologi

Bakteri *Vibrio* spp tergolong dalam family Vibrionaceae, yang mempunyai tubuh berbentuk batang dan mempunyai kemampuan untuk bergerak karena dilengkapi dengan flagel (Kordi, 2001). Menurut Inglis *et al.* (2003), genus *vibrio* termasuk bakteri gram negative yang berbentuk lurus atau batang yang bengkok dengan ukuran $0,5-0,3 \mu\text{m} \times 1.4-2,6 \mu\text{m}$. Bakteri ini tidak membentuk spora dan bergerak dengan monotrichous atau multitrichous yang dibungkus oleh flagel polar. Bentuk morfologi dari bakteri *Vibrio alginolyticus* seperti pada Gambar 4.



Gambar 4. Morfologi bakteri *Vibrio alginolyticus* by Dr. Kogure, Ocean Research Institute, The University of Tokyo (shimadzu.com). Diakses tanggal 19 Agustus 2009

2.4.3 Persebaran

Bakteri ini ada dimana-mana, terutama perairan yang kandungan bahan organiknya tinggi dan sangat umum pada lingkungan laut dan estuary serta berasosiasi dengan hewan laut (Inglis *et al.*, 2003). Bakteri *Vibrio* spp termasuk jenis halofil, yaitu bakteri yang dapat hidup pada salinitas tinggi. Bakteri ini dapat ditemukan di habitat akuatik dengan kisaran salinitas yang luas dan beberapa spesies ditemukan di habitat air tawar (Bauman *et al.*, 1984 dalam Rosita, 2007).

2.4.3 Patogenisitas

Hasil penelitian Nitimulyo *et al.* (2005) menjelaskan bahwa *Vibrio alginolyticus* menyebabkan kematian ikan uji sebanyak 66,67%-100% dengan rerata waktu kematian berkisar 21-48 jam. Taslihan *et al.* (2000) dalam Nitimulyo *et al.* (2005) menyebutkan bahwa serangan *Vibrio alginolyticus* pada kerapu tikus menyebabkan gejala penyakit berupa mulut merah, tubuh berbecak merah, ulser pada mulut, pembengkakan rongga perut (akibat pembengkakan organ dalam dan akumulasi cairan sisa metabolisme), serta putus sirip.

Kematian masal pada benih diduga disebabkan oleh infeksi bakteri *Vibrio alginolyticus*. Pengendalian penyakit dapat dilakukan dengan penggunaan berbagai jenis antibiotika seperti chloramfenikol, eritromisina dan oksitetrasiklin. Sifat lain yang tidak kalah penting adalah sifat proteolitik yang berkaitan dengan mekanisme infeksi bakteri (ikanmania.wordpress.com, 2007).

Vibrio alginolyticus bersifat pathogen (Austin & Austin, 1987; Rollins & Joseph, 2000; Nitimulyo *et al.*, 2005), dan selalu ditemukan menyebabkan vibriosis pada ikan laut. *Vibrio alginolyticus* merupakan jenis yang paling patogen terhadap kerapu tikus yang menyebabkan kematian hingga 100% dengan nilai LD₅₀ 10^{6,65} sel/ikan (Murdjani, 2002; Nitimulyo *et al.*, 2005). Pemantauan yang dilakukan BBPBAP Jepara menunjukkan *Vibrio alginolyticus* sangat dominan menyebabkan serangan vibriosis terutama pada pergantian musim kemarau ke hujan (Taslihan, *et al.*, 2000; Nitimulyo, *et al.*, 2005).

III. MATERI DAN METODE

3.1 Materi Penelitian

Materi dalam penelitian ini adalah ikan kerapu tikus yang diinfeksi dengan bakteri *Vibrio alginolyticus*, ekstrak bahan aktif dari *Nannochloropsis oculata* dan kualitas air pada pemeliharaan ikan kerapu tikus yang di uji.

3.1.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian meliputi: saringan, ember, baskom, aerator, batu aerasi, spuit, spektrofotometer, sentrifuse dingin, sentrifuse, nampan seng, labu evaporator, evaporator, oven, timbangan, selang, mikropipet, mortar, tabung reaksi, rak tabung reaksi, section, refraktometer.

3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian meliputi: Stok bakteri *Vibrio alginolyticus*, ikan kerapu tikus 30 gram dan panjangnya ± 14 cm, ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata*, kertas saring plastik, n-heksan, tissue, botol film, pelet atau ikan rucah, PBS, aquabides, HCL, NaOH, Na-thiosulfat, alumunium foil, dan TCA.

3.2 Metode dan Rancangan Penelitian

3.2.1 Metode penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen yaitu mengukur daya antioksidan ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* pada ikan kerapu yang terinfeksi bakteri *Vibrio alginolyticus*. Menurut Nazir (1988), metode eksperimen

yaitu mengadakan percobaan untuk melihat hasil. Hasil yang didapat akan menegaskan bagaimana hubungan kausal antara variabel - variabel yang diselidiki dan berapa besar hubungan sebab akibat tersebut dengan cara memberikan perlakuan tertentu pada beberapa kelompok eksperimental dan menyediakan kontrol untuk perbandingan. Data yang di ambil dalam penelitian ini meliputi data primer dan data sekunder.

3.2.2 Rancangan penelitian

Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dimana setiap perlakuan dilakukan sebagai satuan tersendiri, tidak ada hubungan pengelompokan. Rumus dari model RAL adalah sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}; \quad \begin{array}{l} i = 1, 2, \dots, t \\ j = 1, 2, \dots, r \end{array}$$

dimana :

Y_{ij}	=	Nilai pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j.
μ	=	Nilai tengah umum
α_i	=	Pengaruh perlakuan ke-i
ε_{ij}	=	Pengaruh perlakuan (galat) percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j.

Penelitian terdiri dari 4 perlakuan dan 3 kali ulangan. Adapun perlakuannya tersebut adalah sebagai berikut:

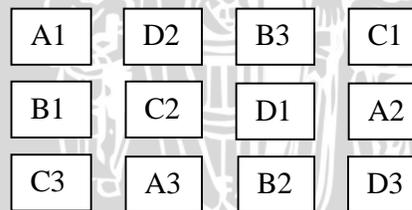
- Ikan kerapu sehat (tanpa penginfeksi dan tanpa pemberian ekstrak bahan aktif)
- Ikan kerapu tanpa diinfeksi bakteri *Vibrio alginolyticus* dan diberi ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata*
- Ikan kerapu diinfeksi *Vibrio alginolyticus* dan tanpa pemberian ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata*

D. Ikan kerapu diinfeksi *Vibrio alginolyticus* dan diberi ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata*

Ikan kerapu tikus yang digunakan ukuran ± 14 cm dengan berat ± 30 gram. Dosis perlakuan yang diberikan pada ikan untuk ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* diencerkan hingga 0,1% dan diberikan sebanyak 0,1 ml dan dosis penginfeksian bakteri *Vibrio alginolyticus* sebesar 3 ml dalam kepadatan 1×10^8 untuk 3 liter air media pemeliharaan. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali, sehingga jumlah sampel yang diamati adalah sebanyak 12. Setelah 7 hari perlakuan sampel didapatkan dari organ ginjal caudal (terletak di bawah menempel pada tulang belakang). Keseluruhan sampel dianalisa dengan mengetahui kondisi MDA (Malondialdehid) dan SOD (Superoksida dismutase).

3.2.3 Denah percobaan

Penempatan perlakuan dilakukan secara acak dengan denah percobaan seperti pada Gambar 5 berikut ini:



Gambar 5. Denah Percobaan

Keterangan:

A,B,C,D : Perlakuan
1,2,3 : Ulangan

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pengambilan sampel

Pengambilan sampel *Nannochloropsis oculata* dan ikan kerapu tikus yaitu di P.T Mutiara Biru Situbondo. Sampel *Nannochloropsis oculata* diambil sebanyak 500 L dan ditaruh dalam wadah plastik. Setelah sampai di laboratorium, sampel ditaruh dalam ember plastik dan diberi aerasi agar *Nannochloropsis oculata* tidak mati. Sedangkan untuk ikan kerapu tikus sebanyak 22 ekor dimasukkan dalam baskom-baskom yang telah diberi air laut kurang lebih 4 liter dan diberi aerasi untuk mencukupi kebutuhan oksigen. Selanjutnya ikan diadaptasikan selama 5 hari.

3.3.2 Preparasi sampel *Nannochloropsis oculata*

Berdasarkan Suratmo (2008) dengan sedikit modifikasi preparasi sampel dilakukan sebagai berikut:

- Menyaring sampel *Nannochloropsis oculata* dengan menggunakan kertas saring
- Mengeringkan *Nannochloropsis oculata* menggunakan oven dengan suhu antara 60-70⁰C agar air yang terkandung didalamnya hilang
- Menghaluskan *Nannochloropsis oculata* dengan menggunakan blender
- Menyimpan *Nannochloropsis oculata* pada wadah plastik

3.3.3 Ekstraksi *Nannochloropsis oculata*

Berdasarkan Gunawan (2008) ekstraksi *Nannochloropsis oculata* dapat dilakukan sebagai berikut:

- Mengekstraksi *Nannochloropsis oculata* secara sokletasi dengan pelarut n-Heksan
- Mengambil sampel *Nannochloropsis oculata* sebanyak 30 gram dan ditaruh dalam timbel ekstraktor
- Meletakkan n-Heksan dalam labu penampung dan ditunggu hingga menguap
- Mengambil hasil bila n-Heksan dalam labu penampung terlihat hijau pekat.

3.3.4 Pengukuran kualitas air

Pengukuran kualitas air yang dilakukan meliputi suhu dengan menggunakan termometer, PH dengan menggunakan PH meter, dan salinitas dengan menggunakan refraktometer, yang merupakan parameter penunjang. Pengecekan kualitas air ini dilakukan selama penelitian berlangsung, selain pengukuran kualitas air dilakukan penyifonan setiap hari pada bak pemeliharaan agar kualitas air tetap stabil bagi kehidupan ikan.

3.3.5 Ujiantang pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*)

Berdasarkan Yanuhar¹ (hasil konsultasi pribadi, 2008) ujiantang pada ikan kerapu dilakukan sebagai berikut:

- Menginfeksi ikan kerapu dengan bakteri *Vibrio alginolyticus*

¹ Dosen Manajemen Sumberdaya Perairan fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang

- Menuangi suspensi biakkan bakteri *Vibrio alginolyticus* dengan populasi 10^8 CFU/ ml media sebanyak 3 ml dengan lama penginfeksi 24 jam (ikan tidak diberi makan) pada bak perlakuan C dan D
- Memberikan bahan aktif *Nannochloropsis oculata* dengan cara oral dilakukan dengan cara memasukkan ke dalam mulut secara paksa sebanyak $\pm 0,1$ mL pada ikan kerapu tikus yang terdapat pada bak perlakuan B dan D. Mengamati perubahannya dan ditunggu selama 6 hari
- Setelah 6 hari ikan dibedah untuk diambil ginjalnya dan kemudian mengukur kadar MDA dan SOD dari ginjal tersebut.

3.3.6 Pengukuran kadar MDA

Berdasarkan Nungki² (hasil konsultasi pribadi, 2009) pengukuran kadar MDA dapat dilakukan sebagai berikut:

- Menimbang 150 mg ginjal dan digerus dengan menggunakan mortar
- Menghomogenasi dengan Buffer phosphate pH 7,4 sebanyak 2 cc.
- Mengambil supernatan sebanyak 200 μ l kemudian ditambahkan 500 μ l aquabides + HCl+ TCA + Na Thiosulfat
- Memanaskan 105 °C selama 25 menit
- Mensentrifus dengan kecepatan 2000 rpm selama ± 10 menit
- Mengambil supernatan atas dan tambahkan aquabides hingga volume 3 cc.
- Membaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 532.

² Dosen dan Kepala Laboratorium farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

3.3.7 Pengukuran SOD

Berdasarkan Nungki² (hasil konsultasi pribadi, 2009) pengukuran kadar SOD dapat dilakukan sebagai berikut:

- Menimbang 150 μL sampel ginjal dan digerus dengan menggunakan mortar
- Menghomogenasi dengan 1,5 cc buffer fosfat pH 7,4
- Mensentrifus dingin 4 °C pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit
- Mengambil larutan sampel pada bagian lapisan atas (cairan bening)
- Mengambil sampel sebanyak 200 μL tambahkan EDTA 200 μL , NBT 100 μL , xantin 100 μL , dan XO 100 μL
- Menginkubasi pada suhu 39 °C selama 30 menit
- Mensentrifuse pada suhu kamar selama 5 menit
- Menyaring bila ada koloid
- Menambahkan aquabides hingga volume larutan 3 cc
- Membaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 580.

3.4 Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian akan dianalisa secara statistik dengan menggunakan analisa keragaman (ANOVA) sesuai dengan rancangan yang digunakan RAL. Apabila data sidik ragam diketahui bahwa perlakuan menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata, maka untuk membandingkan nilai antar perlakuan dilanjutkan dengan uji Tukey. Analisa data dilakukan dengan menggunakan program SPSS 13.0 *for windows*.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Perlakuan Ikan Kerapu Tikus

Penelitian ini menggunakan ikan kerapu tikus dengan ukuran ± 14 cm dan bobot ± 30 gram. Dosis ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* yang digunakan adalah dengan konsentrasi 0.1 % dan diberikan ke ikan sebesar 0.1 ml (Nitimulyo, 2005). Ekstrak ini nantinya akan diberikan ke ikan secara oral melalui mulut. Perlakuan pemberian ekstrak bahan aktif ini bertujuan untuk melihat kerja ekstrak tersebut sebagai antioksidan khususnya bagi ikan. Bakteri yang digunakan adalah bakteri *Vibrio alginolyticus*, dosis penginfeksi dengan kepadatan sebesar 10^8 CFU/ ml media. Cara menginfeksi ikan yaitu dengan cara merendam ikan tersebut dengan bakteri *Vibrio alginolyticus*. Perlakuan penginfeksi bakteri bertujuan untuk memicu pembentukan radikal bebas, terbentuknya radikal bebas dapat dilihat melalui pengukuran kadar MDA.

4.2 Kadar MDA pada Ginjal Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*)

Malondialdehid (MDA) adalah senyawa dialdehida yang merupakan produk akhir peroksidasi lipid di dalam tubuh. Selain itu, MDA juga merupakan produk yang dihasilkan oleh radikal bebas melalui reaksi ionisasi dalam tubuh. Menurut Conti, *et al.* (1991) serta Halliwel dan Gutteridge, 1985 dalam Winarsi (2007), MDA merupakan produk oksidasi asam lemak tidak jenuh oleh radikal bebas (Winarsi, 2007). Tipe radikal bebas turunan oksigen reaktif sangat signifikan dalam tubuh yang meliputi superoksida (O_2^-), hidroksil ($\cdot OH$), peroksil ($ROO\cdot$),

hidrogen peroksida (H_2O_2), singlet oksigen (1O_2), oksida nitrit (NO^{\cdot}), peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$) dan asam hipoklorit ($HOCl$) (Jenny, 2008).

Radikal bebas tersebut mengakibatkan reaksi pembentukan radikal bebas baru yang mengoksidasi komponen lipid, protein, lipoprotein, maupun DNA (Winarsi, 2007) sehingga menyebabkan kerusakan dan kematian sel. Winarsi (2007) menjelaskan bahwa, radikal bebas yang menyerang komponen sel akan menghasilkan metabolit berupa MDA.

Penambahan bahan aktif *Nannochloropsis oculata* dan infeksi bakteri *Vibrio alginolyticus* pada ikan kerapu memberikan pengaruh yang berbeda-beda terhadap kadar MDA ginjal. Hasil pengukuran kadar MDA ginjal ikan kerapu tikus disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Pengukuran Kadar MDA pada ginjal kerapu tikus

Ket.	Perlakuan	Ulangan ($\mu g/100$ mg massa)			Rerata
		I	II	III	
A	Ikan kerapu sehat (tanpa penginfeksi dan tanpa pemberian ekstrak bahan aktif)	14.51	13.72	15.28	14.50
B	Ikan kerapu tanpa diinfeksi bakteri <i>Vibrio alginolyticus</i> dan diberi ekstrak bahan aktif <i>Nannochloropsis oculata</i>	11.75	10.43	12.65	11.61
C	Ikan kerapu diinfeksi <i>Vibrio alginolyticus</i> dan tanpa pemberian ekstrak bahan aktif <i>Nannochloropsis oculata</i>	16.89	15.91	17.16	16.65
D	Ikan kerapu diinfeksi <i>Vibrio alginolyticus</i> dan diberi ekstrak bahan aktif <i>Nannochloropsis oculata</i>	14.29	13.52	14.94	14.25

Analisa kadar MDA ginjal ikan kerapu tikus menunjukkan bahwa nilai kadar MDA tertinggi pada perlakuan ikan terinfeksi bakteri *Vibrio alginolyticus* (C) yaitu sebesar 16,65 µg/100 mg massa dan kadar MDA terendah pada perlakuan ikan dengan pemberian ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* dosis 0.1 ml dalam konsentrasi 0.1 % (B) yaitu sebesar 11,61 µg/100 mg massa. Winarsi (2007), menjelaskan konsentrasi MDA yang tinggi menunjukkan adanya proses oksidasi membran sel (Zakaria, *et al.*, 2000; Winarsi, *et al.*, 2003; Winarsi; 2007).

Perlakuan A merupakan kontrol yaitu ikan tanpa perlakuan apapun (dalam keadaan normal). Perlakuan A pada penelitian ini digunakan sebagai pembanding setiap perlakuan yang dilakukan terhadap ikan, sehingga diketahui apakah suatu perlakuan mengalami kenaikan atau penurunan kadar MDA. Nilai rata-rata kadar MDA pada ginjal ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) pada perlakuan A (normal) sebesar 14.5 µg/100 mg massa ginjal. Nilai tersebut menggambarkan bahwa walaupun ikan tidak terinfeksi tubuh ikan tetap mengandung senyawa radikal bebas. Winarsi (2007), menjelaskan bahwa senyawa oksigen reaktif juga dapat diproduksi melalui kondisi tidak stress / normal, dan terdapat keseimbangan antara proses pembentukan dan pemusnahan senyawa oksigen reaktif. Hal ini biasanya merupakan respon normal proses biokimia secara intrasel maupun ekstrasel.

Perlakuan B yaitu perlakuan ikan dengan diberi ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata*. Tabel 2 menunjukkan nilai rata-rata sebesar 11.61 µg/100 mg massa. Jika dibandingkan dengan kontrol akibat perlakuan B terjadi penurunan kadar MDA, yang berarti terjadi penurunan senyawa radikal bebas dalam tubuh. Jadi *Nannochloropsis oculata* memiliki aktivitas antioksidan di

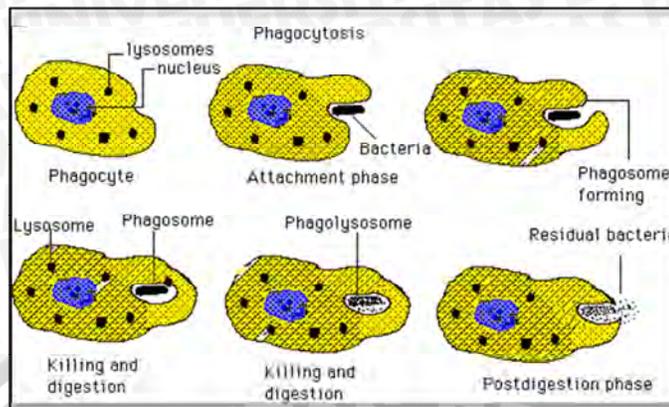
dalam tubuh yaitu mampu meredam radikal bebas sebesar 2,89 $\mu\text{g}/100$ mg massa. Hal ini sesuai dengan Natrah *et al.*, 2005, menjelaskan bahwa ekstrak mikroalgae *Nannochloropsis oculata* mampu menghambat terbentuknya peroksida lipid.

Toonen (1999) menjelaskan bahwa *Nannochloropsis oculata* memiliki kandungan nutrisi EPA dan vitamin C. Li, *et al.* (2006) menjelaskan bahwa EPA memiliki aktivitas antioksidan yaitu mampu menangkap peroksidasi lipid dan dapat meningkatkan aktivitas enzim SOD, Katalase dan Glutathione peroksida. Levine, *et al.*, 1995 dalam Winarsi (2007) menjelaskan bahwa vitamin C memiliki aktifitas antioksidan yaitu dengan bekerja sebagai donor elektron, dengan cara menyumbangkan elektron ke dalam reaksi biokimia intraseluler dan ekstraseluler serta Vitamin C mampu menghilangkan senyawa oksigen reaktif di dalam sel neutrofil dan monosit. Senyawa bahan aktif *Nannochloropsis oculata* terbukti mampu menetralsir radikal bebas, sehingga memutus rantai reaksi radikal bebas yang mengoksidasi lipid dan pembentukan MDA pun dapat berkurang. Hal inilah yang menyebabkan kadar MDA menurun pada kelompok perlakuan B.

Perlakuan C merupakan perlakuan ikan yang diinfeksi bakteri *Vibrio alginolyticus*, dari tabel 2 nilai rerata diketahui sebesar 16.65 $\mu\text{g}/100$ mg massa. Perlakuan ini bertujuan untuk mengetahui tingkat pembentukan radikal bebas dengan pengukuran kadar MDA pada saat ikan terinfeksi bakteri. Dibandingkan dengan perlakuan A, kadar MDA pada perlakuan C lebih tinggi. Hal ini diasumsikan infeksi bakteri akan meningkatkan radikal bebas yang terbentuk sebesar ± 2.15 $\mu\text{g}/100$ mg massa. Dian (2009) hasil penelitiannya menjelaskan bahwa, saat ikan terinfeksi bakteri jumlah sel darah putih yaitu neutrofil dan monosit meningkat. Leukosit merupakan salah satu jenis sel darah yang

mempunyai peranan penting dalam sistem tanggap kebal ikan, dan akan meningkat secara pesat apabila terjadi suatu infeksi (Tizard (1988) dalam Endarti, 2009). Neutrofil dan monosit merupakan sel fagosit, menurut Irianto (2005) sel-sel fagosit akan mengenali dan menelan partikel antigenik, termasuk bakteri dan sel-sel inang yang rusak, melalui tiga tahapan proses yaitu pelekatan, fagositosis dan pencernaan. Monosit dan neutrofil yang teraktivasi memiliki kemampuan untuk menghasilkan oksigen dan nitrogen reaktif (reaktif oxygen and nitrogen species, ROS dan RNS) yang bersifat toksik terhadap beragam spesies bakteri.

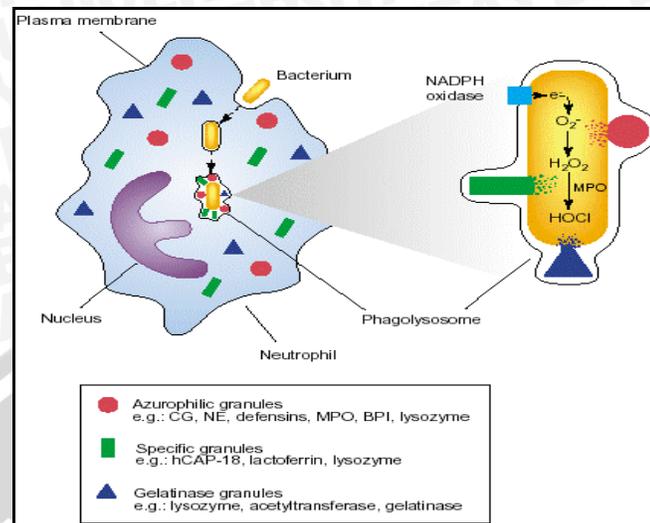
Proses fagositosis oleh sel darah putih berlangsung dalam 5 fase, yaitu: fase pergerakan, pelekatan, penelanan (ingestion), degranulasi dan pembunuhan (killing). Proses penelanan bakteri terjadi karena fagosit membentuk tonjolan pseudopodia, kemudian membentuk kantung yang mengelilingi bakteri dan mengurungnya, sehingga bakteri tertangkap dalam kantung (vakuola) yang disebut fagosom. Selanjutnya granular intraseluler yang berisi berbagai jenis enzim dan protein lain bergabung (fusi) dengan fagosom, lalu terjadi degranulasi dan *respiratory burst*. Enzim dan protein yang terdapat dalam granula mampu membunuh kuman, baik dalam proses oksidatif maupun non oksidatif (Kresno, 2000). Proses Fagositosis dapat dilihat pada Gambar 6.



Sumber: (pkukmweb.ukm, 2009)

Gambar 6. Proses fagositosis bakteri

Pembentukan radikal bebas oleh sel fagosit dimulai dengan adanya pembunuhan bakteri dengan proses oksidatif, diawali peningkatan pengambilan oksigen oleh fagosit dan dimulainya suatu proses kompleks yang mengaktifkan enzim oksidase NADPH (NADPH-dependent oxidase) pada membran. Enzim ini menurunkan O_2 menjadi $\cdot O_2^-$ (superoksida), yang akan dirembeskan ke dalam fagosom. Dalam fagosom, $\cdot O_2^-$ akan membantu pengrusakan bakteri, virus, fungi, dan benda asing lainnya di dalam leukosit. Proses ini menghasilkan radikal H_2O_2 (hidrogen peroksida). H_2O_2 yang dihasilkan akan bereaksi dengan Cl dan MPO (mieloperoksidase) membentuk HOCl (hipoklorit). MPO juga bereaksi dengan HOCl menjadi $\cdot OH$. Bahan-bahan ini adalah toksik bagi bakteri. $\cdot O_2^-$ dan H_2O_2 bereaksi dengan Fe dan membentuk hidroksil ($\cdot OH$) yang toksik (pkukmweb.ukm, 2009). Proses oksidatif yang terjadi dalam sel fagosit dapat ditampilkan pada Gambar 7.



Sumber: Google.com, 2009

Gambar 7. Proses oksidatif dalam sel fagosit (Neutrofil)

Gutteridge dan Halliwell (1996) menjelaskan bahwa organisme asing yang dikenali sebagai benda asing menyentuh permukaan neutrofil, menyebabkan enzim pada membran dari sel neutrofil teraktivasi. Enzim ini menghilangkan elektron dari NADPH dalam sel menjadi $NADP^+$. Elektron tersebut keluar melewati membran dan digunakan untuk mereduksi O_2 menjadi O_2^- pada bagian luar permukaan neutrofil. Produksi O_2^- adalah salah satu mekanisme penelanan organisme asing untuk dibunuh oleh fagosit.

Tizard (1982) menjelaskan juga bahwa, apabila partikel ditelan oleh neutrofil, terjadilah satu rangkaian peristiwa biokimiawi yang meningkatkan penghancuran partikel. Peningkatan “letupan pernafasan” ini mengakibatkan peningkatan pergantian $NADPH_2$, pemutaran kembali $NADPH_2$ dengan perantara enzim dismutase superoksida dan mieloperoksidase menghasilkan pembentukan metabolit zat asam yang sangat reaktif. Termasuk ke dalamnya hidrogen peroksida, superoksida anion (O_2^-), zat asam singlet, radikal hidroksil, kloramin

dan aldehida. Semuanya ini bersifat sangat toksik bagi organisme. Pentingnya letupan pernafasan ini diperlihatkan oleh pengamatan hewan yang kekurangan dalam dismutase superoksida atau mieloperoksidase menderita infeksi berulang yang parah.

Berdasarkan penjelasan diatas menunjukkan bahwa bakteri dapat menginduksi pelepasan radikal bebas (oksigen reaktif) yang berlebihan oleh makrofag di dalam tubuh. Menurut Arief (2008), suatu keadaan dimana tingkat oksigen reaktif intermediate (ROI) yang toksik melebihi pertahanan anti-oksidan endogen dikenal dengan istilah tekanan oksidatif (*oxidative stress*). Pada umumnya radikal bebas bersifat sebagai perantara yang dapat diubah menjadi substansi lain dengan cepat. Rahman (2009) menjelaskan, bila radikal bebas ini bertemu dengan enzim atau asam lemak tak jenuh seperti asam linoleat, sehingga terjadi proses peroksidasi lipid. Proses peroksidasi lipid ini menghasilkan suatu produk yaitu senyawa MDA. Jumlah radikal bebas yang berlebih mengakibatkan peningkatan proses peroksidasi lipid sehingga malondialdehid yang dihasilkan juga meningkat. Oleh karena itu, pada kelompok ikan yang terinfeksi bakteri terjadi peningkatan kadar MDA pada ginjal ikan.

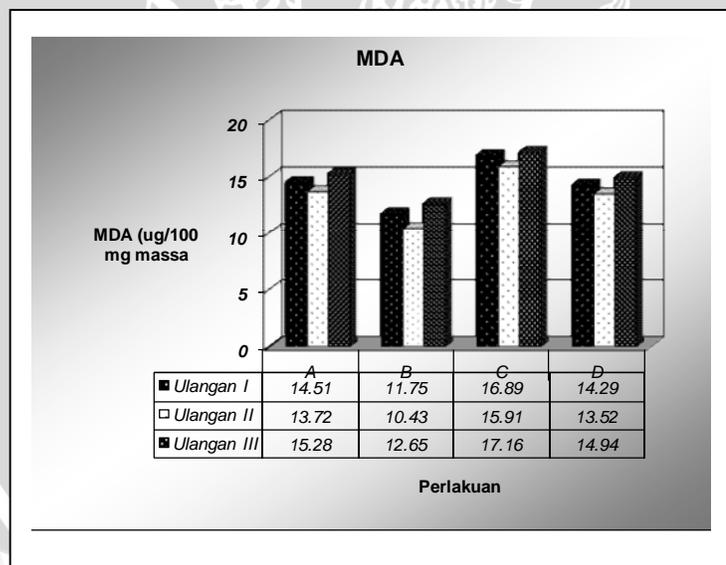
Perlakuan D adalah perlakuan ikan yang terinfeksi bakteri kemudian diberi ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* secara oral. Nilai kadar MDA pada ginjal yang terukur adalah sebesar 14.25 $\mu\text{g}/100$ mg massa. Hasil pengukuran ini jika dibandingkan dengan kontrol tidak berbeda nyata, yaitu perlakuan D memperlihatkan penurunan kadar MDA hanya sebesar 0,25 $\mu\text{g}/100$ mg massa. Perlakuan D dibandingkan dengan perlakuan C menunjukkan nilai MDA pada perlakuan D jauh lebih rendah, artinya ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis*

oculata dapat menurunkan kadar MDA yang sebelumnya meningkat akibat adanya infeksi bakteri. Seperti dijelaskan pada perlakuan C, bahwa infeksi bakteri secara tidak langsung dapat menginduksi produksi radikal bebas secara berlebihan.

Pemberian ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* terbukti dapat menurunkan kadar MDA sebesar 2,4 µg/100 mg massa. Hal ini diasumsikan bahwa adanya aktivitas antioksidan dari ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* yaitu mampu menangkap radikal bebas sehingga tidak menimbulkan oksidasi lipid. Natrah *et al* (2005), menjelaskan bahwa ekstrak *Nannochloropsis oculata* dapat menghambat terjadinya peroksidasi lipid dari asam linoleat. Senyawa aktif yang terkandung oleh ekstrak ini menurut Irawan *et al* (2009) memiliki kandungan senyawa terpena. Terpena adalah senyawa alkohol tersier yang merupakan senyawa fitokimia utama kadar tinggi, yang berpotensi sebagai antioksidan (Krishnakantha & Lokesh (1993) dalam Winarsi, 2007).

Toonen (2008) juga menjelaskan *Nannochloropsis oculata* memiliki kandungan vitamin C dan kaya akan kandungan EPA. Vitamin C dan EPA ini juga diketahui memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Penambahan ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* inilah maka produksi radikal bebas yang berlebihan akibat sebelumnya terinfeksi bakteri dapat ditangkap oleh senyawa bahan aktif yang terkandung dalam *Nannochloropsis oculata*, dimana dapat terlihat dari kadar MDA pada ikan perlakuan D yang tidak jauh berbeda dengan ikan perlakuan A.

Infeksi bakteri pada ikan kerapu tikus (perlakuan C) akan menimbulkan kadar MDA yang lebih tinggi yaitu sebesar $16.65 \mu\text{g}/100 \text{ mg}$ massa, daripada ikan kerapu yang diberi ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* dan tanpa infeksi bakteri (perlakuan B) yaitu sebesar $11.61 \mu\text{g}/100 \text{ mg}$ massa. Gambar 8 menunjukkan bahwa pada ikan kontrol (perlakuan A) dengan ikan yang terinfeksi bakteri kemudian diberi ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* (perlakuan D) memiliki nilai MDA yang tidak jauh berbeda yaitu secara berurutan 14.50 dan $14.25 \mu\text{g}/100 \text{ mg}$ massa. Hal tersebut membuktikan bahwa pada ikan terinfeksi yang kemudian diberi ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* (perlakuan D) dapat memperbaiki kondisi ikan seperti ikan kontrol dengan menurunkan kadar MDA pada ginjal ikan. Grafik hubungan perlakuan dengan kadar MDA dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Grafik hubungan perlakuan dengan kadar MDA

Radikal hidroksil (OH^\cdot) yang terbentuk dari hasil sampingan fagositosis akan menyebabkan reaksi pembentukan radikal bebas lainnya. Menurut Gropper (2005), hidroksil diduga merupakan inisiator utama pembentukan peroksida lipid. Mekanisme pembentukan lipid peroksida dimulai dari tahap inisiasi, yaitu ketika radikal hidroksil menyerang polyunsaturated fatty acids (LH) membran fosfolipid atau senyawa organik lainnya. Reaksi ini dapat dilihat sebagai berikut:



Reaksi berlanjut pada tahap propagasi, yaitu oksigen bereaksi dengan radikal lipid menjadi radikal peroksil seperti pada gambar berikut:



Selanjutnya radikal peroksil akan menyerang *polyunsaturated fatty acids* ($\text{L}'\text{H}$) lainnya pada membrane sel membentuk peroksida lipid (LOOH) dan radikal lainnya, seperti reaksi berikut ini:



Peroksida lipid (LOOH) bersifat tidak stabil. Dengan adanya logam katalisator Fe atau lainnya, senyawa LOOH akan berpartisipasi dalam reaksi fenton dan mengawali pembentukan radikal alkoksi yang reaktif (Winarsi, 2007):



4.2.1 Analisa data kadar MDA ginjal ikan kerapu tikus

Hasil sidik ragam Tabel 3 menunjukkan bahwa nilai F hitung yaitu 24,018 berada di atas nilai F tabel 1 % (5.99). Penambahan ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* dan infeksi bakteri pada ikan kerapu memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata terhadap kadar MDA ginjal ikan kerapu tikus. Analisis sidik ragam kadar MDA ginjal ikan disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Analisa Sidik Ragam Kadar MDA pada Ginjal Ikan

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Uji F		
				F hitung	F tabel 5%	F tabel 1%
Perlakuan	3	38.43	12.81	24,018**	3.48	5.99
Acak	8	5.59	0.70			
Total	11	44.015				

Keterangan : ** = berbeda nyata (significant)

Untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan dilakukan uji Tukey. Berdasarkan hasil uji Tukey pada Tabel 4 menunjukkan bahwa urutan perlakuan terbaik adalah perlakuan B diikuti oleh perlakuan D/A selanjutnya perlakuan A/C. Perlakuan A pada Tabel 4 memiliki notasi bc yang artinya perlakuan A tersebut tidak berbeda nyata dengan perlakuan D dan perlakuan C, dapat diartikan bahwa ikan normal dengan ikan yang diinfeksi bakteri *Vibrio alginolyticus* kemudian diberi ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* dan ikan yang diperlakukan dengan pemberian ekstrak *Nannochloropsis oculata* mempunyai tingkat kadar MDA yang tidak berbeda nyata. Keadaan tersebut diperkirakan karena kondisi ikan yang telah terinfeksi bakteri, tingkat kadar MDA menjadi meningkat, maka dengan

pemberian ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* pada ikan hanya menurunkan kadar MDA mendekati kondisi ikan normal. Tabel 4 menunjukkan perlakuan pemberian bahan aktif *Nannochloropsis oculata* (B) sangat berbeda nyata. Hal tersebut dapat diasumsikan bahwa pemberian bahan aktif *Nannochloropsis oculata* dapat mempengaruhi produksi radikal bebas yang ditunjukkan oleh kadar MDA yang menurun jika dibandingkan ikan kontrol. Hasil uji tukey ditampilkan pada Tabel 4.

Tabel 4. Uji Tukey

Rata-rata Perlakuan	B	D	A	C	Notasi
B = 11.61					a
D = 14.24	2.63**				b
A = 14.5033	2.8933**	0.2633ns			bc
C = 16.6533	5.0433**	2.4133**	2.15ns		c

Keterangan: ns = tidak berbeda nyata
 * = berbeda nyata
 ** = sangat berbeda nyata

Hasil analisa MDA menunjukkan perlakuan infeksi bakteri pada ikan memberikan pengaruh negatif dengan meningkatkan radikal bebas dalam ginjal. Namun dengan pemberian ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* terbukti dapat menurunkan kadar radikal bebas tersebut seperti pada ikan sehat.

4.3 Kadar SOD Ginjal Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*)

Superoxide dismutase (SOD) adalah bahan bioaktif yang diketahui bersifat antioksidan (oxygen free radical scavenger). SOD melindungi sel terhadap gangguan oksidan (radikal bebas) yang dapat menyebabkan terjadinya beberapa penyakit dan proses degenerasi seperti ketuaan dan karsinogenesis (Ames dan Shigenaga, 1992 dalam Wresdiyati, 2009). SOD termasuk antioksidan enzimatis

yang termasuk kategori antioksidan endogenus. Antioksidan enzimatis lainnya meliputi glutathione peroxidase (GSH-PX), glutathion reduktase (GSH-R) serta katalase (Winarsi, 2007).

Hasil pengukuran kadar SOD pada ginjal ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) menunjukkan ikan dengan perlakuan pemberian ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* memiliki kadar SOD tertinggi yaitu 98,68 Unit/100 mg massa dan pada perlakuan ikan yang terinfeksi bakteri *Vibrio alginolyticus* (C) memiliki kadar SOD terendah yaitu 67.12 Unit/100 mg massa. Hasil pengukuran kadar SOD ginjal ikan kerapu tikus ditampilkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Pengukuran Kadar SOD

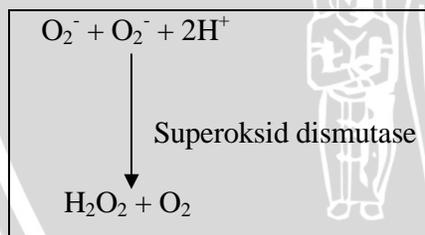
Ket.	Perlakuan	Ulangan (Unit/100 mg massa)			Rerata
		I	II	III	
A	Ikan tanpa penginfeksian dan tanpa pemberian ekstrak bahan aktif	78.89	82.67	85.23	82.26
B	Ikan kerapu tanpa diinfeksi bakteri <i>Vibrio alginolyticus</i> dan diberi ekstrak bahan aktif <i>Nannochloropsis oculata</i>	95.36	98.33	102.36	98.68
C	Ikan kerapu diinfeksi <i>Vibrio alginolyticus</i> dan tanpa pemberian ekstrak bahan aktif <i>Nannochloropsis oculata</i>	63.79	65.27	72.29	67.12
D	Ikan kerapu diinfeksi <i>Vibrio alginolyticus</i> dan diberi ekstrak bahan aktif <i>Nannochloropsis oculata</i>	70.47	70.23	75.28	71.99

Menurut data yang disajikan dalam Tabel 5 nilai rata-rata kadar SOD pada ginjal ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) pada perlakuan A yaitu ikan tanpa perlakuan sebesar 82.26 Unit/100 mg massa. Hasil ini membuktikan bahwa di dalam tubuh organisme juga terdapat antioksidan. Winarsi (2007), menjelaskan enzim SOD terdapat dalam semua organisme aerob, dan sebagian besar berada dalam tingkat intraseluler. Organisme aerob selalu membutuhkan oksigen untuk

hidupnya, namun dalam setiap aktivitasnya dapat menimbulkan senyawa oksigen reaktif atau radikal bebas oksigen. Perlakuan A ini dimaksudkan untuk menggambarkan kondisi normal yaitu dimana jumlah radikal bebas seimbang dengan jumlah antioksidan dalam tubuh. Selain itu perlakuan A juga digunakan sebagai kontrol atau pembandingan dengan perlakuan lainnya.

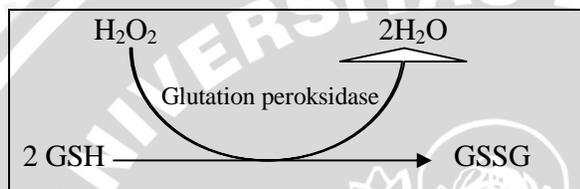
Perlakuan B adalah perlakuan ikan dengan pemberian ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata*. Hasil pengukuran kadar SOD rata-rata pada Tabel 5 sebesar 98.68 Unit/100 mg massa, jika dibandingkan dengan perlakuan A, nilai kadar SOD pada perlakuan B lebih tinggi.

Aktivitas antioksidan enzimatis yaitu dapat diketahui dari kadar SOD, SOD mempunyai substrat yang spesifik yaitu ion superoksida. Yuad (2008) menjelaskan, bahwa peranan enzim Superoxide Dismutase (SOD) mengkatalisis dismutasi dari superoksida menjadi hidrogen peroksida dan oksigen. Reaksi tersebut ditunjukkan sebagai berikut:

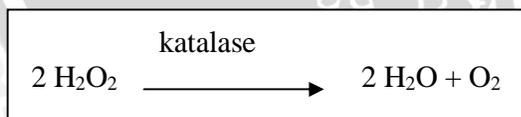


Terdapat dua macam SOD di dalam sel yaitu Cu-Zn SOD yang aktif di dalam sitosol dan Mn SOD yang aktif di dalam mitokondria. Peran tembaga sebagai kofaktor maupun pengatur enzim SOD cukup besar (Kumalaningsih, 2007).

Menurut Kazuko, 2003; Rayman MP., 2004 dalam Yuad (2008), Reaksi selanjutnya konversi H_2O_2 menjadi $2\text{H}_2\text{O}$ dan O_2 oleh *glutation peroksidase*. Enzim *glutation peroksidase* mengkatalisa berbagai hidroperoksida, lipid peroksida, dan lipid peroksinitrit. *Glutation peroksidase* mereduksi H_2O_2 menjadi H_2O dan glutathion disulfide (GSSG) dengan bantuan glutathion tereduksi (GSH) reaksi terjadi sebagai berikut:



Menurut Gropper *et al.*, (2005) katalase merupakan enzim yang dapat menghilangkan hidrogen peroksid. Enzim katalase ditemukan pada peroksisom dan terdapat juga dalam jumlah kecil pada sitosol, mitokondria, dan sel mikrosom. Neutrofil dan sel darah putih lainnya mengandung katalase dalam jumlah besar untuk membuang hidrogen peroksid yang tidak dibutuhkan dalam respiratory burst untuk fagositosis bakteri, virus dan fungi. Reaksi katalis oleh enzim katalase terjadi sebagai berikut:

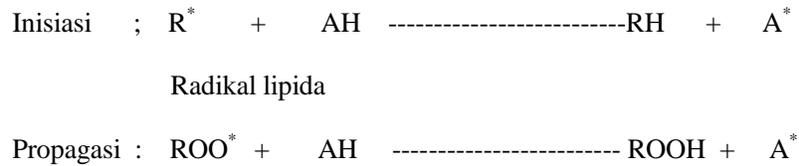


Antioksidan non-enzimatis yaitu antioksidan yang diperoleh dari luar tubuh misalnya vitamin C, vitamin E, flavonoid, dan terpenoid. Mekanisme kerja antioksidan non-enzimatis memiliki dua fungsi. Fungsi pertama merupakan fungsi utama dari antioksidan yaitu sebagai pemberi atom hidrogen. Antioksidan (AH) dapat memberikan atom hidrogen secara cepat ke radikal lipida (R^* , ROO^*)

atau mengubahnya ke bentuk lebih stabil, sementara turunan radikal antioksidan (A^*) tersebut memiliki keadaan lebih stabil dibanding radikal lipida. Fungsi kedua merupakan fungsi sekunder antioksidan, yaitu memperlambat laju autooksidasi dengan berbagai mekanisme diluar mekanisme pemutusan rantai autooksidasi dengan perubahan radikal lipida ke bentuk lebih stabil (Gordon 1990; Trilaksani, 2003).

Toonen (1999) menjelaskan bahwa *Nannochloropsis oculata* memiliki kandungan nutrisi EPA dan vitamin C. EPA dan vitamin C ini telah dikenal sebagai antioksidan. Li, *et al.* (2006) menjelaskan bahwa EPA memiliki aktivitas antioksidan yaitu mampu menangkap peroksidasi lipid dan dapat meningkatkan aktivitas enzim SOD, Katalase dan Glutathione peroksida. Levine, *et al.*, 1995 dalam Winarsi (2007) menjelaskan bahwa vitamin C memiliki aktifitas antioksidan yaitu dengan bekerja sebagai donor elektron, dengan cara menyumbangkan elektron ke dalam reaksi biokimia intraseluler dan ekstraseluler serta Vitamin C mampu menghilangkan senyawa oksigen reaktif di dalam sel neutrofil dan monosit.

Penambahan antioksidan (AH) primer dengan konsentrasi rendah pada lipida dapat menghambat atau mencegah reaksi autooksidasi lemak dan minyak. Radikal-radikal antioksidan (A^*) yang terbentuk pada reaksi tersebut relatif stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipida lain membentuk radikal lipida baru (Gordon (1990) dalam Trilaksani, 2003). Menurut Hamilton (1983), radikal-radikal antioksidan dapat saling bereaksi membentuk produk non radikal (Trilaksani, 2003).



Gambar 9. Reaksi Penghambatan antioksidan primer terhadap radikal lipida (Gordon (1990) dalam Trilaksani, 2003).

Peningkatan kadar SOD pada perlakuan ini diasumsikan adanya penambahan ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* yang diketahui memiliki kandungan senyawa (terpenoid, EPA dan vitamin C) yang bersifat antioksidan yaitu dapat menghambat terjadinya reaksi oksidasi. Sehingga dapat membantu kerja enzim antioksidan (SOD) dalam menghambat reaksi oksidasi komponen sel oleh radikal bebas pada ginjal oleh karena itu aktivitas enzim antioksidan meningkat. Penemuan tersebut membuktikan bahwa aktivitas antioksidan enzimatis sangat dipengaruhi oleh asupan antioksidan non-enzimatis.

Perlakuan C adalah ikan yang diinfeksi bakteri tanpa pemberian ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata*. Nilai rata-rata kadar SOD pada perlakuan C yaitu sebesar 67.12 Unit/100 mg massa, jika dibandingkan dengan perlakuan A kadar SOD mengalami penurunan sebesar 15,14 Unit/100 mg massa. Irianto (2005) menjelaskan bahwa makrofag dan neutrofil yang teraktivasi (aktif melakukan proses fagositosis) juga memiliki kemampuan untuk menghasilkan suatu jenis oksigen dan nitrogen reaktif (ROS dan RNS). Jika aktifitas fagositosis ini terus-menerus berlangsung produksi radikal bebas akan bertambah terus, sehingga menurut Arief (2008), suatu keadaan dimana tingkat oksigen reaktif intermediate (ROI) yang toksik melebihi pertahanan anti-oksidan endogen akan

menyebabkan tekanan oksidatif (*oxidative stress*). Hal inilah yang menyebabkan aktivitas SOD pada ikan perlakuan C menurun.

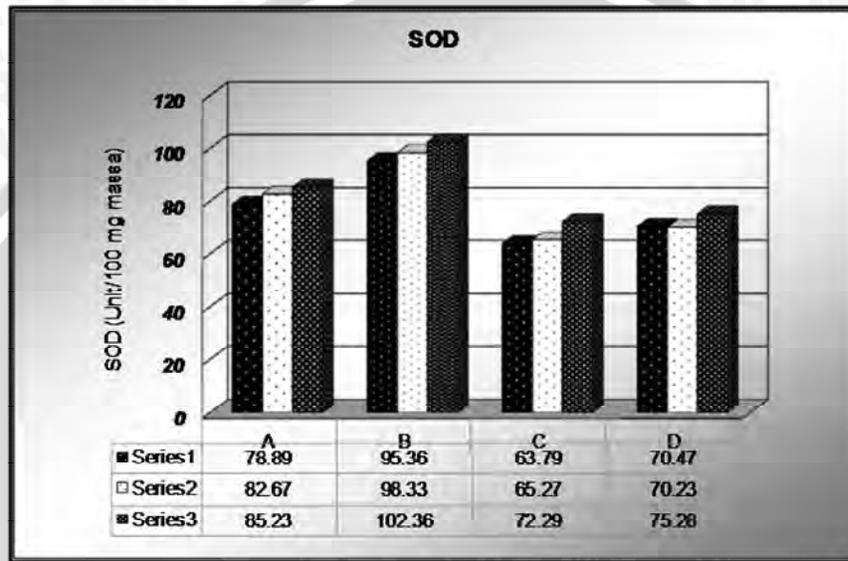
Perlakuan D adalah ikan yang diinfeksi bakteri dan diberi ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata*. Nilai rata-rata kadar SOD pada Tabel 5 menunjukkan sebesar 71.99 Unit/100 mg massa, jika dibandingkan dengan kontrol aktivitas SOD pada perlakuan ini mengalami penurunan sebesar 10,27 Unit/100 mg massa. Infeksi bakteri dalam tubuh ikan secara tidak langsung meningkatkan produksi radikal bebas dalam sel, terutama sel fagosit. Pembentukan radikal bebas tersebut menyebabkan penurunan aktivitas enzim SOD. Kemudian dengan pemberian ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* akan dapat meningkatkan kadar SOD. Terbukti berdasarkan hasil pengukuran kadar SOD pada perlakuan A dan B ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* dapat meningkatkan aktivitas SOD dari 82.26 Unit/100 mg massa menjadi 98.68 Unit/100 mg massa yaitu meningkatkan aktivitas SOD sebesar 16,42 Unit/100 mg massa.

Toonen (1999) menjelaskan bahwa *Nannochloropsis oculata* memiliki kandungan nutrisi EPA dan vitamin C. EPA dan vitamin C ini telah dikenal sebagai antioksidan. Li, *et al.* (2006) menjelaskan bahwa EPA memiliki aktivitas antioksidan yaitu mampu menangkap peroksidasi lipid. Oleh karena kerja senyawa bahan aktif yang terkandung dalam *Nannochloropsis oculata* yang menetralkan radikal bebas inilah, sehingga memutus rantai reaksi radikal bebas yang mengoksidasi lipid sehingga aktivitas SOD dapat meningkat, oleh karena itu pada perlakuan D kadar SOD lebih meningkat jika dibandingkan dengan perlakuan C.

Berdasarkan Gambar 10 dapat dilihat bahwa perlakuan B memiliki nilai tertinggi, kemudian terendah terdapat pada perlakuan C dan perlakuan C ini juga tidak jauh berbeda dengan perlakuan D. Gambar 10 menunjukkan perlakuan B memiliki nilai tertinggi dikarenakan adanya pengaruh dari ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* yang diberikan. Ekstrak bahan aktif ini diduga memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Natrah *et al.*, (2005) yang menyatakan bahwa, *Nannochloropsis oculata* merupakan salah satu jenis mikroalga yang memiliki aktivitas antioksidan yang mampu menghambat pembentukan peroksidasi lipid dari asam linoleat. Irawan *et.al.*, 2008, menjelaskan ekstrak kasar *Nannochloropsis oculata* memiliki kandungan senyawa terpenoid, senyawa ini termasuk senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan.

Perlakuan C dari gambar 10 memiliki kandungan SOD yang terendah, diasumsikan karena dipengaruhi oleh serangan bakteri terhadap ikan. Hal tersebut dikarenakan serangan bakteri terhadap ikan secara tidak langsung akan menginduksi produksi radikal bebas secara berlebihan sehingga menyebabkan terjadinya stress oksidatif di dalam tubuh ikan, dimana jumlah radikal bebas terlalu banyak dibandingkan jumlah antioksidan yang terdapat dalam jaringan tubuh. Guteridge dan Haliwell (1996) menjelaskan aktivitas fagosit yang mampu membunuh bakteri disebabkan terdapat stress oksidatif dalam sel fagosit. Masalah yang terjadi pada fagositosis adalah teraktivasinya fagosit memicu stress oksidatif pada jaringan sekitarnya dan jika banyaknya fagosit yang teraktivasi atau jika inflamasi berlangsung terlalu lama, akan menyebabkan kerusakan yang serius. Sehingga kadar SOD pada ginjal ikan dengan perlakuan infeksi bakteri mengalami penurunan, terlihat pada Gambar 10 perlakuan C dan D yaitu

kelompok ikan yang terinfeksi bakteri grafiknya menunjukkan nilai yang hampir sama (tidak berbeda nyata). Grafik hubungan kadar SOD ginjal dengan perlakuan dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Grafik hubungan perlakuan terhadap kadar SOD

4.3.1 Analisa data kadar SOD ginjal ikan kerapu tikus

Hasil sidik ragam pada tabel 6 menunjukkan bahwa nilai F hitung yaitu 445.329 berada di atas nilai F tabel 1 % (5.99) yang berarti bahwa perlakuan yang diberikan pada ikan Kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata terhadap kadar SOD pada ginjal ikan kerapu tikus. Hasil analisa sidik ragam kadar SOD ginjal ditampilkan dalam Tabel 6.

Tabel 6. Sidik Ragam Analisa Data Kadar SOD

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Uji F		
				F hitung	F tabel 5%	F tabel 1%
Perlakuan	3	1752.83	584.28	45.61124 **	3.71	6.55
Acak	8	102.51	12.81			
Total	11	17,220.773				

Keterangan : ** = berbeda nyata (significant)

Untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan dilakukan uji Tukey. Berdasarkan hasil uji Tukey pada Tabel 7 menunjukkan bahwa perlakuan pemberian ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* pada ikan (B) memberikan pengaruh berbeda sangat nyata. Hal ini diartikan bahwa pemberian ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* pada ikan mempengaruhi meningkatnya kadar SOD, karena diasumsikan ekstrak bahan aktif tersebut memiliki kandungan senyawa antioksidan. Urutan perlakuan terbaik adalah perlakuan B diikuti perlakuan A selanjutnya perlakuan D/C. Perlakuan D dan C pada Tabel 7 memiliki notasi yang sama artinya kedua perlakuan tersebut memberikan hasil yang tidak berbeda nyata, diartikan bahwa ikan yang terinfeksi bakteri *Vibrio alginolyticus* (C) dengan ikan yang terinfeksi bakteri *Vibrio alginolyticus* dan diberi ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* mempunyai tingkat kadar SOD tidak berbeda nyata. Hasil uji Tukey ditampilkan pada Tabel 7.

Tabel 7. Uji Tukey Kadar SOD pada Ginjal Ikan Kerapu Tikus

Rata-rata Perlakuan	C	D	A	B	Notasi
C = 67.12					a
D = 71.99	4.8767ns				a
A = 82.26	15.1467**	10.27**			b
B = 98.68	31.5667**	26.69**	16.42**		c

Keterangan: ns = tidak berbeda nyata
 * = berbeda nyata
 ** = sangat berbeda nyata

Kadar SOD pada perlakuan ikan yang terinfeksi bakteri mengalami penurunan jika dibandingkan dengan kontrol. Hal ini disebabkan oleh kerja enzim yang semakin berat karena makin bertambahnya intensitas pembentukan radikal bebas sebagai akibat dari perlakuan stres oksidatif secara terus-menerus pada ikan Kerapu tikus. Sebaliknya pada ikan yang diberi ekstrak bahan aktif

Nannochloropsis oculata terjadi peningkatan kadar SOD, hal ini dikarenakan ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* mampu menghambat oksidasi lipid. Sehingga kerja daripada enzim SOD lebih ringan dan kadar enzim SOD dalam ginjal meningkat.

4.4 Ginjal Ikan

Hasil analisis kadar MDA dan SOD pada ginjal ikan menunjukkan ikan yang diperlakukan dengan penambahan infeksi bakteri akan meningkatkan kadar MDA ginjal dan penurunan SOD ginjal. Sebaliknya ikan dengan penambahan ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* akan menurunkan kadar MDA ginjal dan peningkatan kadar SOD ginjal. Hal ini mengindikasikan bahwa bakteri *Vibrio alginolyticus* telah menginfeksi jaringan ginjal. Bakteri yang telah disebar dalam air, akan menginfeksi ikan melalui permukaan tubuh ikan seperti kulit dan sirip. *Vibrio alginolyticus* menyerang organisme air dimulai dari bagian lendir (mucus) yang diproduksi oleh permukaan tubuh. Lendir dapat menjadi media yang baik untuk perkembangan koloni bakteri karena mengandung nutrisi yang dibutuhkan oleh *vibrio* (Fahri, 2008).

Jalur penyebaran infeksi *vibrio* yang tepat belum jelas, tetapi transmisi dicurigai lewat mulut (Fahri, 2008). Bakteri yang masuk lewat mulut diperkirakan karena ikan melakukan proses osmoregulasi dan respirasi dengan jalan meminum air. Ikan kerapu termasuk golongan Ikan laut, menurut Fujaya (2004), untuk mempertahankan konsentrasi garam dan air dalam tubuh, teleostei oseanodrom memperbanyak minum air laut dan melakukan osmoregulasi. Dengan memperbanyak minum air laut maka kehilangan air dalam tubuh ikan dapat diganti. Karena ikan air laut suka minum maka bakteri berkesempatan masuk dan

menginfeksi organ dan jaringan dalam tubuh ikan. Selanjutnya bakteri akan masuk ke dalam peredaran darah ikan pada saat penyerapan O_2 oleh darah di insang. Bakteri akan terbawa kedalam peredaran darah keseluruh tubuh yaitu dari insang darah dialirkan ke dorsal aorta kemudian darah dialirkan ke kepala, otot badan, ginjal dan organ pencernaan melalui pembuluh kapiler (Fujaya, 2004). Kemudian darah akan mengangkut bahan-bahan asing (bakteri, virus dll) atau yang tidak dibutuhkan oleh tubuh diangkut ke ginjal dan dikeluarkan melalui urin atau fagositasi (Fujaya, 2004).

Madigan *et al.* (2003) dalam Dominius (2009), berpendapat bahwa bakteri memulai infeksi dengan menempel secara spesifik pada sel-sel epitel melalui interaksi protein pada permukaan pathogen dan sel inang. Mikroorganisme yang menginfeksi tidak melekat pada semua sel-sel epitel tetapi secara selektif menempel pada sel-sel dibagian tubuh dimana bagian tersebut secara normal menguntungkan untuk masuknya bakteri ke dalam tubuh inang. Strain vibrio diketahui melekat pada reseptor seperti protein kollagen, fibronektin, mukus ikan dan sel epitelnya. Jalan masuk terjadinya infeksi spesies *Vibrio* pada ikan melalui saluran gastrointestinal, insang, dan kulit. Khusus mengenai *Vibrio*, untuk perlekatan dan penetrasi ke dalam tubuh ikan, melalui sel epitel yang dilanjutkan proses penyebaran secara sistematis (Wang *et al.*, 2000 dalam Dominius, 2009).

Fujaya (2004) menerangkan bahwa, ginjal melakukan dua fungsi utama: pertama, mengsekresikan sebagian besar produk akhir metabolisme tubuh, dan kedua, mengatur konsentrasi cairan tubuh. Glomerulus berfungsi menyaring cairan, sedangkan tubulus mengubah cairan yang disaring menjadi urin. Dengan demikian nefron dapat membersihkan atau menjernihkan plasma darah dari zat-zat

yang tidak dikehendaki ketika melalui ginjal. Ginjal terdiri dari dua bagian yaitu caput renalis anterior yang tersusun atas jaringan hemapoetik, limfoid dan endokrin serta trunkus renalis posterior yang tersusun atas nefron-nefron dikelilingi jaringan limfoid interstitial. Ginjal adalah organ yang paling kaya akan jaringan lymphoid, thrombocyte dibentuk di bagian mesonefrik. Pada Lamprey dan kebanyakan Teleostei, ginjal merupakan penghasil sel darah yang utama selama hidupnya, terutama kepala ginjal (akademik-unhas.ac.id, 2009).

Pertahanan melalui organ ginjal melalui sel fagosit yang terdiri dari monosit (prekursor makrofag), makrofag dan granulosit. Granulosit tersusun atas neutrofil, eosinofil, dan basofil. Makrofag ketika mengalami aktivasi memiliki kapasitas fagositik lebih kuat dari granulosit. Pada monosit atau makrofag, pelekatan dan penelanan antigen diperantai oleh beragam reseptor permukaan membran, termasuk polisakarida. Makrofag juga merupakan sistem pertahanan seluler bawaan, terutama sebagai penyedia antigen, sebagai inisiator respon fase akut dan sebagai mediator imun melalui sekresi sitokin (Irianto, 2005).

Bakteri yang masuk dalam peredaran darah akan difagositasi dalam nefron yang kaya akan jaringan limfoid. Limfosit memegang peranan penting dalam pembentukan antibodi. Kekurangan limfosit dapat menurunkan konsentrasi antibodi dan menyebabkan meningkatnya serangan penyakit.

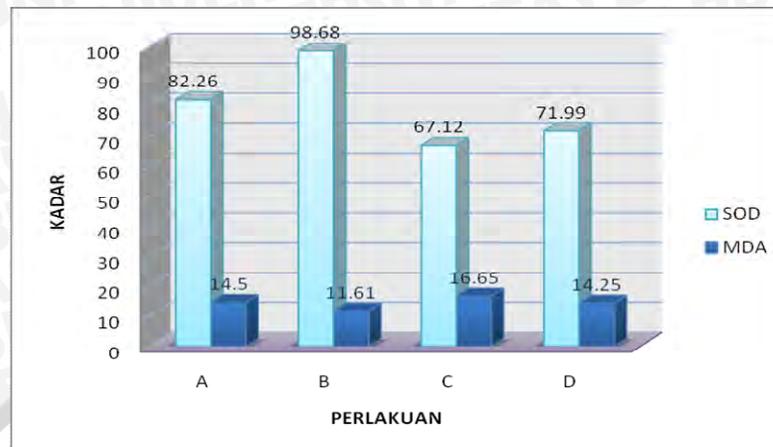
Hargono (1996) menjelaskan bahwa, jika sistem pertahanan pertama dan kedua tidak mampu menggagalkan penetrasi mikroba, maka sistem pertahanan lapisan ke tiga yang harus menggagalkan penetrasi mikroba tadi lebih lanjut. Sistem pertahanan lapisan ke tiga ini mengerahkan limfosit-limfosit yang mampu mengerahkan reaksi-reaksi imunologik. Berbeda sekali dengan mekanisme sistem

pertahanan pertama dan ke dua yang tidak membeda-bedakan mikroba yang masuk, maka reaksi-reaksi imunologik yang dikerahkan oleh limfosit lebih selektif tertuju kepada mikroba patogen saja.

Irawan *et al.* (2008) menjelaskan bahwa ekstrak kasar bahan aktif *Nannochloropsis oculata* mengandung senyawa terpenoid. Terpenoid merupakan zat penting yang berfungsi membentuk tubuh dalam proses sintesis organik dan pemulihan sel-sel tubuh (ekafood. 2009), selain itu juga senyawa terpena memiliki potensi sebagai antioksidan (Winarsi, 2007).

4.5 Hasil Perbandingan Antara Kadar MDA dan SOD pada Ginjal

Berdasarkan hasil pengukuran pada kadar MDA dan kadar SOD pada ginjal maka dapat dibandingkan hasil pengukuran tersebut. Berdasarkan Gambar 11, secara umum dapat diperhatikan bahwa kenaikan nilai SOD akan diikuti dengan penurunan nilai MDA dan begitu pula sebaliknya. Hubungan antara kadar MDA dengan SOD dapat dikatakan berbanding terbalik. Berdasarkan grafik pada gambar 11 dapat diamati bahwa dengan perlakuan B (pemberian ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata*) SOD mengalami peningkatan, hal ini diasumsikan terjadi aktivitas antioksidan oleh bahan aktif *Nannochloropsis oculata* sehingga SOD mengalami kenaikan dan diikuti dengan menurunnya kadar MDA. Winarsi (2007) menjelaskan, peningkatan SOD dapat disebabkan oleh kandungan antioksidan yang dapat menghambat terjadinya reaksi oksidasi, dan didukung oleh menurunnya konsentrasi MDA (radikal bebas). Hasil perbandingan dari kadar MDA dan SOD dapat dilihat pada pada Gambar 11.



Gambar 11. Grafik hubungan antara kadar MDA dengan SOD

Perlakuan C (diinfeksi bakteri) SOD mengalami penurunan dan diikuti dengan kenaikan kadar MDA. Hal tersebut diasumsikan bahwa infeksi bakteri dapat memicu produksi radikal bebas, seperti yang dijelaskan Winarsi (2007) radikal bebas yang menyerang komponen sel akan menghasilkan metabolit berupa MDA. Tizard (1982) menjelaskan bahwa benda asing (bakteri) yang masuk kedalam tubuh akan ditelan oleh neutrofil kemudian memicu terjadinya produksi radikal bebas akibat hasil sampingan "letupan pernafasan" oleh sel neutrofil.

4.6 Parameter Pendukung Kualitas Air

Selama penelitian berlangsung, pengukuran kualitas air dilakukan yang meliputi suhu ($^{\circ}\text{C}$), salinitas dan pH pada tiap wadah media pemeliharaan. Faktor tersebut turut diperhatikan selama penelitian berlangsung karena air dapat mempengaruhi kelangsungan hidup ikan itu sendiri.

4.6.1 Suhu

Berdasarkan hasil pemantauan kualitas air diketahui suhu tidak mengalami perubahan yang tinggi. Kualitas air tersebut sesuai untuk kehidupan kerapu tikus seperti yang dikemukakan oleh Yushimitsu, *et al.* (1988) dalam Nitimulyo *et. al.* (2005) yang menyebutkan parameter suhu yang cocok untuk pertumbuhan kerapu, yaitu antara 24-31 °C. Pengukuran suhu yang dilakukan selama penelitian menunjukkan suhu air berkisar antara 26-28°C sehingga memberikan kondisi yang optimal bagi ikan uji. Stickney (1979) dalam Hudayati (2005) menjelaskan bahwa kisaran suhu yang luas membutuhkan sistem enzim yang berbeda antara berbagai macam spesies. Metabolisme berjalan lambat apabila temperatur dibawah optimum. Hasil pengukuran suhu selama perlakuan berlangsung disajikan dalam Tabel 9.

Tabel 9. Hasil Pemantauan Suhu (°C)

Perlakuan	Hari ke-						
	1	2	3	4	5	6	7
A	28	26	27	27	27	28	27
B	26	26	28	27	27	28	28
C	27	28	26	27	28	27	28
D	27	28	26	28	27	27	28

Selama pengamatan, fluktuasi suhu terjadi dipengaruhi oleh udara sekitar bak, fluktuasi suhu pada saat pengamatan tidak terjadi perubahan secara mendadak dan drastis (tidak lebih besar dari 2° C setiap harinya), sehingga kerapu yang dipelihara dapat hidup optimal. Untuk mencegah fluktuasi suhu yang tinggi dan mendadak, maka pada bak ditutup plastik sekaligus styrofoam serapat-rapatnya, juga dipersiapkan heater untuk menstabilkan suhu yang drop sehingga meminimalisir pengaruh fluktuasi suhu dari luar ruangan.

4.6.2 pH

Berdasarkan hasil pemantauan kualitas air yang disajikan pada Tabel 10, menunjukkan pH berkisar antara 7.1 – 7.5. Hal ini menunjukkan tidak terjadinya fluktuasi yang mencolok dan masih berada dalam kisaran normal untuk pemeliharaan ikan kerapu. Kualitas air tersebut sesuai untuk kehidupan kerapu tikus seperti yang dikemukakan oleh Yushimitsu, *et al.* (1988) dalam Nitimulyo *et al* (2005) yang menyebutkan parameter pH air yang cocok untuk pertumbuhan kerapu, yaitu pH 7,8-8. Jika dibandingkan dengan literatur kondisi pH lebih rendah, namun hal tersebut tidak memberikan pengaruh yang signifikan pada ikan dikarenakan pH tersebut masih dalam kisaran netral. Hasil pemantauan pH air media pemeliharaan selama perlakuan berlangsung disajikan dalam Tabel 10.

Tabel 10. Hasil Pemantauan pH

Perlakuan	Hari ke-						
	1	2	3	4	5	6	7
A	7.1	7.4	7.1	7.5	7.1	7.2	7.1
B	7.1	7.2	7.4	7.5	7.3	7.1	7.2
C	7.1	7.3	7.2	7.1	7.2	7.3	7.2
D	7.1	7.3	7.4	7.4	7.1	7.2	7.1

4.6.3 Salinitas

Berdasarkan hasil pemantauan kualitas air yang disajikan pada Tabel 11, menunjukkan salinitas tidak mengalami fluktuasi. Hal ini berarti pemberian perlakuan yang berbeda pada ikan tidak mempengaruhi salinitas dalam bak-bak pemeliharaan atau dapat dikatakan salinitas air relatif homogen.

Rata-rata pengukuran salinitas yang dilakukan selama penelitian berkisar antara 30–32 ppm sehingga kondisi seperti ini adalah yang diharapkan dapat mengoptimalkan kehidupan ikan uji. Kualitas air untuk kehidupan kerapu tikus seperti yang dikemukakan oleh Yushimitsu, *et al.* (1988) dalam Nitimulyo *et al* (2005) menyebutkan salinitas air yang cocok untuk pertumbuhan kerapu yaitu salinitas antara 30-33 ppt. Hasil pemantauan salinitas media pemeliharaan selama penelitian disajikan pada Tabel 11.

Tabel 11. Hasil Pemantauan Salinitas (‰)

Perlakuan	Hari ke-						
	1	2	3	4	5	6	7
A	30	30	31	32	32	31	32
B	30	31	31	32	32	31	31
C	30	30	31	31	32	31	30
D	30	30	30	31	31	32	32

Hasil pengukuran kualitas air yang meliputi suhu, salinitas dan pH selama penelitian menunjukkan nilai yang tidak berbeda setiap media percobaan ikan. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan yang berbeda dan beberapa kali ulangan tidak memberikan pengaruh yang berbeda terhadap kualitas air media. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Nannochloropsis oculata* tidak menimbulkan dampak negatif sehingga aman digunakan sebagai antioksidan.

V. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Hasil penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa:

- Ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata*, menurunkan kadar MDA dan meningkatkan kadar SOD pada ginjal ikan kerapu tikus yang terinfeksi *Vibrio alginolyticus*.
- Kadar MDA ginjal ikan kerapu tikus yang terinfeksi bakteri mengalami peningkatan (16,65 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ massa) dan terjadi penurunan MDA ginjal ikan yang diberi ekstrak bahan aktif *Nannochloropsis oculata* (11,61 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ massa). Sebaliknya SOD ginjal ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) mengalami peningkatan (98,68 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ massa) dan pada ikan yang diinfeksi bakteri SOD ginjal mengalami penurunan (67,12 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ massa).

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan dari penelitian ini adalah:

- Perlu dilakukan penelitian lanjutan, efek ekstrak *Nannochloropsis oculata* sebagai antioksidan yang terekspresi pada organ selain ginjal untuk mencari ekspresi optimal antioksidan pada ikan kerapu tikus yang terinfeksi bakteri.
- Perlu dilakukan penelitian lanjutan pada organ ginjal cranial, karena organ ginjal cranial letaknya di anterior sehingga darah setelah dari insang langsung menuju ginjal cranial, oleh karena itu ginjal cranial sering digunakan untuk mendeteksi adanya serangan bakteri atau penyakit pada ikan.
- Perlu adanya penelitian ke lapang mengenai aplikasi pemanfaatan ekstrak *Nannochloropsis oculata* sebagai antioksidan pada ikan budidaya laut.

DAFTAR PUSTAKA

- Akademik.unhas. 2009. **Bahan Ajar Mata Kuliah Ikhtiologi BAB XII Ekskresi dan Osmoregulasi.** <http://akademik.unhas.ac.id/lms/inherent/ikhtiologi>. diakses tanggal 30 Agustus 2009 pada pukul 9:24 WIB
- Algabase. 2008. *Nannochloropsis oculata*. <http://algaebase.org>. Diakses tanggal 12 Juli 2008
- Astuti, Miguna. 2009. **Pengaruh Pemberian Antioksidan Ekstrak Kayu Secang, Vitamin C Dan Vitamin E Terhadap Profil Lipid Pada Mencit** Swiss-Webster Yang Terpapar Aflatoksin. <http://one.indoskripsi.com>
- Auctions, overstock. 2009. Algae Culturing KIT w/ Nannochloropsis Biodiesel Strain. <http://www.auctions.overstock.com>. Diakses tanggal 9 Desember 2009
- Bachtiar, E. 2007. **Penelusuran Sumber Daya Hayati Laut (Alga) Sebagai Biotarget Industri.** Universitas Padjadjaran Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan. Jatinangor.
- Bloom, J.H. 1988. **Analisa Mutu Air Secara Fisika dan Kimia.** Laporan Tentang Pelatihan Praktek pada Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang
- Chilmawati, Diana. 2007. **Dasar-dasar Budidaya Pakan Alami.** <http://budidaya.pakanalami.blogspot.com/2007/12/kultur-mikroalgae.html>.
- Daniells, Stephen. 2008. **Microalgae Extracts Beat Synthetic Antioxidant for Food: Study.** <http://www.foodnavigator-usa.com>. Diakses tanggal 15 Agustus 2009
- Dian, Adhila. 2009. **Pengaruh Penginfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*, Pemuaan dan perlukaan Terhadap Gambaran Hematologi Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*).** Skripsi. Tidak Diterbitkan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Malang.
- Dominius. 2009. **Identifikasi dan Ekspresi Protein Reseptor Organ Ginjal Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) yang Mengenali Infeksi Vibriosis.** Tesis. Program Pasca Sarjana Program Studi Budidaya perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang

- Ekafood. 2009. **Mengkudu, Si Buruk Rupa Multiguna**. <http://ekafood.com>. Diakses tanggal 25 Agustus 2009 pada pukul 10:22 WIB
- Endarti. 2009. **Pengaruh Pemberian Ekstrak Jintan Hitam (*Nigella sativa*) sebagai Imunostimulan Terhadap Hematologi Ikan Lele Dumbo Setelah Uji Tantang Dengan Bakteri *Aeromonas***. Skripsi. Tidak Diterbitkan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang
- Fahri, Muhammad. 2008. **Bakteri Pathogen pada Budidaya Perikanan *Vibrio alginolyticus***. <http://elfahrybima.blogspot.com>. Diakses tanggal 29 Agustus 2009 pukul 12:55 WIB.
- Fishbase. 2009. ***Cromileptes altivelis***. <http://www.fishbase.org/Summary>. Diakses tanggal 5 Juni 2009
- Fisher, T., T. Berner, D. Iluz and Z. Dubinsky .1998. ***Nannochloropsis oculata***. <http://chloroplast.ocean.washington.edu>. Diakses tanggal 23 Juni 2009.
- Fishex .2008. ***Nannochloropsis oculata***. <http://www.fishex.com>. Diakses tanggal 23 Juni 2009.
- Fujaya, Yushinta. 2004. **Fisiologi Ikan Dasar Pengembangan Tehnik Perikanan**. Penerbit Rineka Cipta. Jakarta. 179 hlm.
- Gropper, S., J.L.Smith, and J.L. Groff. 2005. **Advanced Nutrition and Human Metabolism Fourth Edition**. Wadsworth Thomson Learning Inc. United States of America. 600 pp.
- Guiry, M.D. 2008. ***Nannochloropsis* Hibberd 1981: 114**. www.algaebase.org. Diakses tanggal 23 Juni 2009
- Gunawan. I.W.G, I G.A. Gede Bawa, dan N.L. Sutrisnayanti. 2009. **Isolasi dan Identifikasi Senyawa Terpenoid yang Aktif Antibakteri pada Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn)**. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran. www.ejournal.unud.ac.id/pdf
- Gutteridge, J.M.C., and B. Halliwell. 1996. **Antioxidant in Nutrition, Health, and Disease**. Oxford University Press Inc. New York. 143 pp.
- Hargono, Djoko. 1996. **Sekelumit Mengenai Obat Nabati dan Sistim Imunitas**. Cermin Dunia Kedokteran No. 108. Pusat Penelitian dan Pengembangan Farmasi, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan RI. Jakarta.

- Hidayati, Nur R. 2005. **Pengaruh Perbedaan Dosis Asam Sitrat yang Ditambahkan pada Suplemen Pakan “ Scott’s Emulsion” Terhadap Kelulushidupan Larva Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) pada Akhir Fase Kritis I.** Skripsi. Tidak Diterbitkan. Budidaya Perairan Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya Malang.
- Ikanmania. 2007. **Jenis Penyakit pada Ikan (Finfish) Budidaya Air Payau.** www.ikanmania.wordpress.com. Diakses tanggal 30 November 2008.
- Iptek. 2008. **Pedoman Teknis Penanggulangan Penyakit Ikan Budidaya Laut.** www.iptek.net.id.
- Inglis, V.R. J. Robert and N.R. Bromage. 1993. *Bacterial Diseases of Fish.* Blackwell Science. Oxford. 321 pp.
- Irawan, B., Marissa, M dan Atiek, R. 2009. **Pemanfaatan Alga Laut *Nannochloropsis oculata* Sebagai Sumber Antioksidan untuk Pengendali Vibriosis pada Ikan Kerapu.** Program Kreativitas Mahasiswa. Universitas Brawijaya. Malang
- Irianto, Agus. 2005. **Patologi Ikan Teleostei.** Penerbit Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 256 hal.
- Jenny. 2009. **Antioksidan Vs Radikal Bebas.** www.multiply.com/journal/item/18/Antioksidan_Vs_Radikal_Bebas_
- Kogure. 2009. ***Vibrio alginolyticus*.** Ocean Research Institute. The University of Tokyo. www.shimadzu.com. Diakses tanggal 19 Agustus 2009.
- Kordi, M. dan Gufran H. 2001. **Usaha Pembasaran Ikan Kerapu di Tambak.** Kanisius. Yogyakarta. 115 hal.
- Kordi, M.G.H. 2007. **Meramu Pakan untuk Ikan Karnivor.** CV. Aneka Ilmu Anggota IKAPI. Semarang. 248 hlm.
- Kresno, Siti Boedina. 2000. **Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium.** Balai Penerbit FKUI. Jakarta. 347 hlm.
- Murtidjo, B.A. 2001. **Budidaya Kerapu Dalam Tambak.** Kanisius.
- Natrah, F.M.I, F. M. Yusoff, M. Shariff, F. Abas, N. S. Mariana. 2007. **Screening of Malaysian Indigenous Microalgae For Antioxidant Properties and Nutritional Value.** Universiti Putra Malaysia. Springer Science Business Media BV. www.springerlink.com
- Nazir. 1988. **Metode Penelitian.** Ghalia Indonesia. Jakarta Timur. 212 hal.

- Nitimulyo, *et al.*, 2005. **Efektivitas Vaksin Polivalen Untuk Pengendalian Vibriosis pada Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*)**. Jurnal Perikanan (Journal of Fisheries Science) Vol. VII no. 2, Juli 2005. Penerbit Jurusan Perikanan Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Nitimulyo, *et al.*, 2005. **Isolasi, Identifikasi dan Karakterisasi *Vibrio spp.* Patogen Penyebab Vibriosis pada Kerapu di Balai Budidaya Air Payau Situbondo**. Jurnal Perikanan (Journal of Fisheries Science) Vol. VII no. 2, Juli 2005. Penerbit Jurusan Perikanan Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Pkukmweb. 2009. **Fagositosis**. pkukmweb.ukm.my/~daniel/Fagositosis.html.
- Putra, S.E. 2008 . **Alga Laut sebagai Biotarget Industri**. Situs web Kimia Indonesia www.chem-is-try.org.
- Peureulak, Ismail. 2009. **Pakan Alami *Skeletonema costatum***. www.jenieb-nautica.blogspot.com. Diakses tanggal 10 Desember 2009
- Reedmariculture. 2008. ***Nannochloropsis oculata*** . <http://reedmariculture.com/microalgae/images2/nanno.jpg>.
- Rosita. M.D. 2007. **Efektivitas Pemberian Alkaloid Ubur-ubur (*Bougivillia sp.*) Melalui Perendaman Terhadap Jumlah Bakteri *Vibrio harveyi* pada Ikan Kerapu Macan (*Ephinephelus fuscogutatus*)**. Skripsi. Tidak Diterbitkan. Budidaya Perairan Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya Malang.
- Samawati, Mey R. 2007. **Pemberian Alkaloid Ubur-ubur (*Bougenvillia sp*) yang Diberikan Melalui Pakan Terhadap Hematokrit, Total Eritrosit dan leukosit Ikan Kerapu Macan (*Ephinephelus fuscogutatus*)**. Skripsi. Tidak Diterbitkan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Malang.
- Spector. 1993. **Pengantar Patologi Umum**. Alih Bahasa: drh. Soetjipto dkk. Penerbit Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 391 hal.
- Sukenik, A., Y. Carmeli and T. Berner. 1989. ***Nannochloropsis oculata***. <http://chloroplast.ocean.washington.edu>. Diakses tanggal 12 November 2009
- Suratmo. 2008. **Potensi Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) Sebagai Antioksidan**. Jurnal. Tidak Diterbitkan. Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya. Malang

- Taxonomicon. 2008. **The Taxonomicon**. <http://taxonomicon.taxonomy.nl,2000>
- Tizzard, Ian. 1987. **Pengantar Imunologi Veteriner Edisi Kedua**. Alih Bahasa: Masduki Partodirejo. Airlangga University Press. Surabaya
- Toonen, R.1999. **Instant Algae Info**. <http://www.reefcentral.com>.
- Trilaksani. Wini, 2003. **Antioksidan: Jenis, Sumber, Mekanisme Kerja dan Peran Terhadap Kesehatan**. Term Paper Intoductory Science Philosophy (PPS702) Graduate Program/S3. Institute Pertanian Bogor
- Wikipedia. 2006. **Algae**. <http://en.wikipedia.org/wiki/Algae#Introduction>. Diakses tanggal 14 Juni 2009 pada pukul 11: 24 WIB
- Wikipedia. 2009. **Malondialdehyde**. www.wikipedia.org/wiki/. Diakses tanggal 20 Agustus 2009 pada pukul 17:51 WIB
- Winarsi, Hery. 2007. **Antioksidan Alami & Radikal Bebas Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan**. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. 281 hal.
- Wresdiati, T., M. Astawan dan Fithriani D. 2009. **Pengaruh α -Tokoferol terhadap Profil Superoksida Dismutase dan Malondialdehida pada Jaringan Hati Tikus di Bawah Kondisi Stres**. <http://ejournal.unud.ac.id/?module=detailpenelitian&idf=6&id>
- Yuad, Haviz. 2008. **Proposal PPDS Obgyn**. <http://havizyuad.blogspot.com>. Diakses pada tanggal 20 Agustus 2009. Pukul 17:55 WIB
- Yunus, Muhammad. 2008. *Nannochloropsis oculata*. <http://muhammadyunus.blogspot.com/2008/06/nannochloropsis-oculata.html>. diakses tanggal 20 Agustus 2009 pada pukul 17:37 WIB

Lampiran 1. Perhitungan Kadar MDA pada Ginjal Ikan Kerapu Tikus

Data Hasil perhitungan kadar MDA pada Ginjal Ikan Kerapu Tikus

Perlakuan	Ulangan ($\mu\text{g}/100\text{ mg massa}$)			Rata-rata
	I	II	III	
A	14.51	13.72	15.28	14.5
B	11.75	10.43	12.65	11.61
C	16.89	15.91	17.16	16.65
D	14.26	13.52	14.94	14.24

Hasil Analisis

• **Deskripsi data**

Descriptives								
Kadar_MDA								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
A	3	14.5033	.78002	.45035	12.5657	16.4410	13.72	15.28
B	3	11.6100	1.11660	.64467	8.8362	14.3838	10.43	12.65
C	3	16.6533	.65775	.37975	15.0194	18.2873	15.91	17.16
D	3	14.2400	.71021	.41004	12.4757	16.0043	13.52	14.94
Total	12	14.2517	2.00032	.57744	12.9807	15.5226	10.43	17.16

ü **Desrkripsi dari perlakuan A**

- Rata-rata kadar MDA adalah $14.5033\ \mu\text{g}/100\text{ mg massa}$.
- Kadar minimum adalah $13.72\ \mu\text{g}/100\text{ mg massa}$ dan maksimum adalah $15.28\ \mu\text{g}/100\text{ mg massa}$.
- Dengan tingkat kepercayaan 95% atau signifikansi 5%, rata-rata kadar MDA ada pada range 12.5657 sampai 16.4410 $\mu\text{g}/100\text{ mg massa}$.

ü **Desrkripsi dari perlakuan B**

- Rata-rata kadar MDA adalah $11.61\ \mu\text{g}/100\text{ mg massa}$.
- Kadar minimum adalah $10.43\ \mu\text{g}/100\text{ mg massa}$ dan maksimum adalah $12.65\ \mu\text{g}/100\text{ mg massa}$.
- Dengan tingkat kepercayaan 95% atau signifikansi 5%, rata-rata kadar MDA ada pada range 8.8362 sampai 14.3838 $\mu\text{g}/100\text{ mg massa}$.

Lampiran 1 lanjutan

ü **Desrkipsi dari perlakuan C**

- Rata-rata kadar MDA adalah 16.6533 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ massa.
- Kadar minimum adalah 15.91 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ massa dan maksimum adalah 17.16 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ massa.

Lanjutan lampiran 1

- Dengan tingkat kepercayaan 95% atau signifikansi 5%, rata-rata kadar MDA ada pada range 15.0194 sampai 18.2873 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ massa.

ü **Desrkipsi dari perlakuan D**

- Rata-rata kadar MDA adalah 14.24 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ massa.
- Kadar minimum adalah 13.52 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ massa dan maksimum adalah 14.94 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ massa.
- Dengan tingkat kepercayaan 95% atau signifikansi 5%, rata-rata kadar MDA ada pada range 12.4757 sampai 16.0043 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ massa.

Analisis Sidik Ragam

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F hitung	F tabel 5%	Ftabel 1%	Sig.
Perlakuan	3	38.43	12.81	18.351	3.71	6.55	0.001
Galat	8	5.585	0.698				
Total	11	44.014					

F hitung output adalah 18.351

F tabel didapat dari tabel distribusui F untuk $\alpha=0.05$ dengan derajat bebas (v_1, v_2) 3,8 didapat angka 3.71 dan untuk $\alpha=0.01$ dengan derajat bebas (v_1, v_2) 3,8 didapat angka 6.55

Terlihat bahwa F hitung adalah 18.351 dengan nilai probabilitas 0.001. Oleh karena F hitung > F tabel dan probabilitas < 0.05, maka rata-rata kadar MDA keempat perlakuan tersebut memang berbeda nyata.

Lampiran 1. Lanjutan

Setelah diketahui bahwa ada perbedaan yang signifikan di antara keempat perlakuan, maka dilakukan uji lanjutan yaitu uji Tukey untuk mengetahui kelompok mana saja yang berbeda dan yang tidak berbeda.

• Uji Tukey

Kadar_MDA

Perlakuan_MDA	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Tukey HSD ^a B	3	11.6100		
D	3		14.2400	
A	3		14.5033	14.5033
C	3			16.6533
Sig.		1.000	.979	.054

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Kesimpulan :

- Pada subset 1, terlihat hanya grup dengan perlakuan B saja. Dengan kata lain, bis dikatakan perlakuan B punya perbedaan dengan perlakuan yang lain.
- Pada subset 2, terlihat grup dengan perlakuan D dan perlakuan A. Dengan kata lain, bis dikatakan perlakuan D dan perlakuan A tidak mempunyai perbedaan yang signifikan satu dengan yang lain.
- Pada subset 3, terlihat grup dengan perlakuan A dan perlakuan C. Dengan kata lain, bis dikatakan perlakuan A dan perlakuan C tidak mempunyai perbedaan yang signifikan satu dengan yang lain.

Dari output diatas dapat dibuat tabel sebagai berikut:

Rata-rata Perlakuan	B	D	A	C	Notasi
B = 11.61					a
D = 14.24	2.63**				b
A = 14.5033	2.8933**	0.2633ns			bc
C = 16.6533	5.0433**	2.4133**	2.15ns		c

keterangan : ns = tidak berbeda nyata
 * = berbeda nyata
 ** = sangat berbeda nyata

Lampiran 2. Perhitungan Kadar SOD pada Ginjal Ikan Kerapu Tikus

1. Data Hasil perhitungan kadar SOD pada Ginjal Ikan Kerapu Tikus

Perlakuan	Ulangan ($\mu\text{g}/100\text{ mg massa}$)			Rata-rata
	I	II	III	
A	78.89	82.67	85.23	82.26
B	95.36	98.33	102.36	98.368
C	63.79	65.27	72.29	67.12
D	70.47	70.23	75.28	71.99

Hasil Analisis

• Deskripsi data

Descriptives								
Kadar_SOD								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
A	3	82.2633	3.18950	1.84146	74.3402	90.1865	78.89	85.23
B	3	98.6833	3.51335	2.02843	89.9557	107.4110	95.36	102.36
C	3	67.1167	4.54094	2.62171	55.8363	78.3970	63.79	72.29
D	3	71.9933	2.84887	1.64479	64.9164	79.0703	70.23	75.28
Total	12	80.0142	12.98717	3.74907	71.7625	88.2658	63.79	102.36

ü Deskripsi dari perlakuan A

- Rata-rata kadar SOD adalah $82.2633\ \mu\text{g}/100\text{ mg massa}$.
- Kadar minimum adalah $78.89\ \mu\text{g}/100\text{ mg massa}$ dan maksimum adalah $85.23\ \mu\text{g}/100\text{ mg massa}$.
- Dengan tingkat kepercayaan 95% atau signifikansi 5%, rata-rata kadar SOD ada pada range 74.3402 sampai $90.1865\ \mu\text{g}/100\text{ mg massa}$.

ü Deskripsi dari perlakuan B

- Rata-rata kadar SOD adalah $98.6833\ \mu\text{g}/100\text{ mg massa}$.
- Kadar minimum adalah $95.36\ \mu\text{g}/100\text{ mg massa}$ dan maksimum adalah $102.36\ \mu\text{g}/100\text{ mg massa}$.
- Dengan tingkat kepercayaan 95% atau signifikansi 5%, rata-rata kadar SOD ada pada range 89.9557 sampai $107.4110\ \mu\text{g}/100\text{ mg massa}$.

Lampiran 2 lanjutan

ü **Desrkipsi dari perlakuan C**

- Rata-rata kadar SOD adalah 67.1167 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ massa.
- Kadar minimum adalah 63.79 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ massa dan maksimum adalah 72.29 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ massa.
- Dengan tingkat kepercayaan 95% atau signifikansi 5%, rata-rata kadar SOD ada pada range 55.8363 sampai 78.3970 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ massa.

ü **Desrkipsi dari perlakuan D**

- Rata-rata kadar SOD adalah 71.9933 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ massa.
- Kadar minimum adalah 70.23 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ massa dan maksimum adalah 75.28 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ massa
- Dengan tingkat kepercayaan 95% atau signifikansi 5%, rata-rata kadar SOD ada pada range 64.9164 sampai 79.0703 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ massa

• **Uji Homogenitas Ragam**

Test of Homogeneity of Variances

Kadar_SOD

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.430	3	8	.737

Analisis ini bertujuan untuk menguji berlaku tidaknya asumsi untuk sidik ragam, yaitu apakah keempat sampel mempunyai varian yang sama.

Keputusan:

Terlihat bahwa *Levene Test* hitung adalah 0.430 dengan nilai probabilitas 0.737. Oleh karena probabilitas > 0.05 , maka keempat varians adalah sama. Dengan demikian, asumsi kesamaan varian untuk uji Analisis sidik ragam sudah terpenuhi.

• **Analisa Sidik Ragam**

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F tabel 5%	Ftabel 1%	Sig.
Perlakuan	3	1752.827	584.276	45.6	3.71	6.55	0.000
Galat	8	102.505	12.813				
Total	11	1855.333					

Lampiran 2 lanjutan

Setelah keempat varians terbukti sama, baru dilakukan uji ANOVA untuk menguji apakah keempat sampel mempunyai rata-rata yang sama.

F hitung output adalah 45.6

F tabel didapat dari tabel distribusui F untuk $\alpha=0.05$ dengan derajat bebas (v_1, v_2) 3,8 didapat angka 3.71 dan untuk $\alpha=0.01$ dengan derajat bebas (v_1, v_2) 3,8 didapat angka 6.55

Keputusan:

Terlihat bahwa F hitung adalah 45.6 dengan nilai probabilitas 0.000. Oleh karena F hitung > F tabel dan probabilitas < 0.05, maka rata-rata kadar MDA keempat perlakuan tersebut memang berbeda nyata.

Setelah diketahui bahwa ada perbedaan yang signifikan di antara keempat perlakuan, maka dilakukan uji lanjutan yaitu uji Tukey untuk mengetahui kelompok mana saja yang berbeda dan yang tidak berbeda.

• **Uji Tukey**

Kadar_SOD					
Perlakuan_SOD	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	
Tukey HSD ^a C	3	67.1167			
D	3	71.9933			
A	3		82.2633		
B	3			98.6833	
Sig.		.397	1.000	1.000	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
 a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Kesimpulan :

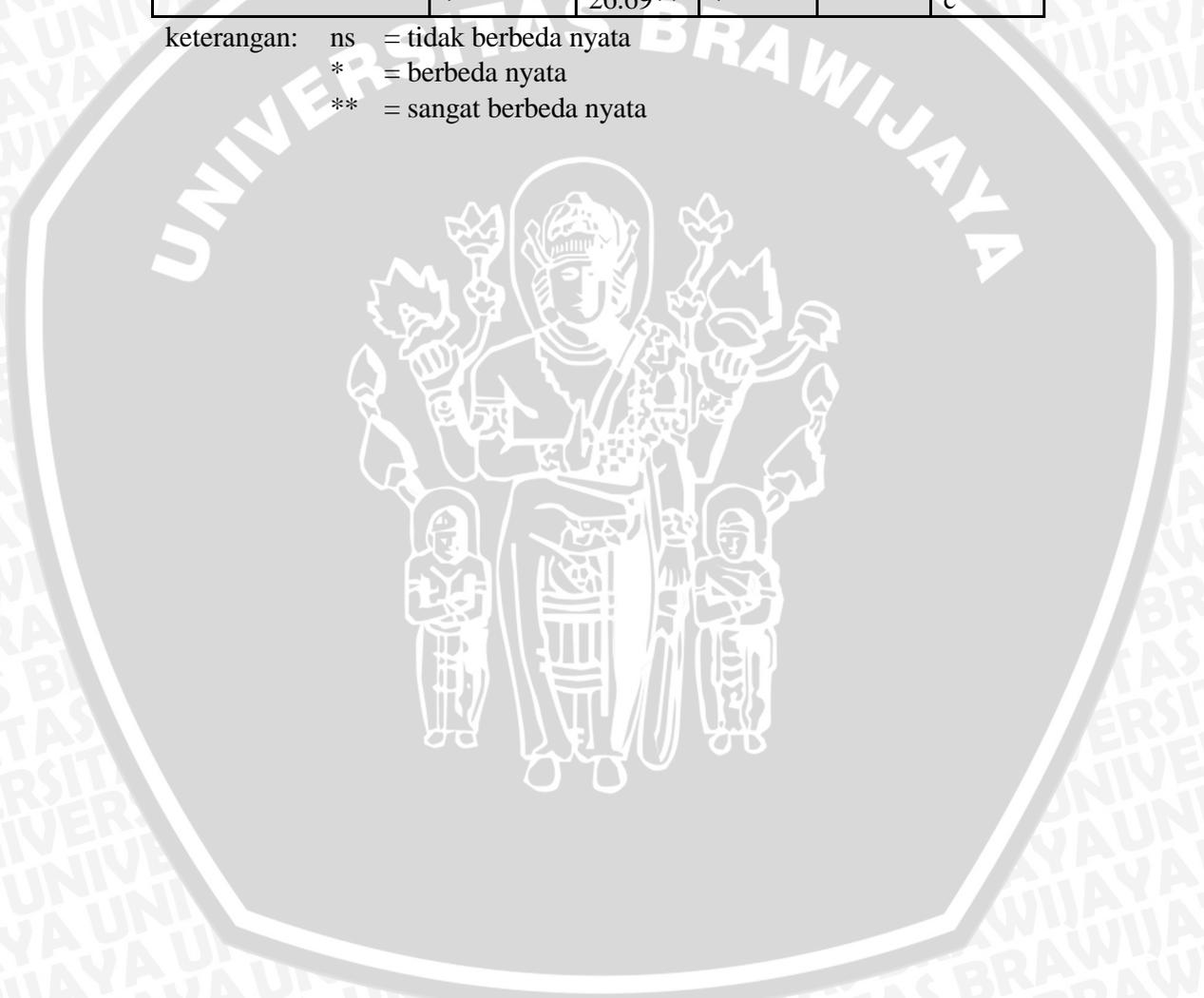
- Pada subset 1, terlihat grup dengan perlakuan C dan perlakuan D. Dengan kata lain, bis dikatakan perlakuan C dan perlakuan D tidak mempunyai perbedaan yang signifikan satu dengan yang lain.
- Pada subset 2, terlihat hanya grup dengan perlakuan A saja. Dengan kata lain, bis dikatakan perlakuan A punya perbedaan dengan perlakuan yang lain.
- Pada subset 3, terlihat hanya grup dengan perlakuan B saja. Dengan kata lain, bis dikatakan perlakuan B punya perbedaan dengan perlakuan yang lain.

Lampiran 2 lanjutan

Dari output diatas dapat dibuat tabel sebagai berikut:

Rata-rata Perlakuan	C	D	A	B	Notasi
C = 82.2633					a
D = 98.6833	4.8767ns				a
A = 67.1167	15.1467* *	10.27**			b
B = 71.9933	31.5667* *	26.69**	16.42* *		c

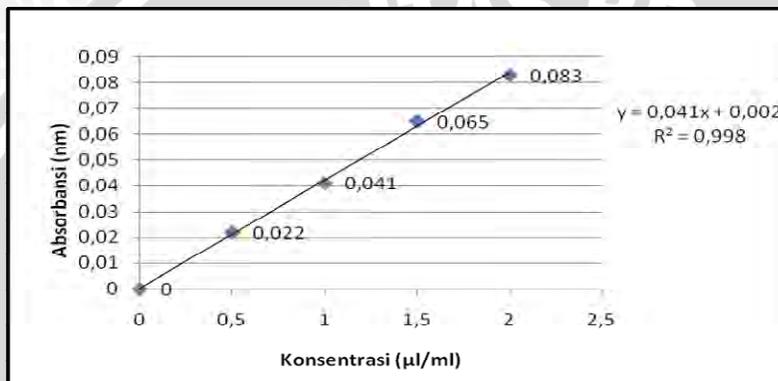
keterangan: ns = tidak berbeda nyata
 * = berbeda nyata
 ** = sangat berbeda nyata



Lampiran 3. Kurva Standard

Kurva Standard Kadar MDA

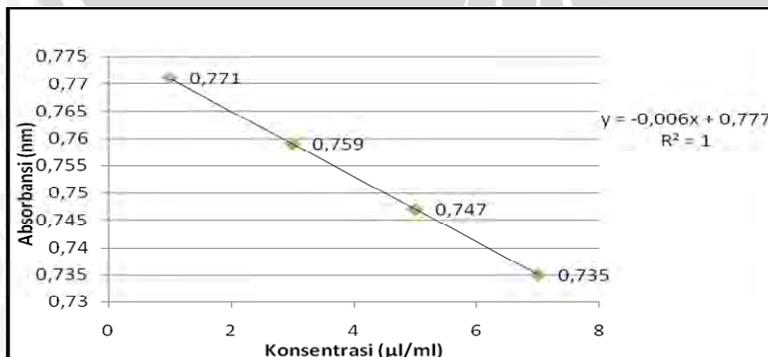
No.	Konsentrasi (µl/ ml)	Absorbansi
1	0	0
2	0,5	0.022
3	1	0.041
4	1,5	0.065
5	2	0.083



Grafik Hubungan Antara Konsentrasi Larutan Standar dengan Absorbansi

Kurva Standard Kadar SOD

No.	Konsentrasi (µl/ ml)	Absorbansi
1	1	0,771
2	3	0,759
3	5	0,747
4	7	0,735



Grafik Hubungan Antara Konsentrasi Larutan Standar dengan Absorbansi

Lampiran 3. Foto Kegiatan Penelitian



Preparasi sampel dengan bantuan arahan dosen pembimbing



Preparasi Sampel *N. oculata* dibantu rekan-rekan.

Proses Pengeringan Sampel



Sampel *N. oculata* kering siap diekstraksi



Proses Ekstraksi dengan Metode Sokletasi



Hasil Ekstrak Bahan Aktif *N. oculata*





Setting Rancangan Percobaan



Pemberian Ekstrak bahan aktif dengan cara oral



Pemberian Ekstrak bahan aktif dengan cara oral



Ikan Kerapu Tikus yang sehat



Ikan Kerapu Tikus yang telah terinfeksi bakteri (sirip-siripnya patah)



Bedah Ikan untuk mengambil Organ ginjal