

**FUNGSI *Peridinin Cell Pigment (PCP) Nannochloropsis oculata* DALAM
MENGINDUKSI SISTEM IMUN *Major Histocompatibility Complex (MHC I)*
IKAN KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*) PADA ORGAN INSANG**

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

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Oleh :

**ALFIA GITA KUNTARI
NIM. 105080101111028**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

**FUNGSI *Peridinin Cell Pigment (PCP) Nannochloropsis oculata* DALAM
MENGINDUKSI SISTEM IMUN *Major Histocompatibility Complex (MHC I)*
IKAN KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*) PADA ORGAN INSANG**

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

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

Oleh :

**ALFIA GITA KUNTARI
NIM. 105080101111028**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

SKRIPSI

FUNGSI *Peridinin Cell Pigment (PCP) Nannochloropsis oculata* DALAM
MENGINDUKSI SISTEM IMUN *Major Histocompatibility Complex (MHC I)*
IKAN KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*) PADA ORGAN INSANG

Oleh :

ALFIA GITA KUNTARI
NIM. 105080101111028

telah dipertahankan didepan penguji
pada tanggal 16 Desember 2014
dan dinyatakan telah memenuhi syarat
SK Dekan No. : _____

Tanggal : _____

Dosen penguji I

Dr. YUNI KILAWATI, S.Pi, MSi
NIP. 19730702 200501 2 001
Tanggal :

Dosen Penguji II

Dr. Ir. MULYANTO, M.Si
NIP.19600317 198602 1 001
Tanggal :

Menyetujui,
Dosen Pembimbing I

Prof. Ir. YENNY RISJANI, DEA, Ph.D
NIP.19610523 198703 2 003
Tanggal :

Dosen Pembimbing II

Dr. UUN YANUHAR, S.Pi, MSi
NIP. 19730404 200212 2 001
Tanggal :

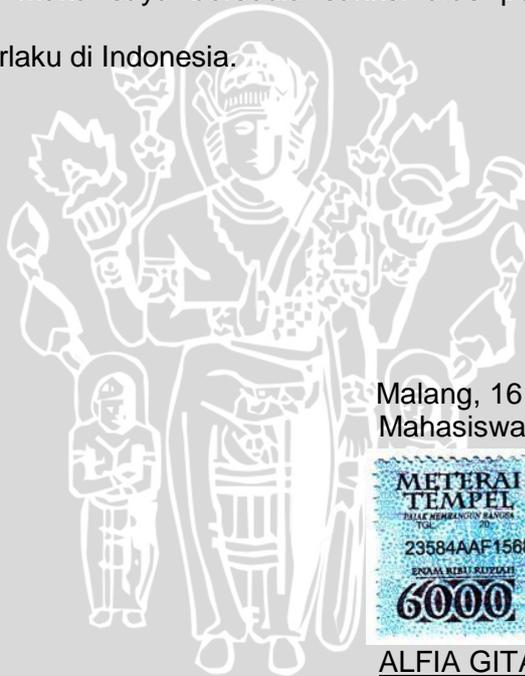
Mengetahui,
Ketua Jurusan

Dr. Ir. ARNING WILUJENG EKAWATI, MS
NIP. 19620805 198603 2 001
Tanggal :

PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.



Malang, 16 Desember 2014
Mahasiswa,



ALFIA GITA KUNTARI
NIM. 105080101111028

UCAPAN TERIMA KASIH

PENELITIAN INI ADALAH SEBAGIAN DARI PROGRAM PENELITIAN
UNGGULAN PAYUNG DIKTI DENGAN PROGRAM UNGGULAN HIBAH
PASCA SARJANA TAHUN 2012 DAN PROGRAM PENELITIAN UNGGULAN
PERGURUAN TINGGI UTAMA (U)-BOPTN 2013-2014

DENGAN JUDUL:

FUNGSI *Peridinin Cell Pigment (PCP) Nannochloropsis oculata* DALAM
MENGINDUKSI SISTEM IMUN *Major Histocompatibility Complex (MHC I)*
IKAN KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*) PADA ORGAN INSANG

YANG DIBIYAI OLEH:

DIREKTORAT JENDRAL PENDIDIKAN TINGGI
KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN, MELALUI DIPA
UNIVERSITAS BRAWIJAYA NOMOR: DIPA-023.04.2.424989/2013, TANGGAL
5 DESEMBER 2012, DAN BERDASARKAN SK REKTOR UNIVERSITAS
BRAWIJAYA NOMOR: 295/SK/2013 TANGGAL 12 JUNI 2013

YANG MELIBATKAN MAHASISWA S1 DAN S2:

1. NUNING RATNA, S.Pi
2. KHUMAIDI, S.Pi
3. CATUR WAHYUDI
4. ALFIA GITA KUNTARI
5. LENI SRI WAHYUNI
6. LUQMAN HARIONO
7. AMIRA MASHITA
8. DIAN NOVALISA
9. YOVAN ENDIK IRAWANTO
10. ARIF BAGUS ZAENURI
11. NANUK HIDAYAH
12. NOVIA PRADIPTA
13. FAHMI ABDURRAHMAN

Mengetahui,
Ketua Peneliti

Dr. UUN YANUHAR, S.Pi, M.Si
NIP. 19730404 200212 2 001

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Sujud dan terima kasih yang dalam penulis persembahkan **Kedua orang tua** yaitu ayahanda **Teguh Priyantono Adi** dan Ibu **Luluk Agustin**, adik tersayang **Sabila Ayu Kuntari** dan seluruh keluarga besar terima kasih atas do'a, semangat, kasih sayang dan dukungannya.
2. **Eros Arif Nugraha** yang selalu menemani, mendukung, dan memberikan semangat penuh kepada penulis, setia menjadi bagian hidup penulis baik suka maupun duka, Salam Metallica yes, stay cool as always you do!! beserta Bapak, ibu, embak dan sekeluarga besar. Terima kasih banyakk.
3. Ibu Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, Ph.D dan Ibu Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si selaku dosen pembimbing yang telah membimbing dan mengarahkan penulis dalam menyelesaikan Tugas Akhir. Mommy Uun terima kasih atas semua pengalaman dan pelajarannya buat tim kerapu, stay young mom^^
4. Ibu Dr. Yuni Kilawati dan Bapak Dr. Mulyanto selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan masukan yang bermanfaat dan membangun bagi penulis.
5. qaa kece mas Prayogi Adhiatma, ST, ibu dosen cantik Dwi Candra pratiwi, M.Sc, mbak Wirastika, M.Si, mas Patria Adhiwarawan, mas Itok, mbak Endah, mas iqbal, mas ukik, mas Aris dan adek-adek sepupu Icing, Yupi, Remon, Reza, Dewo, Bian, Artha, Sara, Vivi, Sinby, Kenzi, Sakha semangat menempuh masa depan yes!
6. Terima kasih banyak-banyak kepada trio ciwiciwi Anna Choirun Nisa' as kaknnah, terima kasih sudah mengisikan pulsa meskipun tiap akhir minggu ngasih total tagihan; Naylil Hariroh as kakkilil, terima kasih buat makanan-makanan yang bejibun, aku gagal diet gara-gara kamu heuheu; Christin Nurhaidah as mamtin, makasih sudah selalu ada memberi motivasi dan selalu optimis, makasih rendang ayam khas bataknya!! Salam Aciro!
7. **Rekan-rekan MSP 2010**; Meuthia, Emon, Lenti, Arik, Eny, Nena, Syafrica, Amel, Danita, Rieska Ayu, Gisyana, Risma, Nada, Badzlina, Desi, Puput, Qusnul, Marsha, Fitri, Talita, Nevi, Alm. Morita Selviana Tarigan, Habibah, RR Purwati, Septalia, Arsy yanottama, Alviani, Paundra, Ali, Ukasyah, Deni,

Wiji, Andik, Bayu Dwi, Tsanil, Bayu Hendra, Muchlis, Roland Sone, dan @UltrasMSP2010 lainnya yang tidak disebutkan namanya satu persatu yang telah memberikan do'a dan bantuan ikut berperan dalam memperlancar dalam menyelesaikan tugas akhir.

8. **HUMANERA!!** Terima kasih sudah diizinkan menjadi bagian dari keluarga ini; Aya, Aqilla, Swindu, Nurhikma, Addinia, Arditha, Cahyo, Babil, Renanda, Febri dan semuanya yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu.
9. Tim PKM-M "**Area Platinum Mangrove**", Rizky Rizaldi, Dito Aditya, Afifah Qodri, dan Shahnaz Priwingsatiningrum. Juga Fatma, Terima kasih atas kesempatan untuk menjadi bagian dari kalian, terima kasih monev rasa diktinya! Sidoasri dan mangrove yang menawan. Mangrove Wonorejo beserta pak Sony terima kasih atas ilmu yang bermanfaat. Semoga bisa melanjutkan proker kita yang entah dimana ini yaa.
10. Teman-teman **TIM ALGA**, Leni Wijaya, Catur Wahyudi, Luqman Hariono, Terimakasih atas kerjasama dan semangat yang "biasa aja" ini yaa hahaha dan terima kasih atas jadwal liburnya buat aku.
11. Kakak, adik tim alga dan tim Glikogen yang sudah bersedia membantu dan memberikan semangat kepada penulis, terima kasih mas Kumaidi, mbak Nuning, Amira, Lisa, nanuk, Dita, Yovan, Ima rohima, Ainul, Rifqy, Fahmi, Arif, Ocha, Fariq, Elitalia.
12. **Laboran laboratorium Ilmu-ilmu Perairan** bu Elma, pak sul, mbak Hawa dan mbak Mega; **Laboran Laboratorium Biosains** mbak Wahyu, Pak Wira dan rekan-rekan; **Laboran Laboratorium Biomol-FMIPA** mbak susi; **Laboran laboratorium FAAL**; **Laboran Laboratorium Biomedik**, mas Yuda; terima kasih sudah melayani tim kami dengan kesabaran dan baik hati.
13. **Terima kasih banyak Balai Budidaya Air Payau (BBAP) Situbondo.**
14. Untuk **sumpersari 290C** Dea Afita, mbak Dyah, mbak Nina, mbak Putri, dekmon, Ulfa, Chika, Cindy Viona, Ega semoga lancar skripsi dan tesisnya semuaaaa, dan terima kasih untuk Pak Ju maaf kalau banyak merepotkan.
15. **Rekan-Rekan asisten praktikum Fisiologi Hewan Air**; pak coas pada masanya Ajrun Chabib, Widya, Annisa Bias, Cecil, Arif Dastaman, Riska, Berul, mbak Maya, mbak Mega, mbak Isma, mas Haris, mas Cahyo, mas Hendy, mas Faisal, mbak Nuri, mbak Ricita, mas Indra, mas Hendra. Dan laboran Laboratorium Reproduksi dan Pemuliaan ikan pak Yit dan pak Udin.

16. **Rekan-rekan asisten Dinamika Populasi;** Atnia, Citra, mas Alput, Fahmi, Rizal, Jupe, dan kawan-kawan lainnya, terima kasih sudah menjadikan aku bagian dari kalian, maaf kurang optimal haha.
17. **Rekan-rekan asisten Kimia Dasar** terima kasih atas perjuangan melawan lelah wira-wiri ke tempat praktikum.
18. **Rekan KKN Gunung Rejo (Gunjo)** satu dan dua; Nandarningtyas, Rani Matiinu, Andhang Sebastian, Dedi Syahputra, Evi Novita, Zakki Ramadhan, Ardi Nugroho, Prisma Anggoro, Annisa Fitri, Rena Ayu, M. Auli, Audi Wibowo, Rizky Rahmawati, Rio Cahyo, Rizky Fitri, Dwi Septiani, Sherly Megawati, Elma Rosita, Khafidz, Windia Malasari, dan rekan lainnya yang belum tersebut namanya.
19. **Sosial Media**, terima kasih sudah menjadi tempat sampah untuk saya. Terima kasih instagram, path, tumblr, ask.me, dan twitter @dagelan @wow_spongebob @yeahmahasiswa @MerryRiana dan yang lainnya yang turut menyumbang semangat dan kata-kata optimis di pagi dan malam hari.
20. Kepada berbagai pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu per satu yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan laporan Tugas Akhir.

Penulis menyadari jika dalam laporan ini masih belum sempurna. Untuk itu mohon masukan, kritik yang baik sehingga dapat menyempurnakan tulisan dalam laporan ini, sehingga bisa bermanfaat untuk semuanya.

Malang, 16 Desember 2014

Penulis

Find me
[at]gitakuntari

RINGKASAN

ALFIA GITA KUNTARI. Skripsi mengenai FUNGSI *Peridinin Cell Pigment* (PCP) *Nannochloropsis oculata* DALAM MENGINDUKSI SISTEM IMUN *Major Histocompatibility Complex* (MHC I) IKAN KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*) PADA ORGAN INSANG (dibawah bimbingan **Prof. Ir. YENNY RISJANI, DEA, Ph.D dan Dr. UUN YANUHAR, S.Pi, M.Si**).

Nannochloropsis oculata adalah mikroalga laut yang hidupnya dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti suhu, intensitas cahaya, salinitas, oksigen terlarut (DO) dan derajat keasaman (pH). Banyak nutrisi yang terkandung didalam *N. oculata*, seperti *Peridinin Cell Pigment* (PCP) yang letaknya terlindungi oleh dinding sel. Cara untuk memperoleh PCP dari dalam sel yaitu dengan mengisolasi protein menggunakan teknik manual maupun menggunakan teknologi seperti pemisahan molekul dengan sentrifuge. PCP sebagai agen hayati memiliki fungsi sebagai imunostimulan yang mampu merespon kekebalan fisik pada organisme vertebrata. Kendala yang sering terjadi pada kegiatan budidaya ikan Kerapu Tikus adalah kematian massal yang menyerang ikan pada usia larva. Hal ini dipicu oleh karena ikan belum mempunyai sistem imun secara sempurna. Protein MHC I mampu diekspresikan pada semua permukaan sel yang berinti dan bertugas mempresentasikan antigen peptida ke sel T Sitotoksik (Tc) untuk menghancurkan sel yang mengandung patogen tersebut.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan pengaruh PCP pada *N. oculata* dalam menginduksi sistem imun MHC I pada insang ikan Kerapu Tikus. Metode yang digunakan dalam penelitian adalah deskriptif dengan teknik pengambilan data meliputi data primer dan data sekunder. Pengumpulan data dilakukan dengan cara observasi lapangan dan studi pustaka. Teknik pengambilan sampel dilakukan melalui beberapa tahapan, yaitu dimulai dengan melakukan kultur massal *N. oculata* yang dilanjutkan pada tahapan isolasi PCP *N. oculata*, uji in vivo PCP pada ikan Kerapu Tikus, pengamatan MHC I pada insang ikan Kerapu Tikus dengan menggunakan *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) dan Imunohistokimia (IHC). Data pendukung yang digunakan dalam penelitian ini adalah data kualitas air yang meliputi parameter fisika yang terdiri dari suhu dan salinitas dan parameter kimia yang terdiri dari pH dan oksigen terlarut.

Hasil SDS-PAGE PCP *N. oculata* memperoleh 11 pita protein dengan Berat Molekul (BM) dimulai dari 6,63 kDa, 10,7 kDa, 13 kDa, 15,62 kDa, 21 kDa, 28 kDa, 37 kDa, 50,12 kDa, 61,23 kDa, 73,5 kDa sampai dengan 91,41 kDa. Pita protein PCP ditemukan pada rantai panjang (monomer) dengan BM 37 kDa. Pengujian in vivo ikan dengan menggunakan PCP dilakukan sebanyak 6 kali selama 23 hari masa pemeliharaan. Yaitu pada hari ke-0, hari ke-5, hari ke-9, hari ke-14, hari ke-18 dan hari ke-22. Selama masa pemeliharaan, ikan diberikan makan secara *adlibitum* dengan menggunakan ikan kembung rucah yang telah disesuaikan dengan bukaan mulut ikan. Setelah masa pemeliharaan, ikan Kerapu Tikus rata-rata mengalami penambahan berat badan, dan berat ikan ikan perlakuan lebih tinggi dibandingkan dengan ikan kontrol.

Hasil pengamatan ekspresi molekul MHC I pada organ insang ikan Kerapu Tikus kontrol adalah 44,22 kDa dan pada insang ikan perlakuan adalah 44,65 kDa. Pada insang ikan kontrol ditemukan sedikit kemunculan protein target MCH I sedangkan pada insang ikan perlakuan, protein MHC I ditemukan dengan

jumlah yang lebih banyak dengan munculnya warna coklat pada hasil pengamatan. Beberapa kerusakan insang ditemukan pada insang ikan kontrol seperti edema, hiperplasia, fusi dan hilangnya struktur lamella sekunder pada insang. Hal ini berbeda dengan hasil yang diperoleh pada insang ikan perlakuan, didapatnya lebih sedikit kemunculan kerusakan jaringan pada insang yaitu edema dan hiperplasia saja pada ikan yang telah ditambahkan PCP pada saat perlakuan. Kerusakan jaringan yang muncul dari ikan kontrol maupun ikan perlakuan disebabkan oleh adanya gangguan fisika air seperti suhu dan perubahan pH air yang disebabkan oleh hujan yang mengakibatkan perairan menjadi asam. Selain itu gangguan kesehatan pada ikan juga dapat menyebabkan munculnya gangguan patologis diatas. Pengukuran kualitas air dilakukan pada pagi dan sore hari. Hasil pengukuran kualitas air yaitu, suhu perairan berkisar antara 29-30 °C, salinitas berkisar antara 28-30‰, pH memiliki nilai konstan yaitu 8 sedangkan hasil pengukuran oksigen terlarut (DO) memiliki kisaran antara 5,84-6,06 mg/l

Kesimpulan dari penelitian ini adalah Protein MHC I pada insang kontrol mempunyai BM sebesar 44,22 kDa dan pada insang perlakuan mempunyai BM sebesar 44,65 kDa. Terekspresi MHC I karena adanya penambahan agen hayati yang berasal dari PCP mikroalga laut *N. oculata* sebagai imunostimulan melalui metode Imunohistokimia (IHC). Muncul beberapa kerusakan jaringan insang seperti edema, hiperplasi, fusi dan berubah struktur lamella pada insang ikan kontrol, pada ikan perlakuan hanya muncul edema dan hiperplasia saja. *N. oculata* dapat meningkatkan sistem imun pada ikan dan membentuk antibodi sehingga jika ada benda asing masuk, maka MHC I akan mempresentasikan benda asing tersebut dengan baik ke permukaan sel.

Saran yang dapat diberikan pada penelitian ini adalah perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai PCP sebagai bahan hayati yang dapat mempengaruhi sistem imun ikan Kerapu Tikus. Perlu adanya rekayasa MHC I lainnya yang dapat menanggulangi atau mencegah kematian massal pada ikan.



KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan syukur kehadirat Allah SWT karena atas berkat limpahan rahmat, taufik dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan laporan skripsi yang berjudul FUNGSI *Peridinin Cell Pigment* (PCP) *Nannochloropsis oculata* DALAM MENGINDUKSI SISTEM IMUN *Major Histocompatibility Complex* (MHC I) IKAN KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*) PADA ORGAN INSANG. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat meraih gelar sarjana Perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

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

Malang, 16 Desember 2014

Penulis

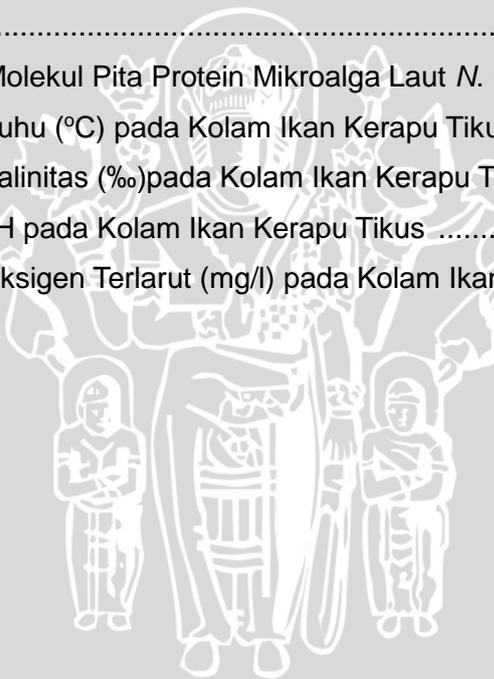
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
UCAPAN TERIMA KASIH	iv
RINGKASAN	viii
PENGANTAR	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat	4
1.5 Waktu dan Tempat	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Ikan Kerapu Tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>)	
2.1.1 Klasifikasi	6
2.1.2 Morfologi	7
2.1.3 Habitat dan Penyebaran	8
2.1.4 Reproduksi	9
2.1.5 Kebiasaan Pakan dan Pakan	9
2.1.6 Kualitas Air ikan Kerapu Tikus	11
2.2 Morfologi Insang	14
2.3 Mikroalga <i>N. oculata</i>	
2.3.1 Klasifikasi	17
2.3.2 Morfologi	17
2.3.3 <i>Pirenoid (peridinin Cell Pigment/PCP)</i>	19

2.3.4 Biologi dan Habitat	21
2.3.5 Fase pertumbuhan	21
2.3.6 Pertumbuhan <i>N. oculata</i>	24
2.4 Sistem Pertahanan Tubuh Ikan	28
2.4.1 Sistem Imun Non Spesifik	30
2.4.2 Sistem Imun Spesifik	32
2.5 <i>Major Histocompatibility Complex Class I</i> (MHC I)	36
3. MATERI DAN METODE PENELITIAN	
3.1 Materi Penelitian	39
3.2 Alat dan Bahan.....	39
3.3 Metode Penelitian	39
3.4 Teknik Pengambilan Sampel.....	42
3.5 Prosedur Penelitian	
3.5.1 Proses Isolasi Protein <i>N. oculata</i>	47
3.5.2 Elektroforesis Protein dengan Metode SDS-PAGE	
A. Menyiapkan Sampel	49
B. Pembuatan Media/Gel Elektroforesis SDS-PAGE	49
C. Running Elektroforesis SDS-PAGE	51
D. Running Sampel	51
E. Pewarnaan Media/Gel Hasil SDS-PAGE	52
3.5.3 Pengukuran Berat Molekul	53
3.5.4. Aklimatisasi Ikan Kerapu Tikus	53
3.5.5 Imunohistokimia (IHC)	54
3.5.6 Western Blotting	56
3.5.7 Pengukuran Kualitas Air	58
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Kultur Mikroalga Laut <i>N. oculata</i>	60
4.2 Isolasi PCP <i>N. oculata</i>	61
4.3 Profil PCP <i>N. oculata</i>	64
4.4 Pengujian In Vivo Ikan Kerapu Tikus	67
4.5 Profil Protein Insang Ikan Kerapu Tikus menggunakan SDS-PAGE	68
4.6 Hasil Uji IHC PCP <i>N. oculata</i> pada Insang ikan kerapu Tikus	73
4.7 Data Kualitas Air	88
5. PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	97
5.2 Saran	97
DAFTAR ISTILAH	98
DAFTAR PUSTAKA	101
LAMPIRAN	106

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Klasifikasi ikan Kerapu Tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>)	6
2. Klasifikasi Mikroalga <i>N. Oculata</i>	17
3. Komposisi Medium Pembiakan <i>N. Oculata</i>	24
4. Syarat Media Tumbuh <i>N. Oculata</i>	25
5. Perbedaan imunitas Spesifik Humoral dan Selular	36
6. Komposisi dalam 1 larutan Staining dan Destaining.....	52
7. Perhitungan Berat Molekul Pita Protein molekul standar <i>Low Range Marker</i> PRO-STAIN™	65
8. Perhitungan Berat Molekul Pita Protein Mikroalga Laut <i>N. Oculata</i>	66
9. Hasil Pengukuran Suhu (°C) pada Kolam Ikan Kerapu Tikus	89
10. Hasil Pengukuran Salinitas (‰) pada Kolam Ikan Kerapu Tikus	91
11. Hasil Pengukuran pH pada Kolam Ikan Kerapu Tikus	93
12. Hasil Pengukuran Oksigen Terlarut (mg/l) pada Kolam Ikan Kerapu Tikus	95

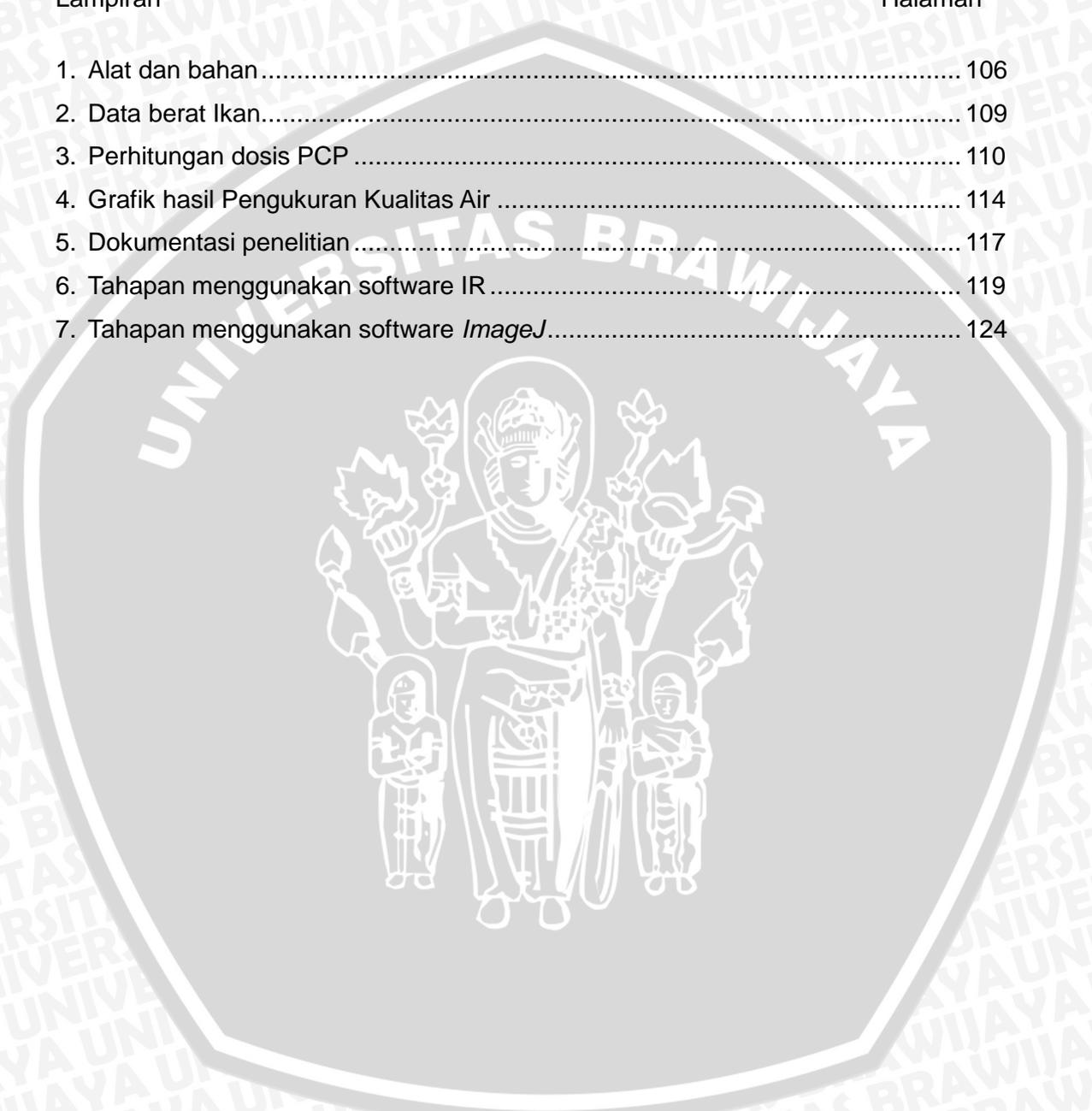


DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Morfologi ikan Kerapu Tikus	7
2. Skema Jenis dan pakan Pemberian Larva ikan Kerapu	11
3. Morfologi Insang	15
4. Morfologi <i>N. oculata</i>	18
5. Letak <i>Pireloid</i> di dalam Sel	20
6. Grafik Fase Pertumbuhan <i>N. oculata</i>	24
7. Gambaran Umum Sistem Pertahanan Tubuh	29
8. Pengarahan makrofag dan bahan Antimikrobal dan Sirkulasi darah	31
9. Perbedaan Humoral (Limfosit B) dan Selular (Limfosit T)	34
10. Aktivasi Sel T Penolong	37
11. Proses Penyaringan dan Penggerusan sampel <i>N. oculata</i>	62
12. Hasil Sentrifuge Sampel <i>N. oculata</i>	63
13. Profil PCP <i>N. oculata</i> dengan SDS-PAGE	64
14. Grafik linear pita protein marker <i>N. oculata</i>	65
15. Hasil SDS-PAGE Insang Ikan Kontrol	69
16. Hasil SDS-PAGE Insang Ikan Perlakuan PCP	72
17. Hasil Profil Insang Kontrol Ikan Kerapu Tikus menggunakan IHC	74
18. Grafik model ekspresi IHC insang ikan kontrol	77
19. Hiperplasia sel-sel epitel lamella insang	78
20. Edema pada jaringan ikan Asang	79
21. Hilangnya struktur lamella dan Fusi	80
22. Hasil Profil Insang perlakuan Ikan Kerapu Tikus menggunakan IHC	82
23. Grafik model ekspresi IHC insang perlakuan	84
24. PCP dalam mengaktivasi sistem imun	87

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alat dan bahan.....	106
2. Data berat lkan.....	109
3. Perhitungan dosis PCP	110
4. Grafik hasil Pengukuran Kualitas Air	114
5. Dokumentasi penelitian	117
6. Tahapan menggunakan software IR	119
7. Tahapan menggunakan software <i>ImageJ</i>	124



DAFTAR SINGKATAN

μ l	mikro liter
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
BB	Berat Molekul
BBAP	Balai Budidaya Air Laut
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CTC	<i>Cytotoxic T cell</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	<i>Etilen Diamin Tetra Acetat</i>
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
IFN	<i>Interferon</i>
Ig	<i>Imunoglobulin</i>
IHK	Imunohisto Kimia
kDa	kilo Dalton
LSIH	Laboratorium Sentral Ilmu Hayati
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
ml	mili liter
mm	Mili meter
NK	<i>Natural Killer</i>
nm	Nano meter
PBS	<i>Phospat Buffer Saline</i>
PCP	<i>Peridinin Cell Pigment</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RSB	<i>Reducing Sampel Buffer</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Elektrophoresis</i>
Tc	<i>Sel T cytotoxic</i>
TEMED	<i>Tetra Ethylene Diamine</i>

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Budidaya ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) banyak dilakukan karena mempunyai nilai ekonomi tinggi. Selain sebagai ikan konsumsi, ikan Kerapu Tikus juga banyak diminati oleh konsumen sebagai ikan hias. Namun, para pembudidaya ikan Kerapu Tikus patut was-was terhadap beberapa kendala yang muncul dan menghambat kegiatan budidaya. Hambatan yang muncul seperti timbulnya berbagai penyakit terutama ketika ikan berada pada usia larva hingga juvenil. Kematian massal yang menyerang ikan Kerapu Tikus pada usia ini rentan sekali terjadi karena sistem imun atau kekebalan tubuh masih lemah dan belum terbentuk sempurna untuk melawan benda asing yang masuk kedalam tubuh.

Berbagai penelitian mengenai penanggulangan kematian massal banyak dilakukan untuk mencegah petani ikan Kerapu merugi. Akan tetapi saat ini penanggulangan penyakit ataupun virus masih terbatas pada pemakaian bahan-bahan kimia. Pada umumnya bahan-bahan tersebut tidak selektif sehingga dikhawatirkan akan menurunkan mutu lingkungan dan bersifat resisten pada patogen (Yanuhar, 2009). Salah satu cara untuk menghindari kegiatan yang kurang ramah lingkungan adalah dengan memanfaatkan materi nabati sebagai imunostimulator. Kandungan *Peridinin Cell Pigment* (PCP/Pirenoid) dalam mikroalga seperti *Nannochloropsis oculata* belum banyak yang dieksplorasi oleh ilmuan Indonesia. PCP merupakan salah satu komponen penyusun nutrisi pada *N. oculata*, dapat digunakan sebagai anti bakteri dan virus. Impra (2009), mengatakan bahwa protein dalam bentuk enzim berperan sebagai katalis dalam

bermacam proses biokimia. Sebagai alat pelindung seperti antibodi yang terbentuk jika tubuh kemasukan zat asing.

PCP dapat larut dalam air dan merupakan bagian dari protein. Berperan dalam proses fotosintesis dan mempunyai kemampuan sebagai antibodi dan antioksidan. Weis, *et al.* (2002) dalam Zulfikri (2013), membagi PCP dalam dua bentuk, satu sebagai homodimer (bentuk pendek) dengan berat molekul antara 14-16 kDa dan yang lainnya sebagai bentuk monomer (bentuk panjang) dengan berat molekul antara 30-39 kDa. Bentuk rantai ini mempunyai fungsi fisiologis sebagai antioksidan, dimana pirenoid merupakan senyawa yang melindungi sel dari efek berbahaya benda asing atau radikal bebas.

PCP sendiri terletak didalam sel yang dilindungi oleh dinding sel dalam *N. oculata*. Selnya berwarna kehijauan, berbentuk bola dengan diameter 2-4 μm dan tidak berflagel. Termasuk kedalam kelas *Eustigmatophyceae* yang merupakan salah satu pakan alami (*livefood*) untuk larva ikan atau udang dan berperan sebagai pakan dari zooplankton, rotifer dan artemia (Sasmita, 2004 dalam Safitri, *et al.*, 2013). Pertumbuhan *N. oculata* sangat bergantung pada intensitas cahaya matahari untuk menjalankan proses fotosintesis. Kurangnya cahaya yang dibutuhkan akan menyebabkan proses fotosintesis tidak berlangsung normal sehingga mengganggu metabolisme. Selain mengandung PCP, Ernest (2012), mengatakan *N. oculata* memiliki banyak kandungan nutrisi dengan presentase protein 52,11%; karbohidrat 16,00% dan lemak 27,64%.

Salah satu upaya dalam melawan benda asing baik berupa virus, bakteri maupun mikroba adalah adanya sistem imun yang baik dalam tubuh makhluk hidup dalam hal ini adalah Kerapu Tikus. Salah satunya adalah *Major Histocompatibility Complex* (MHC) terdapat pada hampir semua permukaan sel-sel tubuh organisme. Dalam sistem imun ikan, merupakan suatu kelompok gen yang bersama-sama terletak dalam kromosom tunggal pada vertebrata yang

berfungsi untuk mempresentasikan peptide-peptida kepada sel T. Terdapat tiga golongan molekul MHC yaitu MHC kelas I, MHC kelas II, dan MHC kelas III (Baratawidjaja dan rengganis, 2010). MHC disekresikan oleh banyak sel yang memiliki nukleus akibat adanya paparan suatu antigen atau stimulasi yang telah mengenai reseptor permukaan sel. MHC I telah diidentifikasi berperan dalam mempresentasikan antigen intraseluler dalam sitosol kepada sel T cytotoxic (sel Tc) yang biasanya berupa asam nukleat dari virus maupun protein lainnya yang bersifat intraseluler.

MHC I disebut pula antigen transplantasi karena molekul MHC terdiri dari berbagai macam HLA yang dapat dikenal sel CTL/Tc, pertama kali diketahui berperan pada penolakan tandur. Molekul MHC I terdiri dari dua polipeptida, rantai berat polimorfik dan rantai ringan nonpolimorfik yang disebut $\beta 2$ mikrogobulin. Locus MHC I menentukan ekspresi atau antigen permukaan pada membran permukaan semua sel tubuh yang memiliki nukleus dan trombosit.

Peran MHC didalam tubuh sangat penting untuk mempresentasikan adanya bahaya atau benda asing didalam tubuh yang akan mengganggu kelangsungan ikan Kerapu Tikus. Mengingat ikan Kerapu Tikus mempunyai nilai ekonomi tinggi, hal ini memaksa para pembudidaya patut was-was terhadap ancaman berbagai macam penyakit terutama ketika ikan Kerapu Tikus masih berusia larva. Usia ini rentan terserang penyakit karena sistem imun yang belum terbentuk sempurna didalam tubuh. Dengan adanya PCP diharapkan Protein ini dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh atau disebut sebagai biomaker pada ikan uji yang digunakan. Impra (2009), menyebutkan bahwa fungsi PCP sebagai antibodi didalam tubuh. Ekspresi MHC I yang terjadi pada tubuh ikan Kerapu Tikus, khususnya pada jaringan insang diharapkan mampu meningkatkan sistem imun setelah pemberian materi nabati sebagai

imunostimulator, maka fungsi PCP sebagai biomaker yang mampu meningkatkan imunitas pada organisme.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas maka dapat dirumuskan bahwa apakah PCP pada *N. oculata* mampu menginduksi sistem imun MHC I ikan Kerapu Tikus pada organ insang.

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan pengaruh PCP pada *N. oculata* dalam menginduksi sistem imun MHC I ikan Kerapu Tikus pada organ insang.

1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat Teoritis

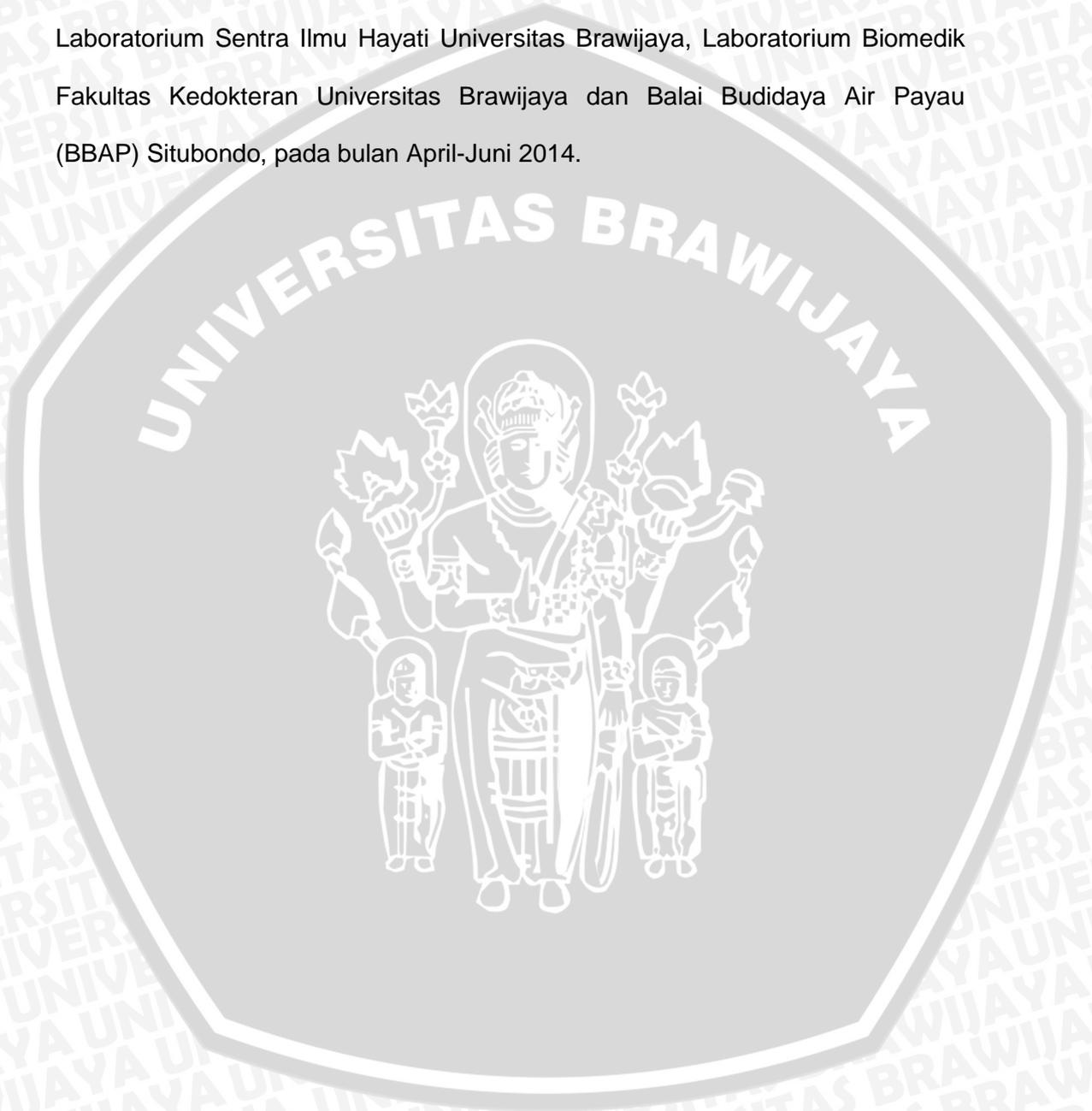
Memberikan informasi mengenai PCP yang diisolasi dari Mikroalga laut *N. oculata* baik dari segi profil protein hingga berat molekul sehingga dapat dilakukan eksplorasi potensi *Pirenoide* sebagai bahan hayati yang berpotensi sebagai antiviral pada penyakit infeksi pada ikan melalui analisa proteomik maupun genomik.

1.4.2 Manfaat Praktis

Sebagai langkah awal dalam menyusun suatu protein rekombinan berbahan materi hayati untuk selanjutnya bisa digunakan dalam perancangan vaksin untuk ikan kerapu ataupun spesies ikan lain terhadap infeksi yang dapat merugikan petani ikan.

1.5 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Ilmu-Ilmu Perairan dan Laboratorium Bioteknologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Laboratorium Biologi Molekuler FMIPA Universitas Brawijaya, Laboratorium Sentra Ilmu Hayati Universitas Brawijaya, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Balai Budidaya Air Payau (BBAP) Situbondo, pada bulan April-Juni 2014.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*)

2.1.1 Klasifikasi

Ikan Kerapu Tikus tergolong ke dalam famili Serranidae, yaitu memiliki ciri-ciri badan kuat, agak pipih, dari lonjong sampai bulat, agak panjang sampai memanjang dan tubuhnya tertutup oleh sisik-sisik kecil. Ikan kerapu Tikus dikenal sebagai ikan hias atau “panther Fish”. Setelah ikan ini menjadi besar, akan menjadi ikan konsumsi yang bergensi karena harganya yang mahal. Berikut taksonomi ikan Kerapu Tikus dapat dilihat pada Tabel 1:

Tabel 1. Klasifikasi ikan Kerapu Tikus

Kingdom	Animalia
Phylum	Chordata
Sub Phylum	Vertebrata
Class	Osteichthyes
Sub Class	Actinoperigi
Ordo	Percomorphi
Sub Ordo	Percoidea
Famili	Serranidae
Genus	Cromileptes
Spesies	<i>Cromileptes altivelis</i>

Sumber : Ahmad (1991) dalam Amiruddin, *et al.* (2012)

Ikan Kerapu Tikus juga mempunyai banyak nama lokal. Di Australia, ikan ini dikenal dengan nama Barramundi Cod, di Jepang dikenal dengan Sarasa-hata sedangkan di Singapura dikenal dengan Polka-Dotgrouper. Bagi orang Indonesia dan Malaysia Kerapu Tikus dikenal dengan nama Kerapu Tikus, Kerapu Belida dan Kerapu Sonoh (Evalawati, *et al.*, 2001).

2.1.2 Morfologi

Ikan Kerapu Tikus memiliki ciri-ciri morfologi sirip dorsal X, 17-19; sirip anal III, 10; sirip pectoral 17-18; sirip garis lateral 53-55; sirip berbentuk *sikloid*; bagian dorsal berbentuk cembung (*concave*) (Yanuhar, 2012). Amiruddin, *et al.* (2012), mengatakan bahwa panjang total ikan Kerapu Tikus adalah 3,3-3,8 kali tingginya, panjang kepala seperempat panjang total, leher bagian atas cekung dan semakin akan semakin cekung. Ikan Kerapu Tikus ini memiliki ciri lain pada sirip punggung yang semakin kebelakang akan semakin melebar, warna putih kadang kecoklatan dengan total hitam terlihat jelas pada badan, kepala dan sirip. Morfologi ikan Kerapu Tikus dapat dilihat pada Gambar 1:



A

B

Gambar 1. Morfologi Ikan Kerapu Tikus. A: Dokumentasi pribadi. B: Google (2014)

Sudaryanto (2002), bentuk tubuh bagian punggung meninggi dengan bentuk cembung (*concave*), sementara panjang tubuh maksimalnya mencapai 70 cm. Ikan ini tidak memiliki gigi *canine* (gigi yang terdapat pada geraham ikan). Lubang hidungnya besar berbentuk bulan sabit vertikal. Kulitnya berwarna terang abu-abu kehijauan dengan bintik-bintik hitam di deluruh kepala, badan dan sirip. Pada Kerapu Tikus muda, bintik hitamnya lebih besar dan sedikit.

2.1.3 Habitat dan Penyebaran

Beberapa spesies ikan Kerapu dapat ditemukan pada kedalaman 100-200 meter, terkadang sampai pada kedalaman 500 meter. Tetapi umumnya memiliki habitat pada kedalaman 100 meter. Sebagian besar spesies Kerapu berasosiasi dengan terumbu karang di daerah dangkal dan beberapa tinggal di kawasan estuari dan berbatu, berpasir dan berlumpur, meskipun juvenile ikan Kerapu ditemukan pada lamun (Habibi, *et al.*, 2002). Menginjak masa dewasa, ikan Kerapu Tikus bermigrasi ke perairan lebih dalam, antara 7-40 m. Biasanya perpindahan ini berlangsung pada siang dan sore hari. Telur dan larva bersifat pelagis sedangkan kerapu muda hingga dewasa bersifat demersal. Ikan Kerapu merupakan organisme yang bersifat nocturnal, dimana pada siang hari lebih banyak bersembunyi di liang-liang karang dan pada malam hari aktif bergerak di kolom air untuk mencari makanan. Ikan Kerapu tergolong ikan stenohaline (Breet dan Groves, 1979), maka ikan ini hanya mampu beradaptasi pada lingkungan perairan yang mempunyai kadar garam rendah.

Ikan Kerapu tersebar luas di perairan pantai baik di daerah tropis maupun daerah sub tropis, dan termasuk jenis ikan yang hidup di perairan berkarang sehingga sering dikenal sebagai ikan karang (*coral reef fish*) (Aslianti, 2012). Kerapu Tikus tersebar luas dari wilayah Asia Pasifik termasuk laut merah, tetapi dikenal berasal dari Teluk Persi, Hawaii atau Polynesia. Ikan ini juga terdapat pula di hampir semua perairan pulau tropis Hindia dan Samudera pasifik Barat dari pantai Timur Afrika sampai dengan Mozambika.

Di perairan Australia dan Asia sendiri ikan kerapu tersebar di India, Thailand, pantai tropis Australis, Jepang, philipina, Papua Neuguinea dan Kaledonia Baru (Evalawati, 2001). Di Indonesia, ikan Kerapu Tikus banyak ditemukan di perairan pulau Sumatera, Jawa, Sulawesi dan Ambon. Salah satu

indikator adanya Kerapu Tikus ini adalah perairan karang yang di Indonesia cukup luas (Akbar dan Sudaryanto, 2002).

2.1.4 Reproduksi

Salah satu sifat biologi ikan Kerapu adalah protogini atau hermaphrodit protogini, yaitu pada perkembangan mencapai dewasa (matang gonad) berjenis kelamin betina dan akan berubah menjadi jantan bila sudah tumbuh menjadi lebih besar atau umurnya bertambah tua. Induk Kerapu Tikus yang ditangkap di alam berukuran kecil dan umumnya berjenis kelamin betina. Induk akan mengalami kematangan sepanjang tahun. Berdasarkan pengamatan mikroskopis dapat diketahui bahwa telur ikan Kerapu Tikus berbentuk bulat tanpa kerutan. Cenderung menggerombol pada kondisi aerasi. Kuning telurnya tersebar merata. Telur tersebut transparan dengan diameter sekitar 850 mikron dan tidak mempunyai rongga di dalam telur (Akbar dan Sudaryanto, 2002).

Amiruddin, *et al.* (2012), perkembangan embrional telur ikan Kerapu Tikus membutuhkan waktu setidaknya 19 jam sejak pembuahan hingga penetasan. Sel pertama terjadi 40 menit setelah pembuahan, sedangkan sel berikutnya terjadi setiap 15-30 menit atau sampai mencapai tahap multisel selama 2 jam 25 menit. Tahapan embrional selanjutnya adalah gastrula, diikuti tahapan neurula dan embrio.

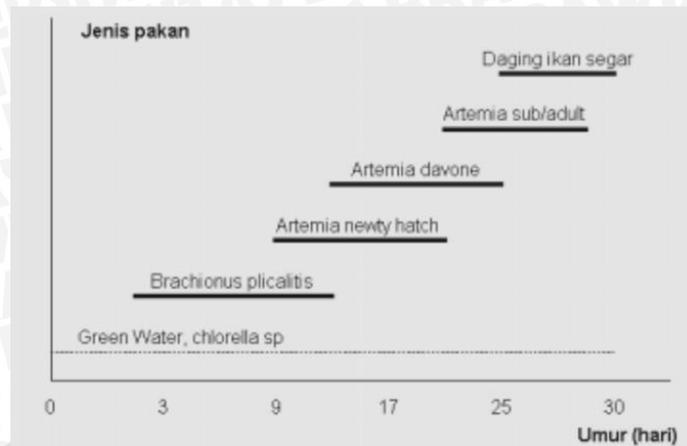
2.1.5 Kebiasaan Pakan dan Pakan

Kerapu Tikus tergolong dalam ikan nokturnal, aktivitas mencari makan dimulai saat hari mulai gelap. Pada kegiatan budidaya, pemberian pakan dilakukan biasanya pada pagi hari jam 07.00 dan sore jam 16.00. Hal ini karena pada waktu tersebut merupakan waktu paling efektif untuk pemberian pakan. Tampubolon dan Mulyadi (1989) dalam Atmirah (2010), ikan Kerapu Tikus

mempunyai kebiasaan makan pada siang dan malam hari tetapi lebih aktif pada waktu fajar dan senja hari.

Kerapu Tikus merupakan hewan karnivora, sebagaimana jenis-jenis ikan Kerapu lainnya. Kerapu Tikus dewasa adalah pemakan ikan-ikan kecil, kepiting dan udang-udangan sedangkan larva ikan Kerapu tikus adalah pemangsa molusca (trokofor), rotifer, mikro krustasea, kopepoda dan zooplankton. Sebagai ikan karnivora, ikan ini cenderung menangkap mangsa yang aktif bergerak didalam kolom air. Randall (1987) dalam Evalawati (2001), menyebutkan bahwa Kerapu Tikus sebenarnya tergolong dalam ikan kanibal. Namun sifat kanibal yang dimiliki ikan Kerapu Tikus tidak seperti jenis ikan Kerapu Macan ataupun ikan Kerapu jenis lainnya dikarenakan lebar bukaan mulut Kerapu Tikus lebih kecil.

Pakan merupakan salah satu faktor penting dalam menunjang usaha budidaya. Pakan yang biasanya digunakan pada pembesaran Kerapu Tikus adalah pakan ikan rucah (muniran petek) yang dicacah dengan ukuran sesuai dengan bukaan mulut ikan kerapu. Ikan rucah biasanya diberikan pada Kerapu yang telah mempunyai umur diatas 25 hari. Hal ini dikarenakan ikan yang mempunyai umur kurang dari 25 hari masih belum mampu menampung jenis makanan berat sehingga hanya diberikan makanan berupa fitopkankton ataupun zooplankton seperti pada Gambar 2.



Gambar 2. Skema Jenis dan Pakan Pemberian Pakan Larva Ikan Kerapu (sumber : Kantor Deputi Menegristek Bidang Pendayagunaan dan Pemasyarakatan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi, 2011)

Pemberian pakan ikan Kerapu tergantung suhu dan salinitas, dimana apabila suhu naik nafsu makan akan meningkat, begitu pula jika salinitas naik maka nafsu makanpun ikut naik. Apabila kondisi adlibitum telah tercapai, maka pemberian pakan harus dihentikan untuk menghindari terbuangnya pakan, walaupun belum mencapai dosis yang telah ditentukan. Selain itu pemberian pakan harus dihentikan karena keberadaan pakan yang berlebih akan mempengaruhi kualitas air (Atmirah, 2010).

2.1.6 Kualitas Air Ikan Kerapu Tikus

Beberapa persyaratan kualitas air yang perlu diperhatikan antara lain kualitas fisika air yang terdiri dari: kecepatan arus air, kecerahan air, suhu. Pada parameter kualitas kimia air terdiri dari: salinitas, pH dan DO. Akbar dan Sudaryanto (2002), menjelaskan sebaai berikut :

A. Parameter Fisika Air

1. Kecepatan arus air

Idealnya kecepatan arus yang digunakan untuk pembesara ikan Kerapu tikus adalah 15-30 cm/detik. Arus air yang melebihi dari 30cm/detik dapat mempengaruhi posisi jaring dan sistem penjangkaran. Kuatnya arus dapat

menyebabkan bergesernya posisi rakit. Sebaliknya, arus yang terlalu kecil dapat mengurangi pertukaran air keluar masuk jaring. Hal ini akan berpengaruh kepada ketersediaan oksigen terlarut dan penyakit. Terutama parasit yang akan menyerang kerapu bebek.

2. **Kecerahan air**

Salah satu indikator untuk menentukan lokasi pemeliharaan ikan Kerapu Tikus adalah kecerahan air. Perairan dengan tingkat kecerahan sangat tinggi (jernih) sangat baik digunakan sebagai lokasi pembesaran. Sebaliknya perairan dengan tingkat kecerahan sangat rendah (keruh) menandakan adanya bahan organik sangat tinggi pada perairan. Perairan yang sangat subur, akan mempercepat perkembangan organisme penempel seperti lumut, cacing dan kerang-kerangan. Selain itu, penyebab lain yang akan muncul akibat kecerahan yang sangat rendah adalah jaring cepat kotor akibat kandungan bahan organik yang tinggi. Dari uraian diatas, didapatkan kesimpulan, kecerahan air yang baik untuk pemeliharaan ikan Kerapu Tikus adalah yang secara visual dapat dilihat benda-benda di dalam air yang kedalamannya hingga lebih dari dua meter.

3. **Suhu**

Suhu yang digunakan untuk pemeliharaan ikan Kerapu Tikus haruslah mempunyai nilai yang konstan. Perubahan suhu yang tinggi dalam perairan laut akan mempengaruhi proses metabolisme aktivitas tubuh dan syaraf ikan. Kordi (2010), menyatakan pengaruh suhu secara tidak langsung adalah mempengaruhi metabolisme, daya larut gas-gas, termasuk oksigen serta berbagai reaksi kimia di dalam air. Semakin tinggi suhu air semakin tinggi pula laju metabolisme ikan Kerapu Tikus, yang berarti semakin besar konsumsi oksigennya padahal kenaikan suhu tersebut mengurangi daya larut oksigen dalam air. Suhu optimal untuk pertumbuhan ikan Kerapu Tikus adalah 27⁰-29⁰C.

B. Parameter Kimia Air

Akbar, *et al.* (2001), pertimbangan utama dalam pemeliharaan lokasi adalah kualitas kimia air. Kualitas kimia air berkaitan erat dengan organisme yang akan dipelihara, oleh karena itu kualitas kimia air perlu untuk diketahui sebelum menentukan lokasi pembesaran ikan. Beberapa parameter yang perlu diketahui antara lain :

1. Salinitas (kadar garam)

Boyd (1982) dalam Kordi dan Andi (2007), salinitas adalah kadar seluruh ion-ion yang terlarut didalam air. Komposisi ion-ion pada air laut dapat dikatakan mantap dan didominasi oleh ion-ion tertentu seperti klorida, karbonat, bikarbonat, sulfat, natrium, kalium dan magnesium. Pada kegiatan pembesaran ikan Kerapu Tikus tidak dianjurkan dilakukan pada daerah muara. Pada lokasi ini, nilai salinitas cenderung berfluktuasi karena dipengaruhi masuknya air tawar dan sungai yang mempengaruhi nafsu makan ikan dan pertumbuhan. Selain itu, lokasi yang berdekatan dengan muara sering mengalami stratifikasi perbedaan salinitas yang dapat menghambat masuknya oksigen dari udara ke air. Salinitas yang ideal untuk pembesaran ikan Kerapu Tikus adalah 30-33 permil (‰) atau ppt.

2. Konsentrasi Ion Hidrogen (pH)

Nilai pH dapat digunakan sebagai indeks kualitas lingkungan atau tolok ukur untuk menunjukkan tinggi rendahnya konsentrasi ion hidrogen dalam suatu perairan. Perairan dengan pH netral sampai sedikit basa sangat ideal untuk kehidupan ikan air laut. Perairan yang mempunyai pH rendah, dapat mengakibatkan aktivitas pertumbuhan menurun atau ikan menjadi lemah sehingga lebih mudah terinfeksi penyakit dan biasanya diikuti dengan tingkat kematian tinggi. Pemeliharaan Kerapu Tikus baik dilakukan pada air laut dengan pH 8,0-8,2 (Akbar dan Sudaryanto, 2002).

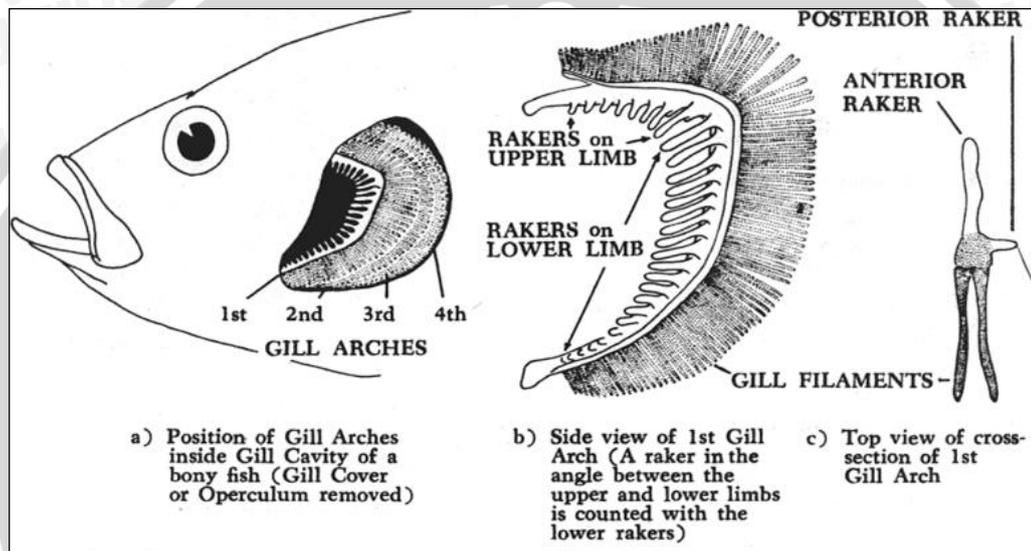
3. Oksigen Terlarut (*Disolved Oxygen/DO*)

Oksigen adalah faktor penting bagi kehidupan makro dan mikro organisme perairan karena diperlukan untuk proses pernafasan. Sumber oksigen terlarut dalam perairan berasal dari proses difusi oksigen yang terdapat di atmosfer kurang lebih 35% dan aktivitas fotosintesis oleh tumbuhan air dan fitoplankton. Fluktuasi oksigen terlarut harian dapat mempengaruhi parameter kimia, terutama pada saat kondisi tanpa oksigen, yang dapat mengakibatkan perubahan sifat kelarutan beberapa unsur kimia di perairan (Apridayanti, 2005). Selain dapat mempengaruhi beberapa unsur kimia, konsentrasi oksigen dalam air dapat mempengaruhi pertumbuhan dan konversi pakan serta mengurangi daya dukung perairan. Kerapu Tikus dapat hidup layak dalam keramba jaring apung dengan konsentrasi oksigen terlarut lebih dari 5 ppm.

2.2 Morfologi Insang

Pernapasan adalah proses pengikatan oksigen (O_2) dan pengeluaran karbondioksida (CO_2) oleh darah melalui permukaan alat pernafasan. Proses pengikatan O_2 juga dipengaruhi perbedaan tekanan parsial O_2 antara perairan dengan darah. Perbedaan menyebabkan gas-gas berdifusi ke dalam darah ke luar melalui alat pernafasan seperti insang (Fujaya, 2004). Insang adalah organ vital dalam proses respirasi, merupakan organ pertama yang berhubungan langsung dengan bahan toksik di dalam perairan, dengan permukaan yang luas dan terbuka. Bagian ini menjadi sasaran utama bagi bahan toksik yang ada di dalam perairan. Struktur jaringan insang yang tersusun atas epitel tipis selapis dan secara langsung berhubungan dengan zat toksik di lingkungan, mengakibatkan organ tersebut mudah mengalami kerusakan (Wong, 2000 dalam Widayati, *et al.* 2011).

Insang terbentuk dari lengkungan tulang rawan yang mengeras, dengan beberapa filamen insang yang terdiri dari banyak lamella. Lamella inilah yang menjadi tempat pertukaran gas pada insang yang terdiri dari sel-sel epitel pada bagian luar, membran dasar dan sel-sel tiang sebagai penyangga bagian dalam. Epitelium mengandung jaringan pembuluh darah kapiler yang digunakan untuk menutupi pinggiran lamella insang yang tidak menempel pada lengkung insang. Gambar 10 adalah morfologi insang ikan.



Gambar 3. Morfologi insang
 Sumber : Ichtyologi FPIK-UB, 2011

Insang memiliki 4 bagian yang terdiri dari *gill arches* yaitu merupakan bagian yang menghubungkan *gill filament* dan *gill rakers*. *Gill filament* merupakan bagian tipis yang berbentuk seperti kipas yang berfungsi menyaring plankton ataupun bahan lainnya sedangkan *gill rakers* berfungsi untuk mencabik dan merobek makanan. Tim Asisten FHA (2012), pada sebagian ikan, *gill rakers* digunakan sebagai pengganti gigi. Beberapa ikan mempunyai perbedaan pada bentuk insang dikarenakan perbedaan kebiasaan makan. Seperti pada ikan Herbivora, ikan jenis ini mempunyai *gill filament* yang lebih banyak, panjang dan lebih rapat daripada ikan omnivora dan karnivora yang berfungsi untuk

menyaring plankton. Ikan yang mempunyai kebiasaan makan bersifat karnivora, akan mempunyai sedikit *gill filament* dan bentuknya juga akan lebih pendek, lebih kaku dan jarang, namun bentuk *gill arc* pada ikan karnivora akan lebih tajam untuk mencerna makanan yang bersifat daging. Sedangkan bentuk insang pada ikan omnivora terletak diantara ikan berkebiasaan makan karnivora dan herbivora. Bagian terakhir dari insang yaitu operkulum atau tapis insang yang berfungsi untuk membuka dan menutup selama proses respirasi.

Beberapa kerusakan insang diakibatkan oleh gangguan lingkungan seperti menurunnya kadar oksigen dalam perairan yang akan menyebabkan ikan mengalami stres akibat hipoksia. Menurut Robert (2001), hipoksia terjadi apabila sel-sel darah yang membawa oksigen kedalam jaringan tidak dapat memenuhi proses metabolisme didalam tubuh untuk berbagai kebutuhan. Hipoksia bila berkelanjutan akan menyebabkan kerusakan insang seperti nekrosis, hiperplasia, hiperemi dan hipertropi seperti pada insang, ginjal, hati dan limpa.

Contoh kerusakan insang yaitu hiperplasia. Menurut Roberts (2001), hiperplasia bisa terjadi pada lamella primer dan sekunder. Pada lamella primer, hiperplasia disebabkan oleh pembelahan sel-sel clorid secara berlebihan sedangkan pada lamella sekunder, terjadi akibat pembelahan sel epitel yang tidak terkontrol. Awal mula munculnya hiperplasia, ditandai dengan munculnya edema pada insang ikan, yaitu pembengkakan sel atau sel epitel yang mengalami penambahan ukuran atau volume suatu bagian untuk peningkatan jumlah sel. Kerusakan lebih lanjut dari edema dan hiperplasia adalah fusi. Fusi merupakan peleburan beberapa lamella sekunder menjadi satu bagian yang jika fusi ini menjadi parah akan mengalami peningkatan kerusakan yang disebut dengan kerusakan struktur lamella yang merupakan tingkat kerusakan parah (Sipahutar, *et al.*, 2013).

2.3 Mikroalga *N. oculata*

N. oculata adalah spesies mikroalga laut yang hidup diperairan dengan kelimpahan nutrisi tinggi pada kawasan pesisir dan estuari. *N. oculata* dapat memanfaatkan energi cahaya dan air untuk melakukan proses metabolisme yang mengubah karbondioksida (CO₂) menjadi senyawa anorganik CH₂O. Selain sebagai sumber nutrisi, mikroalga juga mengandung klorofil yang mempunyai fungsi sebagai antioksidan, aflatoksin dan anti proteolitik (Ernest, 2012). *N. oculata* merupakan salah satu pakan alami (*livefood*) untuk ikan atau udang dan juga berperan sebagai pakan dari zooplankton, rotifer dan artemia (Safitri, *et al.*, 2012).

2.3.1 Klasifikasi

N. oculata merupakan spesies mikroalga laut yang hidup diperairan dengan kelimpahan nutrisi tinggi. Mikroalga jenis ini dapat hidup pada kawasan pesisir dan estuari. *N. oculata* tergolong fitoplankton yang masuk dalam kelas Eustigmatophyceae. Klasifikasi *N. oculata* dapat dilihat pada tabel 2:

Tabel 2. Klasifikasi mikroalga *N. oculata*

Kingdom	Chromista
Divisi	Ochrophyta
Class	Eustigmatophyceae
Family	Monodopsidaceaea
Genus	Nannochloropsis
Spesies	<i>Nannochloropsis oculata</i>

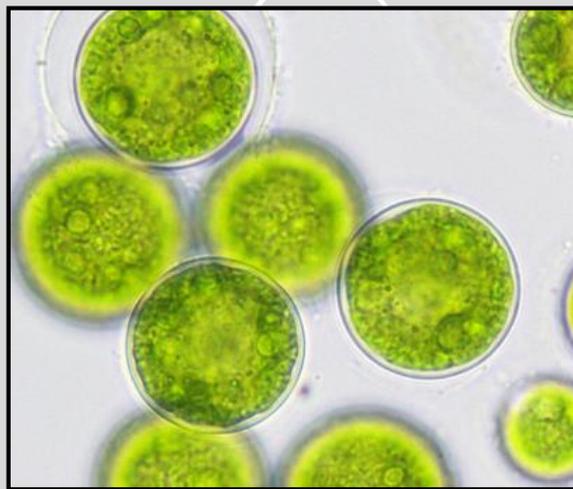
Sumber : Randal, *et al.* (1993) dalam Fasya (2013)

2.3.2 Morfologi

N. oculata memiliki kandungan pigmen dan nutrisi seperti protein (52,11%), karbohidrat (16%) lemak (27,64%), vitamin (0,85%) dan klorofil A (0,89%). Merupakan fitoplankton yang memiliki warna kehijauan, tidak motil dan tidak berflagel. Ukuran sel kecil dan berbentuk menyerupai bola (Fachrullah, 2011). Sel *N. oculata* berukuran 2-4 mikro, yang terbuat dari komponen selulosa

yang kuat dan merupakan karbohidrat kompleks yang bermanfaat untuk mengikat zat-zat toksik sehingga dapat dikeluarkan dari dalam tubuh. Selain itu, sel *N. oculata* juga mempunyai kemampuan mengikat aktivitas sistem kekebalan tubuh, juga mempunyai 2 flagel atau *heterokontous* yang salah satu flagel berambut tipis sehingga dapat bergerak aktif (Ernest, 2012).

Fitoplankton *N. oculata* yang berumur 4-5 hari baik digunakan sebagai sumber pewarna (*green water*) dalam bak pemeliharaan larva ikan kerapu lumpur. Warna air yang hijau dapat menghindari kematian larva mengapung dan menghindari terjadinya larva bergerombol di satu sudut bak penampungan karena terlalu terang. Morfologi *N. oculata* dapat dilihat pada Gambar 4:



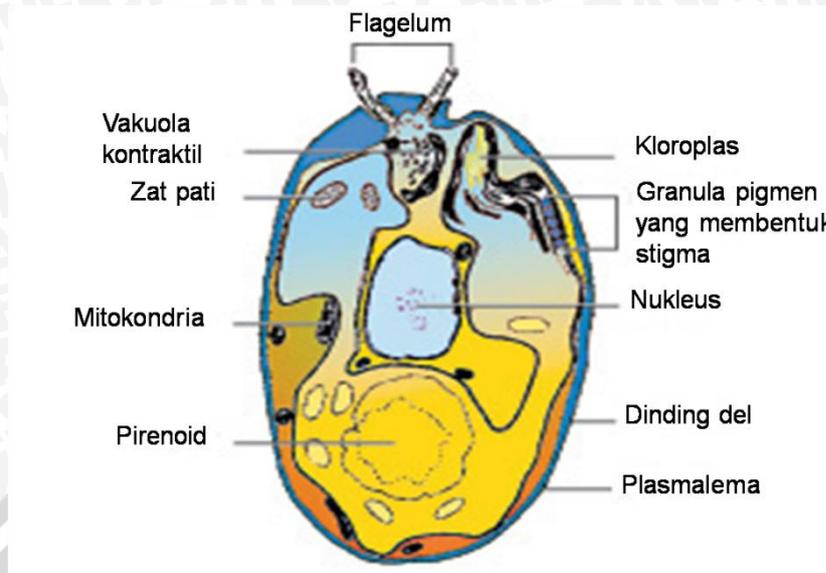
Gambar 4. Morfologi *N. oculata*
(sumber: Schultz, 2013)

Selain kandungan protein, karbohidrat dan lemak, *N. oculata* memiliki kandungan pigment berupa klorofil a, β -karoten, dan xanthophylls violaxanthin dan vaucherxanthin (Cao *et al.*, 2013 dalam Khumaidi 2014). Beberapa pigment yang disebutkan tersebut, secara umum tergolong dalam antioksidan kuat. Alga hijau bersel tunggal yang memiliki klorofil dan karatenoid, telah terbukti mampu meningkatkan penyembuhan luka, radang perut dan dapat memberikan perlindungan dari infeksi dengan merangsang sistem kekebalan tubuh.

2.3.3 *Peridinin Cell Pigment (Pirenoid /PCP)*

PCP merupakan penyusun penting dari mikroalga laut *N. oculata* yang terkait dengan klorofil, sehingga bisa digunakan oleh mikroalga laut untuk berfotosintesis. PCP adalah organel, pusat fiksasi karbondioksida dalam kloroplas ganggang, tidak terikat oleh membran, akan tetapi PCP merupakan wilayah khusus didalam plastida (Sudarsono, 2013). PCP diketahui mengandung enzim ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase (RubisCO) yaitu enzim yang berfungsi untuk fiksasi karbon.

PCP memiliki diameter 1 sampai 1,5 μm , ketebalan dari pada selubung patinya kurang lebih 0.25 μm . Tilakoid tidak melitasi matrik pirenoid, butiran-butiran lembut pati yang menutupi PCP berbentuk seperti cincin tertutup. Butiran-butiran pati yang menutupi pirenoid dan berada dalam stroma ini dapat mencapai dimensi yang cukup besar (hingga 0,25- 0,75 μm) (Stoyneva. *et al*, 2009). PCP merupakan organel dalam stroma chloroplas yang tidak berikatan dengan membran dan dikelilingi oleh butiran-butiran halus zat pati. Oleh karena itu PCP diasosiasikan sebagai gudang zat pati yang dihasilkan oleh sel. Zat pati dalam sel tersebut yang akhirnya akan diubah menjadi amilum untuk dimanfaatkan oleh sel (Wicox, 2000 dalam Fasya, 2013). Letak PCP didalam sel dapat dilihat pada Gambar 5 dibawah ini.



Gambar 5. Letak *Pirenoideum/PCP* didalam sel
(sumber : Fitri, 2012)

Weis, *et al.* (2002), menyebutkan bahwa *Pirenoideum* terjadi dalam dua bentuk, satu sebagai homodimer (bentuk pendek) dengan massa molekul (berat molekul) antara 14-16 kDa dan yang lainnya sebagai bentuk monomer (bentuk panjang) dengan berat molekul antara 30-35 kDa. Tetapi, pada sebagian jenis algae hanya mempunyai *Pirenoideum* satu bentuk saja. *Pirenoideum* mempunyai fungsi fisiologis sebagai zat antioksidan, dimana *peridinin* merupakan senyawa yang melindungi sel dari efek berbahaya radikal bebas. *Pirenoideum* digunakan untuk menangkap energi matahari pada spektrum warna hijau-biru (470 – 550 nm). Hirschberg, *et al.* (1997) dalam Fasya (2013), menyebutkan bahwa *Pirenoideum* pada tumbuhan dan algae mempunyai peran yang sangat penting dipusat reaksi fotosintesis dan juga terlibat dalam proses transfer energi. *Pirenoideum* efisien menangkal radikal bebas dan meningkatkan kekebalan tubuh vertebrata. Konsumsi komponen *Pirenoideum* yang sudah berasosiasi dalam bentuk karotenoid dalam jumlah tertentu secara signifikan mampu mengurangi resiko kanker.

Pirenoid dapat juga digunakan untuk meningkatkan kekebalan sistem kekebalan tubuh (sistem imun). Dalam sebuah penelitian menyebutkan bahwa ikan yang telah diinfeksi VNN masih bertahan setelah diberikan *Pirenoid*. Hal ini terjadi karena *Pirenoid* dapat membentuk inducer di dalam ikan kerapu tikus yang berfungsi untuk mengeliminasi virus RNA VNN. Fungsinya inducer adalah untuk meregulasi viabilitas system imun pada ikan kerapu sehingga dapat meningkatkan system viabilitas atau ketahanan dan kelulusan hidup ikan kerapu budidaya sebagai salah satu komoditi unggulan disektor perikanan dan kelautan (Yanuhar, 2012).

2.3.4 Biologi dan Habitat

N. oculata memiliki kloroplas dan nukleus yang dilapisi membran. Kloroplas pada *N. oculata* ini memiliki stigma atau yang dikenal sebagai bintik mata yang bersifat sensitif terhadap cahaya dan lingkungan sangat tinggi. Selain itu *N. oculata* dapat melakukan proses fotosintesis karena memiliki klorofil, bersifat kosmopolit, salinitas optimum untuk pertumbuhannya adalah 23-35 ppt, pH 7-9 dengan kekuatan cahaya 5000-200.000 lux (sesuai dengan volume budidaya), suhu 23-36°C. Menurut Irwanto, *et al.* (2012), kepadatan optimum yang dapat dicapai untuk skala laboratorium 50-60 juta sel/mL, skala semi massal 20-25 juta sel/mL dan massal 15-20 juta sel/mL dengan masa kultur 207 hari.

2.3.5 Fase Pertumbuhan

N. oculata mengalami beberapa tahapan atau fase selama hidupnya. 5 fase pertumbuhan *N. oculata* adalah sebagai berikut :

1. Fase Lag (Fase Perkenalan)

Fase lag ditandai dengan kecilnya peningkatan kepadatan sel. Pertumbuhan pada fase ini merupakan fase adaptasi fisiologis dari metabolisme

sel untuk tumbuh, seperti peningkatan enzim serta metabolisme yang dilibatkan pada pembelahan sel dan fiksasi karbon. Prasetyo (2009), *lag phase* memiliki tingkat biosintetik tinggi sehingga yang enzim yang dibutuhkan untuk mencerna berbagai macam substrat dihasilkan dalam jumlah yang banyak. Biasanya terjadi pada jam ke- 0-24. Pada fase ini tidak terjadi penambahan populasi, sel hanya mengalami perubahan komposisi kimia dan perubahan ukuran sel.

2. Fase Log (Eksponensial)

Fase log dikenal juga dengan fase eksponensial, yang ditandai dengan pertumbuhan yang sangat cepat secara eksponensial. Tingkat dimana sel berkembang biak pada fase ini disebut sebagai *growth rate* (k). Waktu yang dibutuhkan sel untuk membelah diri menjadi dua bagian dalam fase ini disebut sebagai *generation time* (g). Selama *log phase*, nutrisi dicerna pada kecepatan maksimal sampai semuanya habis. Ernest (2012), menyebutkan peningkatan sel alga merupakan fungsi waktu (t) pada fungsi logaritmik:

$$C_t = C_0 \cdot e^{mt}$$

dengan C_t dan C_0 merupakan konsentrasi sel pada waktu t dan 0 dan m adalah laju pertumbuhan spesifik. Laju pertumbuhan spesifik umumnya bergantung pada spesies alga, intensitas cahaya matahari dan temperatur, biasanya terjadi pada jam ke- 24-60, masih dapat memenuhi kebutuhan fisiologis sel sehingga *N. oculata* masih dapat tumbuh.

3. Fase Stasioner

Fase stasioner terjadi pada jam ke- 60-72. Sel pada *N. oculata* mulai mengalami penurunan jumlah kepadatan yang disebabkan kandungan nutrient didalam media kultur sudah habis sehingga tidak mampu mencukupi kebutuhan *N. oculata*. Pada fase ini terjadi keseimbangan antara nutrisi yang tersedia

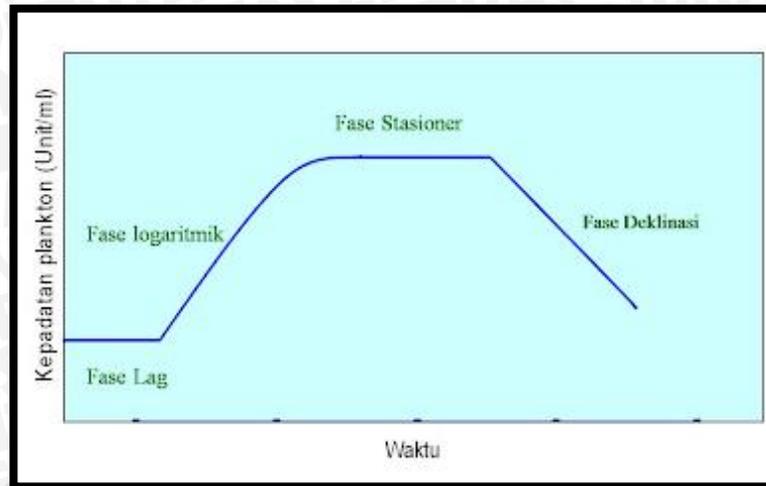
dengan jumlah sel dimedia kultur, tergantung pada salinitas, temperatur, pH, karbondioksida, intensitas cahaya dan keadaan nutrien. Prasetyo (2009), fase stasioner merupakan masa transisi dari perkembangan yang sangat cepat menuju masa dormansi.

4. Fase Penurunan laju Pertumbuhan

Pembelahan sel *N. oculata* menurun ketika nutrien, pH, karbondioksida atau komponen fisika ataupun kimia lainnya menjadi faktor yang membatasi pertumbuhan. Periode setelah fase stasioner yang bervariasi pada tiap organisme dan kondisi kultur, kecepatan kematian meningkat sampai mencapai tingkat yang tetap, sering kali setelah mayoritas sel mati kecepatan kematian menurun drastis sehingga sejumlah kecil sel yang hidup akan bertahan selama beberapa bulan atau tahun.

5. Fase Kematian

Selama fase kematian, kualitas air memburuk dan kandungan nutrien terus menurun hingga tidak mampu melangsungkan pertumbuhan. Kepadatan sel berkurang secara drastis dan pada akhirnya kultur habis. Selain kandungan nutrien yang semakin menurun, kualitas air yang mempengaruhi seperti kekurangan oksigen, kondisi pertumbuhan terlalu panas, ganuan pH atau kontaminan juga turun andil dalam mempengaruhi fase kematian. Pada *N. oculata*. Secara keseluruhan, tahapan pertumbuhan atau fase pertumbuhan *N. oculata*, dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 6. Grafik fase pertumbuhan *N. oculata* (sumber : google, 2014)

2.3.6 Pertumbuhan *N. oculata*

N. oculata berkembang biak secara aseksual dengan cara pembelahan sel atau pemisah autospora dari sel induknya dan mempunyai toleransi terhadap membran dan tidak selalu dapat tumbuh di perairan umum. Ernest (2012), menyebutkan beberapa faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga *N. oculata* antara lain:

a) Jenis Medium

N. oculata dapat berkembang biak dengan baik jika nutrisi yang dibutuhkan untuk tumbuh dapat terpenuhi. Apabila asupan nutrisi dari medium tidak cukup, maka laju pertumbuhannya akan lambat. Untuk itu, komposisi medium yang diberikan harus cepat. Dalam perkembang biakannya, *N. oculata* membutuhkan medium *macronutrient* dan *trace element*. *Macronutrient* adalah nutrient yang dibutuhkan dalam jumlah besar, seperti nitrat dan fosfat. Makronutrien merupakan pupuk dasar yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga. Sedangkan *trace element* adalah nutrient yang dibutuhkan *N. oculata* dalam jumlah kecil, namun elemen ini sangat sering digunakan (merupakan elemen yang penting bagi pertumbuhan *N. oculata*. Mikronutrien organik

merupakan kombinasi dari beberapa vitamin yang berbeda-beda. Vitamin tersebut digunakan mikroalga untuk berfotosintesis. Ada beberapa medium yang lazim digunakan untuk membiakkan *N. oculata*, disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Komposisi medium pembiakan *N. oculata*

Bahan	Benneck (mg/dm ³)	BG-11 (mg/dm ³)	F2 guillard (mg/dm ³)	Walne (mg/dm ³)
NaNO ₃	500	1.5	75	100
Na ² EDTA	-	0.001	4.56	45
H ₃ BO ₃	-	2.86	-	33.6
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	-	-	5	20
FeCl ₃ .6H ₂ O	-	-	-	0.36
B ₁	-	-	-	0.1
B ₁₂	-	-	0.5	0.005
MnCl.6H ₂ O	-	1.81	1801	-
Citrate	-	0.006	-	-
Na ₂ CO ₃	-	0.02	-	-
Citric Acid	-	0.006	-	-
CoCl ₂ .6H ₂ O	-	-	10	0.02
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	-	-	-	0.009
CuSO ₄ .5H ₂ O	-	0.0079	-	-
MgSO ₄	100	0.075	-	-
KH ₂ PO ₄	200	0.04	-	-

(sumber : Kawaroe. *et al.*, 2008)

b) Pencahayaan

Pertumbuhan *N. oculata* sangat dipengaruhi oleh tiga komponen penting untuk tumbuh yaitu cahaya, karbondioksida dan nutrisi. *N. oculata* adalah salah satu tanaman yang paling efisien dalam menangkap dan memanfaatkan energi cahaya dan CO₂ untuk keperluan fotosintesis (Diharmi, 2001 *dalam* Hermanto, *et al.*, 2011). Kebutuhan cahaya pada setiap organisme berbeda-beda tergantung pada kedalaman kultur dan kepadatan. Intensitas cahaya yang terlalu tinggi akan menyebabkan fotoinhibisi atau pemanasan. Intensitas cahaya 1000 lux cocok untuk kultur mikroalga dalam erlenmeyer, sedangkan intensitas 5000-10000 lux untuk kultur mikroalga dengan volume besar. Beberapa syarat media tumbuh *N. oculata* berdasarkan iluminasi cahaya (lux) dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Syarat media tumbuh *N. oculata*

Iluminasi Cahaya (lux)	Suhu (°C)	pH	Salinitas (‰)	Referensi
100-10000	25-30	-	25-35	Kurniastuty dan Isnansetyo (1995)
Terbuka : <10000	-	-	-	Cahyaningsih, <i>et al.</i> (2006)
Tertutup: 500-5000	-	-	-	Taw (1990)

(sumber : Hermanto, *et al.*, 2011)

c) pH

pH air mempengaruhi tingkat kesuburan perairan karena dapat mempengaruhi kehidupan jasad renik. pH akan mempengaruhi toksisitas semua senyawa kimia. Variasi pH dapat mempengaruhi metabolisme dan pertumbuhan fitoplankton dalam beberapa hal, antara lain mengubah keseimbangan dari karbon organik, mengubah ketersediaan nutrisi dan dapat mempengaruhi fisiologi sel (Ernest, 2012). Perairan yang memiliki kondisi asam akan kurang produktif, dan dapat membunuh hewan budidaya. Pada pH rendah (keasaman tinggi), kondisi oksigen terlarut akan mengalami penurunan, hal sebaliknya terjadi pada kondisi basa (Kordi dan Tancung, 2007).

Dalam penelitiannya, Hermanto, *et al.* (2011), mengatakan bahwa pH yang tergolong sesuai bagi kehidupan *N. oculata* berada pada kisaran 7.0-9.5, tetapi fitoplankton ini tumbuh rendah pada pH 10.08. Nilai pH dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain aktivitas biologi seperti fotosintesis, suhu, respirasi dan keberadaan ion-ion dalam perairan tersebut.

d) Salinitas

Salinitas merupakan faktor yang mempengaruhi kehidupan organisme dalam perairan untuk mempertahankan tekanan osmotik yang baik antara protoplasma organisme dengan air sebagai media hidup mikroalga. Salinitas dapat dikatakan sebagai total konsentrasi ion-ion terlarut dalam air. Berubahnya kadar salinitas secara cepat akan mempengaruhi kehidupan dan menghambat

pertumbuhan mikroalga. Untuk mengatur salinitas pada kultur mikroalga dapat dilakukan pada medium yang diperkaya yaitu dengan melakukan mengenceran menggunakan air tawar dengan air laut. Ernest (2012), kisaran yang dimiliki oleh *N. oculata* adalah 32-36 ppt, tetapi salinitas optimum untuk pertumbuhan *N. oculata* adalah 33-35 ppt.

Fogg (1987) dalam Hermanto, et al. (2011) kisaran salinitas yang normal untuk pertumbuhan mikroalga adalah 3.0-3.2%. salinitas merupakan salah satu variabel yang mempengaruhi kandungan HUFA (*Highly Unsaturated Fatty Acid*) pada mikroalga. Salinitas yang terlalu tinggi ataupun yang terlalu rendah, akan mempengaruhi keberlangsungan kehidupan organisme.

e) Suhu

Suhu merupakan parameter fisika yang mempengaruhi kehidupan organisme dan kualitas perairan. Secara tidak langsung, suhu akan mempengaruhi metabolisme, daya larut gas-gas termasuk oksigen serta berbagai reaksi kimia dalam perairan (Ghufran, et al. 2007). Secara umum, laju pertumbuhan meningkat sejalan dengan kenaikan suhu, dapat menyebabkan kematian bila peningkatan suhu sampai ekstrim. Tingginya suhu berkaitan dengan besarnya intensitas cahaya yang masuk kedalam perairan, intensitas cahaya yang masuk menentukan derajat panas. Semakin banyak sinar matahari yang masuk, semakin tinggi suhu perairan. Untuk memenuhi kriteria pertumbuhan *N. oculata*, diperlukan suhu pada kisaran 25-30°C (Rizky, 2010).

f) Konsentrasi CO₂

Karbon dioksida merupakan salah satu komponen penting yang mempengaruhi pertumbuhan *N. oculata*. Mikroalga ini merupakan salah satu tanaman yang memanfaatkan karbon dioksida dalam proses fotosintesis dan berkembang biak. Oleh karenanya, persediaan CO₂ dalam jumlah yang cukup

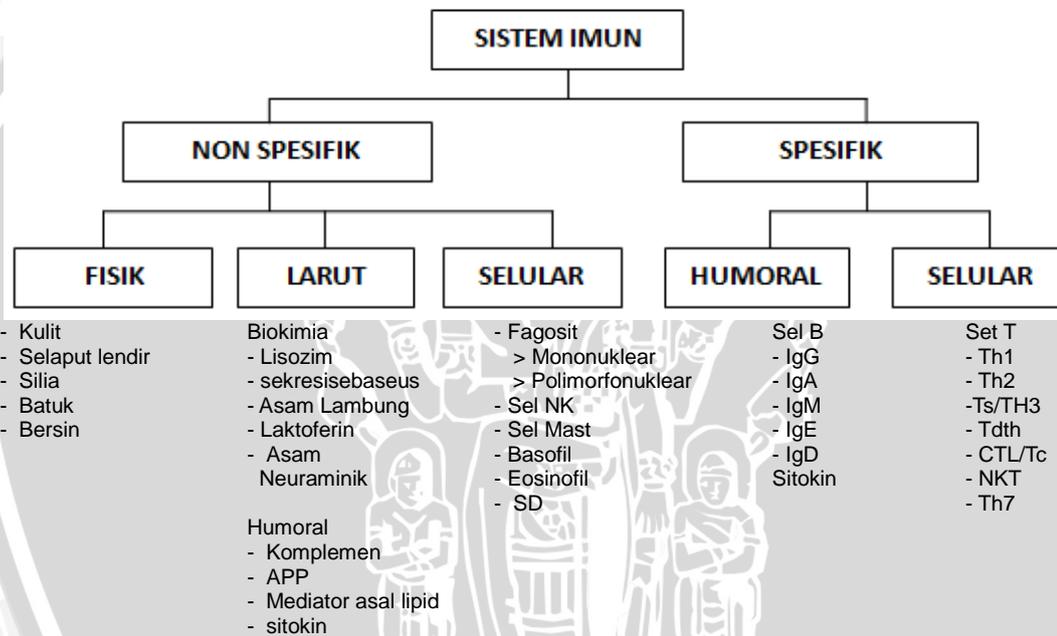
akan mendukung pertumbuhan mikroalga. Namun kadar karbondioksida yang dibutuhkan oleh *N. oculata* hanya sekitar 1-2% (Hermanto, *et al.* 2011). Wirosaputro (2002), mengatakan *N. oculata* dapat mentoleransi kadar CO₂ hingga 15%. Ketersediaan CO₂ dapat dilakukan dengan menggoyang-goyangkan media kultur agar tidak terjadi pengendapan sel. Selain itu pengendapan juga dilakukan untuk penyebaran nutrisi secara merata hingga stratifikasi suhu, serta meningkatkan pertukaran gas dari udara ke medium (Ernest, 2012).

2.4 Sistem Pertahanan Tubuh Ikan

Imunitas merupakan resistensi terhadap penyakit terutama infeksi. Sistem imun diartikan sebagai gabungan sel, molekul dan jaringan yang berperan dalam resistensi atau perlawanan terhadap infeksi. Reaksi yang dikordinasikan oleh sel-sel, molekul-molekul dan bahan lainnya untuk melawan mikroba disebut dengan respon imun. Sistem imun diperlukan tubuh untuk mempertahankan keutuhannya terhadap bahaya yang ditimbulkan berbagai bahan dalam lingkungan hidup (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

Setiap organisme hidup, seperti bakteri sampai manusia, memiliki strategi evolusioner untuk melawan benda asing dari parasit. Pada organisme tingkat tinggi, keragaman dan banyaknya strategi juga ditemukan pada pertahanan dari mikroba parasitik yang didasarkan secara kolektif sebagai sistem imun (Sudarsono, 2013). Ikan memiliki sistem pertahanan tubuh untuk melawan berbagai macam penyakit. Sistem pertahanan tubuh yang dimiliki oleh ikan terbagi atas sistem pertahanan alamiah atau non spesifik/innate/alamiah dan sistem pertahanan adaptif atau spesifik. Sistem pertahanan pada ikan akan terbentuk sempurna saat ikan telah dewasa. Pada fase benih ataupun juvenil, sistem pertahanan ikan sudah terbentuk namun belum berfungsi secara optimal sehingga kurang efisien dalam menahan infeksi patogen. Pada tahap ini, ikan

mudah sekali terserang penyakit. Sistem pertahanan non spesifik merupakan pertahanan tubuh yang terdepan ketika ada benda asing ataupun patogen yang masuk pada tubuh ikan. Sistem pertahanan ini memberikan respon langsung terhadap antigen, yang terdiri dari kulit dan selaput mukosa. Sistem pertahanan tubuh spesifik adalah sistem kekebalan tubuh khusus yang membuat limfosit peka untuk segera menyerang patogen tertentu. Baratawidjaja dan Rengganis (2010), membagi secara garis besar sistem pertahanan tubuh, ada 2 yaitu seperti yang digambarkan pada Gambar 7.



Gambar 7. Gambaran umum sistem pertahanan tubuh (sumber : Baratawidjaja dan Rengganis, 2010)

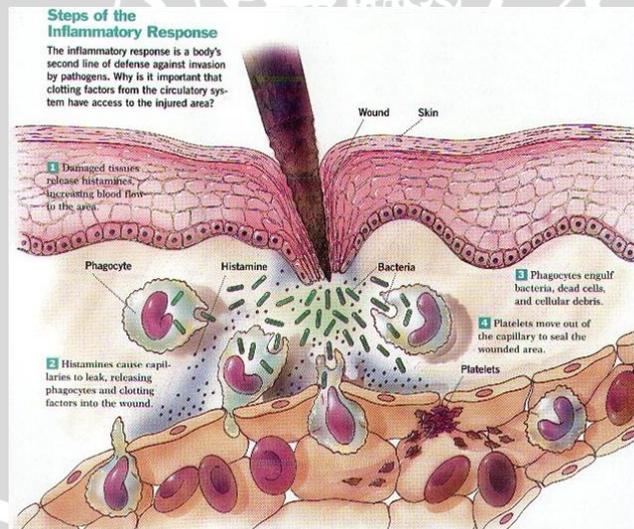
Sistem pertahanan non spesifik dan spesifik menggunakan 2 strategi berbeda untuk mengenali invasi mikroba khusus. Sistem imun non spesifik mendeteksi infeksi menggunakan reseptor yang mengkode jumlah terbatas dari patogen, dan mengenali struktur unik molekul untuk menggolongkan mikroba penginfeksi. Sistem imun spesifik menggunakan reseptor secara acak, dan sangat spesifik dengan spesifikasi yang tampaknya tidak terbatas (Noah dan Ruslan, 2008 *dalam* Sudarsono, 2013).

2.4.1 Sistem Imun Non Spesifik

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

Pada tubuh ikan, pertahanan fisik terjadi pada kulit, sisik dan lendir yang merupakan garis pertahanan paling depan terhadap infeksi. Keratinosit dan lapisan epidermis kulit sehat dan epitel mukosa yang utuh tidak dapat ditembus kebanyakan mikroba. Mukus memiliki kemampuan menghambat kolonisasi mikroorganisme yang akan terjadi pada permukaan tubuh ikan, insang ataupun mukosa. Mukus ikan mengandung imunoglobulin (IgM) alami dan bukan respon dari paparan antigen. IgM merupakan antibodi yang dapat menghancurkan patogen yang menyerang tubuh (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010). Kulit dan sisik pada tubuh ikan berperan dalam melindungi ikan dari kemungkinan luka dan sangat penting perannya dalam mengendalikan osmolaritas tubuh. Kerusakan yang terjadi pada sisik atau kulit ikan akan mempermudah patogen menginfeksi insang. Sehingga ketika mikroba dapat menembus sistem pertahanan fisik, maka ikan akan mengalami beberapa gejala seperti tumbuhnya lendir pada permukaan ikan, terkuak sisik dan menyebabkan peradangan atau kerusakan pada insang. Umumnya gejala kelainan pada pertahanan fisik ini dapat terlihat secara langsung.

Proses pertahanan tubuh yang paling sederhana ditampilkan organisme sebagai bentuk pertahanan diri dengan mengandalkan struktur fisik, kerja mekanik, alat pertahanan dan pengeluaran substansi kimiawi yang sangat sederhana pada ikan. Fagositosis juga merupakan salah satu bentuk respon pertahanan tubuh yang paling sederhana, namun penting sebagai wujud sistem pertahanan non spesifik ketika ikan mengalami infeksi mikroba patogen. Sel-sel fagosit akan menghancurkan antigen melalui tiga tahap, yaitu pelekatan, fagosit dan pencernaan. Efendi (2003), makrofag merupakan sel fagosit yang hampir bisa ditemui pada setiap organ di seluruh tubuh, terutama pada daerah yang kaya akan pembuluh darah. Makrofag termasuk mononuklear fagosit sistem. Berikut merupakan gambar kerja makrofag dan bahan antimikrobal dalam menangani kerusakan jaringan di dalam tubuh organisme. Berikut merupakan gambaran pengerahan makrofag dan bahan antimikrobal dan sirkulasi darah ketika terjadi luka dipermukaan tubuh kita, dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Pengerahan makrofag dan bahan antimikrobal dan sirkulasi darah (sumber : Baratawidjaja dan rengganis, 2010)

Dari gambar diatas dapat dilihat bahwa kerusakan jaringan dapat menyebabkan pelepasan faktor vasoaktif dan kemotaktik yang mencetuskan peningkatan aliran darah dan permeabilitas kapiler setempat. Fagosit sendiri merupakan suatu proses atau cara untuk memakan bakteri atau benda asing yang dilakukan dimana setelah benda asing atau bakteri melekat pada permukaan makrofag, maka makrofag akan membentuk sitoplasma dan melekat ke dalam untuk membungkus bakteri atau benda asing tersebut. Tonjolan sitoplasma yang saling bertemu akan melebur menjadi satu hingga benda asing atau bakteri akan tertangkap didalam sebuah vakuol fagositik intra sel. Lisozom dapat memecah atau mencerna intra sel dengan kemampuan yang berasal dari dalam maupun dari luar. Lisozom ini yang akan menyatu dengan vakuol untuk memusnahkan bakteri atau benda asing tersebut. Mekanisme kekebalan non spesifik akan bekerja untuk menghalangi dan menghentikan proses infeksi tersebut, namun jika sistem pertahanan tidak dapat bekerja dengan baik maka akan menyebabkan gejala klinis penyakit.

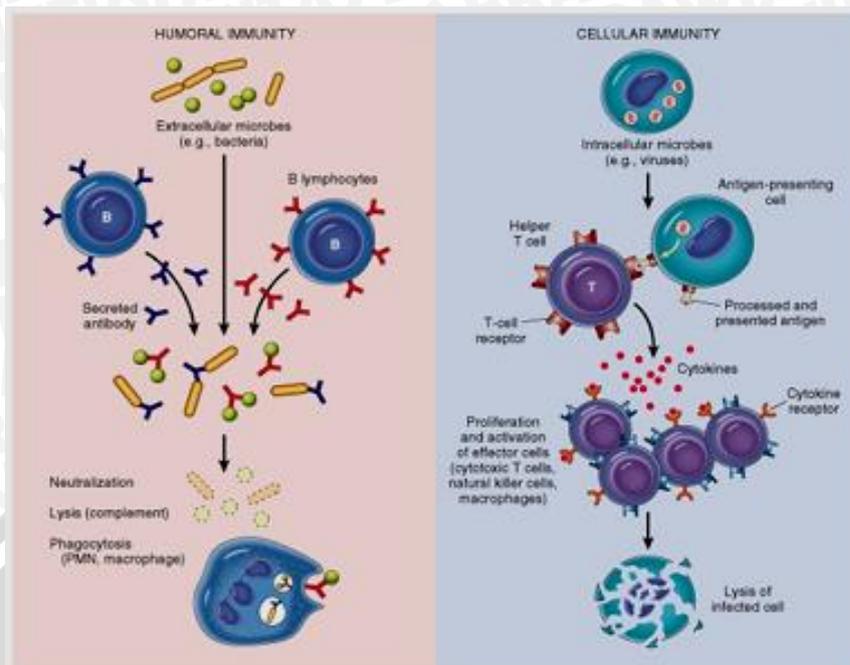
2.4.2 Sistem Imun spesifik

Munasir (2001), menjelaskan bila mikroorganisme dapat melewati pertahanan non spesifik/*innate immunity*, maka tubuh akan membentuk mekanisme pertahanan yang lebih kompleks dan spesifik. Mekanisme ini memerlukan pengenalan terhadap antigen lebih dulu. Sistem imun spesifik mempunyai kemampuan untuk mengenal benda yang dianggap asing bagi dirinya. Benda asing yang pertama kali masuk kedalam tubuh akan segera dikenali oleh sistem imun spesifik. Benda asing tersebut menimbulkan sensitasi sehingga antigen yang sama dan masuk kedalam tubuh untuk kedua kalinya, akan mudah dan cepat dikenali untuk kemudian dihancurkan. Oleh karena itu, sistem tersebut disebut spesifik. Sistem imun spesifik dapat menghancurkan

benda asing yang masuk dalam tubuh tanpa bantuan sistem imun non spesifik, namun pada umumnya terjalin kerjasama antara sistem imun spesifik dan non spesifik antara komplemen, fagosit, antibodi dan antara makrofag dan sel T.

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

Sel-sel leukosit memegang peranan penting dalam mempertahankan fungsi tubuh dari serangan mikroorganisme ataupun terhadap keberadaan sel yang abnormal. Salah satu jenis sel leukosit yang berperan penting dalam imun spesifik adalah limfosit. Beberapa sel limfosit yang berperan penting dalam respon imun spesifik ini adalah sel B dan sel T. Beberapa perbedaan antara sel T dan sel B dijelaskan dalam Gambar 9 dibawah ini :



Gambar 9. Perbedaan Humoral (limfosit B) dan Selular (limfosit T) (sumber : Elsevier Science, 2002)

Dari gambar 9, terlihat bahwa pada gambar kiri (sel B) proses penyerangan ketika ada patogen masuk ialah dengan memecah patogen menjadi beberapa fragmen yang kemudian akan berpoliferasi dengan antibody sekunder untuk menyerang virus. Fungsi antibody ialah sebagai pertahanan terhadap infeksi ekstraseluler virus dan bakteri serta menetralkan toksinnya. Ketika virus sudah diserang maka virus akan lisis atau mati. Pada sel T, ketika sel diserang oleh virus pertahanan untuk membunuh virus akan lebih banyak. Yang pertama adalah *Antigen Presenting Cells* (ATP) akan mengenali virus terlebih dahulu, untuk kemudian ATP akan mengirimkan virus tersebut ke sel Th (sel T Helper) dan virus akan diikan oleh sel T. Bersamaan dengan sel Tc, virus akan dipecah-pecah untuk dikenali secara spesifik yang kemudian akan lisis.

a. Limfosit B (Sel B)

Peran utama dalam sistem imun spesifik humoral adalah limfosit B atau sel B. Sel B berasal dari sel asal multipoten di sum-sum tulang belakang yang dirangsang oleh benda asing akan berpoliferasi, berdiferensiasi dan berkembang



menjadi sel plasma yang memproduksi antibodi. Antibodi berfungsi dalam pertahanan terhadap infeksi ekstraseluler, virus dan bakteri serta menetralkan toksinnya (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

Sel B diinduksi oleh sel T untuk hipermutasi gen-gen imunoglobulin, menghasilkan perbedaan antibodi untuk mengenali jenis-jenis antigen. Pada orang tua terdapat jenis antibodi yang lebih sedikit dibandingkan pada orang muda, rendahnya respon IgM terhadap infeksi dan menurunnya kecepatan pematangan sel B. IgM dan sel B turut berkontribusi terhadap penurunan jumlah antibodi yang diproduksi untuk melawan infeksi (Fatmah, 2006). Secara umum sel B hanya dapat dideteksi 10-20% dari total limfosit pada limfoglandula. Hal ini disebabkan karena antigen permukaan sel B hanya menempati sebagian area folikular (*germinal centre*) dan sinus, sedangkan sisanya didominasi oleh antigen permukaan limfosit lain. Ikan sehat memiliki kadar IgM yang selalu meningkat, biasanya sintesisnya akan dihambat (*negative feedback*) sehingga dapat dipastikan IgM selalu dalam keadaan konstan (Tizard, 1982 dalam Damayanti, 1999).

b. Limfosit T (Sel T)

Sel T juga berasal dari sum-sum tulang belakang. Fungsi utama sistem imun spesifik selular ialah sebagai pertahanan terhadap bakteri yang hidup intraselular, virus, jamur, parasit dan keganasan. Sel T terdiri sel CD4⁺ terdiri atas Th1 dan Th2. Th1 diaktifkan oleh CD4⁺ untuk mengaktifkan makrofag yang berfungsi dalam menghancurkan mikroba. Sel T juga terdiri atas sel CD8⁺/CTL/Tc/Ts/Th3 yang berfungsi untuk memusnahkan sel terinfeksi (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010). Antigen yang dikenali oleh sel B akan diaktivasi supaya dapat dipresentasikan pada antigen permukaan sel T. Selanjutnya CD4 akan memproduksi limfokin yang akan mengontrol diferensiasi

sel B menjadi bentuk antibodi yang diekskresikan. Sel B ini baru akan merespon dan berproliferasi setelah antigen diproses oleh makrofag dengan CD4 dan MHC II kemudian baru merespon antigen tersebut.

Sel T sitotoksik yang juga dikenal dengan sel pembunuh (*killer T cells*) akan memusnahkan sel yang terinfeksi atau sel-sel abnormal dengan cara melepaskan zat yang bersifat toksik atau memicu sel agar melakukan distruksi sel (*apoptosis*). Meskipun sel T sudah memiliki kerja yang spesifik, namun beberapa benda asing bisa lolos dari pertahanan sel tersebut. Sebagai contoh, sel kanker memproduksi senyawa kimia yang dapat menghambat respon imun dari sel T-sitotoksik. Dengan demikian sekalipun sel kanker dapat dikenali sebagai sel asing, tetapi seringkali lolos dari serangan sel imun tubuh (Radji, 2009). Perbedaan antara imunitas humoral dan selular dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Perbedaan imunitas spesifik humoral dan selular

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

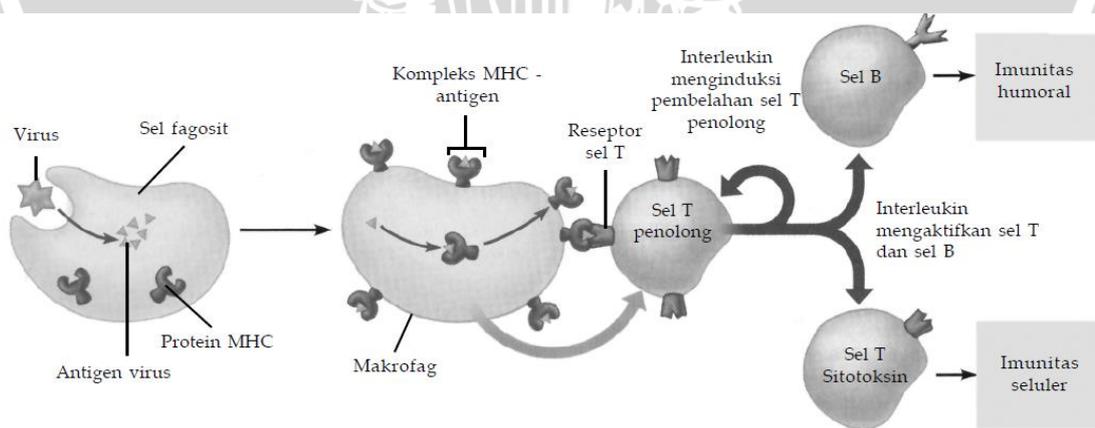
(Sumber : Radji, 2009)

2.5 Major Histocompatibility Complex Class I (MHC I)

Disebutkan bahwa respon imun terhadap sebagian besar antigen hanya dimulai bila antigen telah dilengkap dan diproses serta dipresentasikan oleh sel APC. Oleh karena itu sel T hanya mengenal imunogen yang berkaitan pada protein *Major Histocompatibility Complex* (MHC) pada permukaan sel lain

(Munasir, 2001). Produk MHC berperan penting dalam pengenalan antigen antar sel dan diskriminasi *self* dan *non self* yakni menentukan kompatibilitas jaringan antara individu dalam satu spesies yang disebut dengan *transplantation antigen*. MHC adalah suatu molekul protein yang terdapat pada hampir semua permukaan sel-sel tubuh suatu organisme. MHC ini mempunyai jenis dan fungsi yang berbeda, salah satu jenisnya adalah MHC kelas I yang berhubungan dengan sel T sitotoksik (CD8⁺) (Utami, 1997).

Protein MHC I, diekspresikan oleh semua sel somatik dan digunakan untuk presentasi antigen kepada sel T CD8 yang sebagian besar adalah sel sitotoksik. Sel T mengekspresikan antigen ke reseptor khusus yang dikenali sebagai MHC (sari, *et al.* 2013). Antigen yang sudah terekspresi tersebut akan dibawa menuju limpa, di dalam limpa akan terjadi pelepasan sitokinin membentuk sel B. Dalam proses ini, *adjuvant* juga menginduksi pelepasan *sitokin inflamasi* yang tidak hanya merekrut sel B dan sel T pada situs infeksi tetapi juga meningkatkan aktivitas transkripsi yang menyebabkan peningkatan dari sel-sel kekebalan tubuh secara keseluruhan. Aktivasi sel T dalam membantu meningkatkan sistem kekebalan tubuh dapat dilihat pada Gambar 10:



Gambar 10. Aktivasi oleh sel T helper
(sumber : google, 2014)

Fungsi MHC I yang telah dipelajari diantaranya adalah sebagai reaksi penolakan jaringan, stimulasi produksi antibodi, prosesing dalam interaksi antigen dengan sel limfosit T. Makrofag yang jumlahnya hanya beberapa persen dari jumlah keseluruhan leukosit ini memainkan peranan penting. Makrofag memiliki protein MHC yang kemudian akan berkaitan dengan antigen pada mikroba. Kompleks MHC-antigen ini kemudian dimigrasikan ke membran sel makrofag.

Molekul MHC adalah glikoprotein-glikoprotein pada permukaan sel yang berfungsi mempresentasikan peptida-peptida kepada sel T. Reseptor pada sel T penolong berikatan dengan kompleks MHC-antigen makrofag. Ikatan ini akan menyebabkan sel T penolong menghasilkan hormon interleukin yang menginduksi sel t penolong untuk membelah dan berdiferensiasi menjadi memori sel. Oleh karena itu sel t mengharuskan berinteraksi dengan sel-sel lain seperti sel-sel yang terinfeksi, sel-sel dendrite, makrofag dan sel B. Limfosit mampu berinteraksi dengan sel-sel lain karena memiliki reseptor yang disebut reseptor sel T yang hanya mengenali antigen yang dipaparkan pada sel-sel lain. Hal ini berbeda dengan sel B dan antibodi yang mampu mengenali antigen terlarut termasuk juga antigen yang berasosiasi dengan sel. Tugas pemaparan antigen-antigen yang berasosiasi dengan sel untuk pengenalan oleh sel T ditunjukkan dengan protein khusus yang dikode oleh suatu gen dalam sebuah lokus yang disebut major histocompatibility complex (MHC) (Baratawidjaja dan Iris, 2010).

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

Materi dari penelitian ini adalah PCP mikroalga laut *N. oculata* yang diujikan secara klinis pada ikan Kerapu Tikus. Hal ini dilakukan untuk mengetahui efek dari pemberian materi nabati sebagai imunostimulan dalam menginduksi sistem imun MHC I pada insang ikan Kerapu Tikus. PCP didapatkan dari isolasi protein *Pirenoid* mikroalga laut *N. oculata* menggunakan metode Dialisa dan Purifikasi dan dibuktikan dengan SDS-PAGE. Ikan Kerapu Tikus yang digunakan sebagai hewan uji adalah berukuran $\pm 13-15$ cm sebanyak 12 ekor yang berasal dari BBAP Situbondo.

3.2 Alat dan Bahan

beberapa alat dan bahan yang digunakan untuk menunjang keberhasilan dalam penelitian sangat penting digunakan. Adapun alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada lampiran 1.

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Darmono dan Hasan (2002), menyebutkan bahwa metode eksperimen adalah hasil kajian empiris dan menggunakan analisis dengan bantuan statistik untuk menguji hipotesis. Metode eksperimen dalam penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan pengaruh PCP pada *N. oculata* dalam menginduksi sistem imun MHC I Ikan Kerapu Tikus pada organ insang.

Metode penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan memberikan PCP dengan dosis yang berbeda pada ikan Kerapu Tikus dengan ulangan 6 kali. Teknik pengambilan data yang digunakan dalam penelitian ini mencakup 2 macam data, yaitu data primer dan data sekunder.

A. Data Primer

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

1. Metode Survey

Informasi diperoleh melalui permintaan keterangan-keterangan kepada pihak yang memberikan keterangan atau jawaban (responden). Metode ini bergantung pada kerja sama dan kecakapan responden sebagai faktor yang dapat mempengaruhi proses survey, sehingga kemungkinan terjadi kesalahan sangat besar. Tetapi sering kali opini yang muncul mungkin sangat penting dalam pemecahan masalah.

2. Metode Observasi

Metode observasi dilakukan dengan melakukan pengamatan dan pencatatan secara sistematis terhadap gejala/fenomena yang diselidiki. Catatan yang dikumpulkan lebih teliti, tetapi terbatas pada gejala sejenis. Seringkali metode ini menggunakan bantuan alat-alat pemotret, alat perekam suara, pencatat kecepatan dan sebagainya.

3. Metode Eksperimen

Diperlukan untuk menguji kesimpulan-kesimpulan yang diperoleh dari penelitian dengan metode survey dan observasi. Dari hasil kesimpulan sementara atau usul pemecahan masalah, dilakukan percobaan-percobaan apakah memberikan jawaban seperti apa yang dikemukakan pada metode survey. Pada metode ini, peneliti dapat mengatur atau memberikan perlakuan tertentu pada suatu variabel.

B. Data Sekunder

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

3.4 Teknik Pengambilan Sampel

Sampel mikroalga *N. oculata* yang digunakan dalam penelitian sebelumnya telah dikultur secara massal di BBAP Situbondo sebanyak 2000 liter. Kultur massal dilakukan dengan menggunakan air payau dan pupuk walne sebagai media pertumbuhan mikroalga dan sebagai media pendukung kehidupan mikroalga. Selanjutnya pada fase stasioner, mikroalga didatangkan langsung dari BBAP Situbondo sebanyak 2400 gram basah untuk diujukan kadar proteinnya. Fase stasioner dipilih karena pada fase ini mikroalga sudah mengalami penurunan jumlah kepadatan yang disebabkan kandungan nutrisi didalam media kultur sudah mulai habis, yaitu pada jam ke-60-72 sejak bibit ditebarkan.

Cara untuk mendapatkan PCP pada mikroalga ini adalah dengan isolasi protein, yang terdiri dari tahapan penggerusan sampel, sentrifugasi, dialisa dan menghitung kadar protein menggunakan SDS-PAGE. Sebelum dilakukannya proses isolasi, tahapan awal yang dilakukan adalah menyaring sampel dengan menggunakan kertas saring untuk memisahkan *N. oculata* yang masih tercampur dengan air. Proses isolasi protein dilakukan dengan cara memecah sel-sel pada mikroalga secara mekanik, misalnya dengan meletakkan beberapa gram sampel *N. oculata* dan menghancurkannya menggunakan alu. Selama proses penghancuran, ditambahkan nitrogen cair. Nitrogen ini berfungsi untuk melindungi DNA dan protein dalam *N. oculata* agar selama proses penggerusan, komposisi protein dan DNA tetap terjaga.

Hasil penggerusan sampel nantinya akan dilanjutkan dengan proses dialisa. Proses ini bertujuan untuk mendapatkan PCP murni dari dalam sampel *N. oculata* dengan bantuan kantong celovan yang mempunyai lapisan *semi permeable*. Proses dialisa dilakukan sebanyak 2 tahap, yang masing-masing dilakukan selama 2x24 jam. PCP murni yang didapatkan dari proses dialisa

selanjutnya akan diukur kadar proteinnya dengan menggunakan metode SDS-PAGE. SDS-PAGE sendiri merupakan prosedur dasar dalam banyak aplikasi analisa protein dan dipakai sebagai salah satu prosedur untuk menilai tingkat kemurniaan protein. Jadi dengan menggunakan metode ini diharapkan hasil yang diperoleh dari SDS-PAGE adalah protein target yang akan dapat digunakan untuk menginduksi ikan Kerapu Tikus dalam penelitian yang akan dilakukan.

Tahapan akhir dari proses SDS-PAGE adalah menghitung Berat Molekul (BM) pada hasil gel SDS-PAGE. Cara menghitung BM adalah dengan mengukur BM yang tertera pada gel marker sebelumnya diubah kedalam bentuk log terlebih dahulu. Tahapan selanjutnya adalah menghitung Rf yang didapatkan dari perhitungan pembagian panjang A dan B pada sampel gel elektroforesis. Nilai B diperoleh dari panjang gel dari atas ke bawah, nilainya sama pada setiap rantai protein yang akan dihitung. Nilai A adalah selisih atau jarak antara rantai 1 ke 2, rantai 2 ke 3 dan seterusnya. Satuan yang digunakan dalam mengukur panjang A dan B adalah mikro. Setelah mendapatkan nilai A dan B cara untuk menghitung Rf adalah dengan membagi hasil tersebut yaitu A/B.

Cara untuk menghitung BM pada hasil SDS-PAGE PCP adalah dengan melakukan konversi nilai protein, yaitu dengan menghitung persamaan dari grafik linear. Grafik linear dipeleh dengan cara memasukkan nilai Rf sebagai (x) dan nilai log BM sebagai (y). Setelah didapatkan grafiknya, dicari trendline untuk mendapatkan persamaan $y = -bx + a$. Persamaan ini digunakan sebagai konfersi untuk memudahkan dalam perhitungan BM. Perhitungan BM pada hasil elektroforesis PCP dimulai dari menentukan nilai A dan B seperti pada tahap sebelumnya untuk mencari nilai Rf (x). Hasil treadline dihitung dengan memasukkan hasil persamaan diatas dan nilai BM diperoleh hasil treadline dipangkatkan 10.

Pengukuran pita protein pada *N. oculata* difokuskan pada pita rantai panjang yang memiliki berat protein 35-37 kDa dan pita rantai pendek yang memiliki berat protein 14-17 kDa. Hasil pengukuran kadar PCP nantinya akan diberikan pada ikan Kerapu Tikus dengan cara menyonde, yaitu dengan cara memasukkan PCP kedalam mulut ikan secara langsung. Ikan yang digunakan adalah ikan Kerapu Tikus yang berasal dari BBAP Situbondo dan mempunyai ukuran \pm 13-15 cm. Pada ukuran ini ikan tergolong dalam fase larva, dimana ikan belum mempunyai sistem imun yang sempurna. Pada kegiatan budidaya sering kali terjadi kematian massal pada usia larva, nilainya mencapai 80% yang mengakibatkan petani ikan merugi, mengingat ikan Kerapu Tikus adalah ikan komoditi ekspor yang mempunyai harga fantastis. Hal inilah yang mendorong untuk dilakukan penelitian sistem imun pada ikan Kerapu Tikus, yaitu dengan mengamati perubahan sistem imun antara ikan kontrol dan ikan yang akan dtambahkan PCP.

Penelitian ini akan dilakukan selama 29 hari dengan menggunakan 12 ekor ikan, masing-masing 6 ekor ikan kontrol dan 6 ekor ikan perlakuan yang nantinya akan ditambahkan dengan PCP. Masing-masing perlakuan ikan diletakkan pada kolam dengan aerasi yang bagus yaitu air laut yang telah disaring menggunakan blower dan air yang masuk kedalam kolam tidak akan berhenti atau mengendap cukup lama, melainkan akan langsung dibuang ke laut untuk menghindari perbedaan kualitas air yang cukup drastis. Air sebagai media hidup ikan harus dikontrol supaya mempunyai nilai yang optimal untuk batas hidup ikan Kerapu Tikus. Ikan yang akan digunakan dalam penelitian diadaptasikan dahulu pada media hidup yang baru agar tidak stress. Pemberian pakan juga sebaiknya dilakukan setelah 1-2 hari ikan dipindahkan. Pakan yang digunakan adalah ikan kembung segar yang dicacah hingga ukurannya kecil, hal

ini dilakukan untuk menyesuaikan dengan kebiasaan pakan ikan pada habitat aslinya. Pakan diberikan ketika ikan sudah terlihat sehat atau agresif.

Pemberian pakan dilakukan secara *adlibitum* yaitu memberikan pakan ke dalam perairan sedikit demi sedikit hingga ikan kenyang. Pemberian pakan ini bertujuan untuk menghindari penumpukan sisa pakan didasar perairan. Hal ini bertujuan untuk menjaga kualitas air yang nantinya akan berpengaruh terhadap media pertumbuhan ikan. Pakan diberikan pada pagi hari pukul 06.00 WIB dan pada sore hari pada pukul 17.00 WIB. Untuk mendukung parameter yang diukur, akan dilakukan pengamatan kualitas air baik secara fisik yang terdiri dari suhu dan salinitas serta secara kimia yang terdiri dari pH dan oksigen terlarut (DO).

Pengukuran kualitas air dilakukan 2 kali dalam sehari yaitu pagi dan sore, hal ini dilakukan untuk melihat perbandingan kualitas air pada pagi hari dan sore hari. Pengukuran suhu pada perairan dengan menggunakan thermometer dan untuk salinitas menggunakan refraktometer atago. Nilai DO perairan diperoleh dengan mengukur menggunakan DO meter dan nilai pH diperoleh dengan menggunakan pH meter. Pengukuran kualitas air hanya dilakukan selama 8 hari, namun hal ini dirasa cukup untuk mewakili parameter pendukung kualitas air. karena media air yang digunakan adalah air laut yang telah diolah dan menggunakan mesin blower setiap saat, maka tidak akan terjadi perubahan kualitas air yang drastis selama masa pemeliharaan ikan.

PCP diberikan pada ikan perlakuan selama 6 kali, yaitu pada hari ke-0 atau pada hari pertama pemberian pakan, hari ke-5; hari ke-9; hari ke-14; hari ke-18 dan hari ke-22. Dosis PCP yang diberikan berbeda pada setiap penyondean, yaitu dengan mengitung dosis stok PCP yang sudah diperoleh dari hasil spektrofotometri dengan dibandingkan pada berat ikan. Pemberian PCP yang digunakan pada hari ke-0 hingga hari ke-22 selalu bertambah disesuaikan dengan berat ikan dalam kolam perlakuan. Perhitungan dosis ini dilakukan untuk

mendapatkan hasil yang optimal dalam melakukan penelitian, diharapkan ikan yang digunakan masih dapat menerima PCP yang diberikan sehingga dapat digunakan atau dimanfaatkan sebagai materi hayati didalam tubuh untuk meningkatkan kekebalan tubuh. Oleh sebab itu dosis PCP yang diberikan harus dinaikkan sedikit demi sedikit.

Ikan yang sudah diamati selama 23 hari akan dibedah untuk diambil organ target yaitu insang ikan Kerapu Tikus. Insang merupakan organ internal yang dapat mewakili perubahan sistem imun karena insang merupakan organ pertama yang berhubungan dengan akumulasi bahan pencemar di dalam perairan. Selain itu, pada insang terdapat pembuluh darah yang sangat banyak dan dapat mewakili kemunculan MHC I pada ikan Kerapu Tikus. Organ target kemudian diambil untuk dilakukan proses SDS-PAGE hal ini untuk mengetahui pita profil protein MHC I pada masing-masing insang ikan kontrol dan ikan perlakuan. Marker yang digunakan pada SDS-PAGE organ insang ikan Kerapu Tikus adalah *Low Range Marker PRO-STAIN™*. Setelah diperoleh hasil pita protein dari proses SDS-PAGE, dibuat spesifikasi dari hasil perhitungan BM yang hanya terfokus pada protein MHC I. Masing-masing hasil SDS-PAGE organ insang ikan kontrol dan perlakuan mempunyai 1 spesifikasi yang bertujuan untuk memudahkan dalam menganalisa hasil protein target MHC I melalui metode Western Blotting (WB).

Selain proses SDS-PAGE, insang yang telah diambil akan diamati dengan menggunakan metode Imunohistokimia (IHC). IHC adalah suatu teknik penentuan keberadaan antigen dalam jaringan atau sel dengan menggunakan reaksi antigen dan antibodi. Reaksi ini akan diamati menggunakan mikroskop okuler dengan perbesaran 40x dan selanjutnya akan difoto menggunakan olympus digital kamera. Hasil pemotretan yang diperoleh selanjutnya akan dianalisa menggunakan software ImmunoRatio (IR). IR digunakan untuk

mengetahui persentasi keberadaan protein target dengan munculnya warna coklat dan ungu.

Hasil yang diperoleh dari analisa IR selanjutnya akan diproses dengan menggunakan software ImageJ yaitu aplikasi yang bertujuan untuk mengubah data kualitatif menjadi data kuantitatif atau data yang bisa dihitung untuk menentukan histogram dari masing-masing hasil insang ikan kontrol dan perlakuan. Analisa histogram digunakan untuk memudahkan dalam penjelasan. Hasil histogram yang didapatkan, selanjutnya akan digunakan untuk membuat grafik atau model untuk melihat apakah protein target dari insang ikan kontrol dan perlakuan mempunyai kemunculan yang berbeda setelah diinduksi dengan PCP

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Proses Isolasi Protein *N. oculata*

Prosedur isolasi protein *N. oculata* mengacu pada Laporan Penelitian Unggulan PT-BOPTN Yanuhar (2013), sebelum perlakuan pengisolasian langkah awal yang perlu dilakukan yaitu mempersiapkan alat dan bahan yang akan digunakan. Langkah perlakuan untuk Isolasi PCP meliputi :

A. Penggerusan Sampel

Adapun proses penggerusan sampel, diantaranya :

- Menimbang *N. oculata* sebanyak 80 gr
- Menghaluskan sampel dengan mortar dan alu selama 15 menit
- Menambah nitrogen cair \pm 5 ml
- Menghaluskan sampel dengan menggunakan mortar dan alu selama 2 jam
- Menambahkan larutan glisyn dan KCl 15 ml secara bertahap

- Memasukkan glisyn 10 ml kemudian menghaluskan sampel menggunakan mortar dan alu selama 2 jam
- Hasil

B. Sentrifuge

Adapun tahapan penggunaan sentrifuge, diantaranya :

- Menimbang hasil penggerusan sampel sebanyak 2 gr
- Memasukkan kedalam eppendoft steril
- Mensentrifuge pada 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C
- Mengambil supernatan
- Memasukkan supernatan kedalam eppendorf steril 1 ml
- Mensentrifuge 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C
- Mengambil supernatan
- Memasukkan dalam falcon 50 ml
- Hasil

C. Dialisa I

Tahapan proses dialisa I, adalah :

- Merebus kantong selofan dengan 100 ml larutan PBS dan 2 gr EDTA selama 10 menit
- Menjepit kantong selofan bagian bawah dengan tube dan mengikat tubing dengan benang wol
- Memasukkan hasil isolasi PCP yang diperoleh dari proses sentrifuge kedalam kantong selofan
- Menutup dengan dialisis tube dan diikat pada bagian atas
- Memasukkan dalam Tris-Hcl 1,5 M pH 7,8 sebanyak 2000 ml
- Menggunakan magnetic stirer dalam kulkas selama 2 × 24 jam
- Hasil

D. Dialisa II

Tahapan proses dialisa I, adalah :

- Hasil dialisa I dikeluarkan dari kantong selofan
- Menampung hasil isolasi PCP dalam falcon steril
- Kantong selofan dicuci hingga mendidih dengan menggunakan aquadest 100 ml + 2 gr EDTA selama 10 menit
- Dialisa I disaring dengan disposable filter
- Hasil ditampung dikantong selofan yang sudah dicuci
- Kemudian dimasukkan cairan Tris HCl + Magnetic stirer 2000 ml
- Hasil berupa PCP
- Dianalisa kandungan protein dengan menggunakan nanodrop spektrofotometer

3.5.2 Elektroforesis Protein dengan Metode SDS-PAGE

Fatchiyah, *et al.* (2011), menyatakan prosedur Elektroforesis protein dengan SDS-Page adalah sebagai berikut:

A. Menyiapkan sampel

- Tambahkan sampel bufer ke dalam sampel protein (perbandingan 1 : 1) dalam tabung Eppendorf.
- Panaskan sampel pada suhu 100°C selama 5 menit.
- Setelah dingin, simpan pada suhu 20°C bila sampel tidak langsung dipakai.

B. Pembuatan Media/gel elektroforesis SDS-PAGE

Adapun langkah-langkah dalam pembuatan media/gel untuk elektroforesis SDS adalah sebagai berikut:

- Susun plate pembentuk gel.
- Buat separating gel 12,5%. Dengan cara:

1. Siapkan tabung polipropilen 50ml.
2. Masukkan 3,125 ml stok akrilamida dalam tabung.
3. Masukkan 2,75 ml 1M Tris pH 8,8. Tabung di tutup, lalu tabung digoyang secara perlahan.
4. Masukkan aquabides 1,505 ml. Tabung ditutup, lalu tabung digoyang secara perlahan.
5. Masukkan 75 μ l SDS 10%. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan.
6. Masukkan 75 μ l APS 10%. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan.
7. Masukkan 6,25 μ l TEMED. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan.

- Segera tuang larutan kedalam plate pembentuk gel menggunakan mikropipet 1 ml (jaga jangan sampai terbentuk gelembung udara) sampai batas yang terdapat pada plate.
- Secara perlahan, tambahkan aquades di atas larutan gel dalam plate agar permukaan gel tidak bergelombang.
- Biarkan gel memadat selama kurang lebih 30 menit (ditandai dengan terbentuknya garis transparan diantara batas air dan gel yang terbentuk).

Setelah itu buang air yang menutup separating gel.

- Sesudah separating gel memadat, siapkan stacking gel 3%. Dengan cara:
 1. Siapkan tabung polipropilen 50ml.
 2. Masukkan 0,45 ml stok akrilamida dalam tabung.
 3. Masukkan 0,38 ml 1M Tris pH 6,8. Tabung ditutup, lalu digoyang-goyang secara perlahan
 4. Masukkan aquabides 2,11 ml. Tabung ditutup, lalu digoyang-goyang secara perlahan

5. Masukkan 30 μl SDS 10%. Tabung ditutup, lalu digoyang-goyang secara perlahan
6. Masukkan 5 μl TEMED. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan.

C. Running Elektroforesis Sodium Dodesil Poliakrilamid (SDS-PAGE)

Tahapan proses SDS-PAGE ini, diantaranya:

- Masukkan plate yang sudah berisi gel ke dalam chamber elektroforesis.
- Tuang running buffer sampai bagian atas dan bawah gel terendam.
- Bila terbentuk gelembung udara pada dasar gel atau diantara sumur sampel, maka gelembung tersebut harus dihilangkan.
- Masukkan sampel sebanyak 10-20 μl (yang kandungan proteinnya minimal 0,1 g dan maksimal 20-40 g) secara hati-hati ke dalam dasar sumur gel menggunakan Syringe Hamilton.
- Bilas syringe sampai 3x dengan air atau dengan running buffer sebelum dipakai untuk memasukkan sampel yang berbeda pada sumur gel berikutnya.

D. Running Sampel

- Tahap awal untuk memulai running, hubungkan perangkat elektroforesis dengan sumber listrik.
- Lakukan running pada arus konstan 20 mA selama kurang lebih 40-50 menit atau sampai tracking dye mencapai jarak 0,5 cm dari dasar gel.
- Setelah selesai, tuang running buffer dan ambil gel dari plate.

E. **Pewarnaan (Staining) Media/Gel Hasil Elektroforesis Sodium Dodesil Poliakrilamid (SDS-PAGE)**

1. **Pewarnaan Commasie Brilliant Blue**

- Tahap ini diperlukan larutan staining untuk mewarnai protein pada gel dan larutan destaining untuk menghilangkan warna pada gel dan memperjelas pita protein yang terbentuk.

Tabel 6. Komposisi larutan Staining dan Destaining

Larutan staining 1 liter		Larutan destaining 1 liter	
Coomassie Blue R-250	1,0 g	Metanol	100 ml
Metanol	450 ml	Asam asetat glasial	100 ml
Aquades	450 ml		
Asam asetat glasial	100 ml		

- Rendam gel dalam 20 ml staining solution sambil digoyang selama kurang lebih 15 menit. Setelah itu, tuang kembali larutan staining pada wadahnya.
- Cuci dengan air beberapa kali. Setelah itu, rendam gel dalam larutan 50 ml destaining solution sambil digoyang selama kurang lebih 30 menit atau sampai pita protein terlihat jelas.

2. **Pewarnaan Perak Nitrat (Silver Stain)**

Prosedur untuk melakukan pewarnaan perak nitrat (silver stain) adalah :

- Rendam gel dalam larutan fiksasi selama 30 menit.
- Larutan fiksasi di tuang dan gel kemudian direndam dalam larutan sensitizing selama 30 menit.
- Selanjutnya gel di cuci dengan cara direndam dalam aquades selama 5 menit dan dilakukan sebanyak tiga kali.
- Gel direndam dalam pereaksi perak.
- Gel dicuci dengan cara direndam dalam aquades selama 2 menit dan dilakukan sebanyak satu kali.

- Selanjutnya gel direndam dalam larutan developing selama 30 detik sampai 5 menit. Perendaman harus segera dihentikan bila gel sudah mulai menjadi berwarna gelap.
- Reaksi yang berlangsung pada tahap 7 dihentikan dengan cara merendam gel dalam larutan stopping selama 10 menit.
- Gel dicuci dengan cara direndam dalam aquades selama 5 menit dan dilakukan sebanyak tiga kali.
- Gel direndam dalam larutan pengawet selama 30 menit dan dilakukan sebanyak 2 kali dan gel siap diamati.

3.5.3 Pengukuran Berat Molekul Protein sampel

- Mengambil setiap sampel protein dan amati terlebih dahulu berapa jumlah pita protein yang terlihat, kemudian tentukan nilai R_f masing-masing pita protein dari setiap sampel
- Dari setiap nilai R_f yang diperoleh, hitung berat molekulnya dengan bantuan persamaan garis linear dari kurva standar berat molekul.
- Catat hasil yang di peroleh dalam tabel.

3.5.4 Aklimatisasi Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*)

Ikan uji yang digunakan yaitu ikan kerapu tikus yang pengujiannya dilakukan di BBAP Situbondo. Ikan kerapu tikus yang digunakan berukuran antara 13-15 cm. Sumber data Laporan Penelitian Unggulan PT-BOPTN Yanuhar (2013), mengatakan bahwa benih ikan kerapu tikus yang baru datang tidak langsung diberikan pakan, karena memerlukan adaptasi terhadap media pemeliharaannya yang baru. Pakan diberikan setelah ikan terlihat sehat dan agresif. Pakan yang digunakan berupa ikan kembung segar yang dicacah hingga ukurannya kecil yang disesuaikan dengan bukaan mulut ikan. Pemberian pakan

dilakukan 2-3 hari setelah ikan pertama kali di masukkan di kolam, karena ikan masih di puasakan terlebih dahulu agar nafsu makan terjaga.

Pakan diberikan secara *adlibitum* yaitu pemberian pakan sedikit demi sedikit sampai ikan kenyang. Tujuan dari pemberian pakan secara *adlibitum* untuk menghindari adanya pengendapan sisa pakan yang tidak dimakan pada dasar kolam sehingga mengakibatkan kolam ikan akan mengalami penurunan kualitas air utamanya oksigen terlarut. Pemberian pakan dilakukan pada jam 06.00 dan 17.00 WIB. Selain itu setiap harinya dilakukan pengukuran parameter kualitas air seperti suhu, salinitas, pH dan oksigen terlarut untuk menjaga agar kondisi lingkungan Ikan kerapu tikus tetap terjaga.

Pemberian PCP pada ikan Kerapu Tikus dilakukan secara bertahap. Metode penelitian ini mengacu pada Alifudin (2001), yaitu pemberian *Crude Protein Pirenoid* pada ikan Kerapu Tikus dilakukan dengan cara *in vivo*. Proses pengujian dilakukan secara oral yaitu dengan metode sonde. Yanuhar (2009), metode sonde yaitu pemberian pakan kedalam tubuh ikan dengan cara memasukkan makanan tersebut langsung kedalam mulut ikan. Proses penyondean dilakukan sebanyak 6 kali yang berfungsi sebagai imunostimulator selama masa pemeliharaan ikan Kerapu Tikus pada. Proses penyondean dilakukan pada hari ke-0, ke-5, ke-9, ke-14, ke-19 dan ke-23. Dosis yang digunakan tiap proses penyondean berbeda disesuaikan dengan berat ikan pada kolam ikan perlakuan.

3.5.5 Imunohistochemistry (IHC)

Prosedur IHC mengacu pada metode Yanuhar (2009), sebagai berikut :

- Melakukan preparasi jaringan organ yang dipapar imunogenik
- Melakukan deparafinasi preparat dengan xilol 20 μm selama \pm 5 menit

- Melakukan dehidrasi dengan alkohol absolut sebanyak 2 kali ulangan pada konsentrasi 90%, 80% dan 70% masing-masing selama 5 menit
- Membilas preparasi dengan dionize water 20 µm sebanyak 3 kali ulangan, masing-masing 5 menit
- Menyimpan preparasi dalam refrigerator (overnight)
- Membilas preparat dengan PBS pH 7,4 20 µm sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit
- Menginkubasi preparat dengan H₂O₂ 3% selama 10 menit
- Blocking unspesifik protein dan inkubasi dalam 5% PBS dengan 1-2% BSA
- Menyiapkan antibodi primer, yaitu anti MHC I yang dilarutkan dalam larutan blotto dengan perbandingan 1:1000
- Mencuci dengan antibodi primer anti MHC I (1:1000) overnight 4°C
- Menetesi preparat dengan antibodi anti MHC I dan diinkubasi overnight 4°C
- Preparat kemudian dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit
- Keringkan kembali sisa-sisa PBS yang masih menempel dan siapkan antibodi sekunder, yaitu anti MHC I anti grouper yang dilarutkan dalam larutan blotto dengan perbandingan 1:200
- Preparat kemudian ditetesi dengan larutan antibodi sekunder anti MHC I anti grouper dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang
- Preparat kembali dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, selama 5 menit
- Keringkan kembali sisa-sisa PBS yang masih menempel
- Menginkubasi dalam SA-HRP dengan perbandingan 1:500 selama 40 menit
- Preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit
- Menggunakan kromagen DAB selama 20 menit
- Preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit
- Memberikan counterstain dengan majer *hemotoxilen* selama 10 menit

- Membilas preparat dengan DH_2O sebanyak 3 kali ulangan masing-masing selama 5 menit
- Mengeringkan preparat dengan cara diangin-anginkan
- Mengamati preparat hasil pewarnaan IHC dibawah mikroskop okuler dengan perbesaran 40x
- Mengambil gambar hasil IHC dengan menggunakan *olympus digital camera*
- Hasil

3.5.6 Western Blotting

Prosedur WB mengacu pada metode Fatchiyah, *et al.* (2011), sebagai berikut :

- Sampel dirunning bersamaan pada dua sumur. Bila terdapat enam macam sampel, maka sampel 1 dimasukkan ke dalam sumur nomor 1 dan 8, sampel 2 dimasukkan ke dalam sumur nomor 2 dan 9, demikian seterusnya. Sumur nomor 7 diisi dengan standart berat molekul protein dan marker. Sumur nomor 1-6 berfungsi sebagai kontrol antibodi primer positif, sedangkan sumur nomor 8-13 berfungsi sebagai kontrol antibodi primer negatif.
- Antibodi yang digunakan :
 - o Antibodi primer : monoklonal anti MHC I 1:200
 - o Antibodi sekunder : anti MHC I anti *Groupet*
 - o Substrat : *Western Blue* substrat solution (siap pakai)
- Merendam gel hasil elektroforesis dan kertas saring Whatman dalam PBST (PBS yang mengandung 0,05% Tween-20)
- Merendam membran PVDF dalam metanol, kemudian merendam dalam bufer transfer

- Ketiga komponen tersebut disusun mulai dari bawah ke atas secara berturut-turut mulai kertas saring, membran PVDF, gel dan kertas saring pada wet transblot (Biocraf) .
- mengisikan bufer blotting pada chamber, kemudian lakukan transfer pada 20 V selama 15 jam
- untuk mengetahui apakah protein pada gel sudah tertransfer ke membran PVDF, maka membran diwarnai dengan ponceau selama 5 menit kemudian dibilas dengan aquades. Protein dikatakan sudah tertransfer bila terdapat gambaran pola pita protein pada membran setelah membran dibilas.
- Rendam membran PVDF dalam bloto 5% (5% susu skim dalam PBST) selama 60 menit sambil diagitasi, kemudian dicuci dalam PBST
- Membran yang berisi sumur nomor 1-6 diinkubasi dalam antibodi primer yaitu monoklonal anti MHC I, sedangkan membran yang berisi sumur nomor 8-13 diinkubasi dalam larutan bloto, masing-masing selama semalam dalam lemari pendingin, kemudian dicuci dalam PBS.
- Rendam membran dalam antibodi sekunder, yaitu anti MHC I anti *groupet* dalam PBST selama 60 menit pada suhu ruang, kemudian cuci dalam PBST.
- Rendam membran dalam 1 mL larutan substrat Western Blue sampai pita protein berwarna biru tua terlihat. Ini menandakan adanya protein target dalam sampel yang terikat dengan antibodi primer.
- Cuci membran dengan aquades
- Bandingkan pola pita protein pada kontrol positif dengan kontrol negatif. Sampel dikatakan positif mengekspresikan MHC I bila pita protein 45 kD hanya terdapat pada kontrol negatif.

3.5.7 Parameter Kualitas Air

A. Parameter Fisika Air

Parameter fisika yang diukur dalam penelitian ini terdiri dari :

1. Suhu (Rahayu, 2009)

Alat yang digunakan dalam pengukuran suhu air adalah termometer standar. Langkah dalam pengukuran suhu adalah:

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

2. Salinitas (Kordi, 2005)

Pengukuran salinitas dilakukan dengan menggunakan alat refraktometer, adapun cara pengukuran salinitas adalah:

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

B. Parameter Kimia Air

Parameter fisika pendukung kualitas air yang diukur dalam penelitian ini terdiri dari :

1. Derajat Keasaman (pH) (Jeffries dan Mills *dalam* Hartanti, 2008)

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan alat pH meter, adapun cara pengukuran pH adalah:

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

2. *Disolved Oxygen* (DO) / Oksigen Terlarut (Salmin, 2005)

Cara penentuan oksigen terlarut dengan metode elektrokimia adalah langsung untuk menentukan oksigen terlarut dengan alat DO meter prinsip kerjanya adalah:

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

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kultur Mikroalga Laut *N. oculata*

Kultur *N. oculata* dilakukan secara massaldi BBAP Situbondo sebanyak 2000 liter. Proses kultur dilakukan pada bak-bak semen yang sudah disterilisasi terlebih dahulu menggunakan kaporit sebanyak 10 ppm. Minimal lama proses sterilisasi yang dilakukan adalah selama 24 jam, dimana selama tenggang waktu 24 jam dapat diasumsikan bakteri, jamur ataupun parasit yang menempel pada bak semen dapat luruh dan hilang. Cara mengatasi bau yang masih menempel pada bak semen adalah dengan menetralkan bak semen menggunakan thiosulfat sebanyak 5 ppm dan bak dibilas menggunakan air tawar. Bak semen siap untuk digunakan kultur massal mikroalga laut *N. oculata*.

Kultur dimulai dari pengisian air pada bak semen dengan menggunakan air payau (campuran air tawar dengan air laut) sebagai media utama pertumbuhan *N. oculata*. Pupuk walne dan vitamin diberikan pada bak kultur sebelum penebaran bibit *N. oculata* dilakukan sebagai media pendukung pertumbuhan mikroalga. Menurut Hermanto, *et al.* (2011), mikroalga *N. oculata* sebanyak 1 liter menggunakan pupuk Walne dan vitamin sebanyak 18 mL untuk mendukung media pertumbuhan mikroalga. Bibit *N. oculata* yang digunakan berasal dari kultur murni dalam keadaan tidak terkontaminasi oleh zooplankton maupun oleh organisme lain. Masa pengkulturan dilakukan selama kurang lebih 5 hari dengan 1 kali masa kultur.

Kolam yang sudah berisikan pupuk walne dan vitamin, selanjutnya siap untuk ditebari bibit *N. oculata*. Bibit yang ditebar pada proses kultur massal sebanyak 20% dari volume total. Pemberian pupuk hanya dilakukan 1 kali dalam masa pengkulturan mikroalga. Parameter pendukung kesuksesan kultur *N.*

oculata adalah cahaya matahari sebagai sumber makanan mikroalga, selain itu parameter kualitas air juga dibutuhkan seperti, salinitas, pH, suhu dan intensitas cahaya matahari. BBAP Situbondo (2014), menyebutkan kualitas air yang optimal untuk mendukung pertumbuhan *N. oculata* adalah salinitas 28-30 ppt, pH perairan pada kisaran 8-9,5, intensitas cahaya matahari 10.000 lux dan suhu pada kisaran 25-30°C.

Selama masa pengkulturan, air dalam bak akan berubah menjadi kehijauan. Hal ini mengindikasikan bahwa mikroalga yang ada didalamnya hidup atau tumbuh karena jika air didalam kolam menjadi bening, telah terjadi penguraian sel yang menyebabkan *N. oculata* mati. Selama masa pengkulturan, *N. oculata* mengalami 5 fase pertumbuhan yaitu fase lag, fase log, fase stasioner, fase penurunan laju pertumbuhan dan fase kematian. *N. oculata* yang digunakan untuk pengisolasian PCP adalah pada fase stasioner. Fase stasioner dipilih karena mikroalga mulai mengalami penurunan jumlah kepadatan yang disebabkan kandungan nutrisi didalam media kultur sudah mulai habis. Pada fase ini, mikroalga dipanen dengan cara menyaring kandungan air dan diperoleh endapan dari *N. oculata* yang berbentuk bubuk. Bubur *N. oculata* selanjutnya digunakan dalam tahap isolasi PCP.

4.2 Isolasi PCP *N. oculata*

Bubur *N. oculata* yang diperoleh dari proses kultur massal adalah sebanyak \pm 2400 gram basah. Selanjutnya bubuk *N. oculata* dipindahkan kedalam falcon steril, yang masing-masing falcon memiliki volume 45 ml. Bubur yang telah dimasukkan kedalam falcon, selanjutnya disimpan kedalam deep freezer -80°C, agar kualitas dari bubuk *N. oculata* tetap terjaga. Isolasi protein dimulai dengan mengambil sampel *N. oculata* sebanyak 80 gram basah yang kemudian dihaluskan menggunakan mortar dan alu selama 15 menit, kemudian

ditambahkan dengan nitrogen cair sebanyak kurang lebih 5 ml yang berfungsi sebagai kejutan karena nitrogen cair mempunyai sifat yang dingin sehingga dapat membekukan sampel, tujuannya adalah ketika sampel dihaluskan kembali menggunakan alu, dinding sel akan ikut terpecah dan protein akan keluar.

Penggerusan menggunakan mortar dan alu dilakukan selama kurang lebih 2 jam. Selama proses penggerusan, ditambahkan glysin dan KCl 15 ml secara bertahap. Pemberian glysin dan KCl adalah sebagai pelarut. Sampel kembali dihaluskan hingga berubah warna menjadi hijau kekuningan atau struktur sampel menjadi agak sedikit encer. Gambar dibawah ini menunjukkan perbedaan warna sampel *N. oculata*, pada gambar 11A menunjukkan proses penyaringan dimana sampel berwarna hijau tua sedangkan pada gambar 11B menunjukkan sampel yang telah berubah warna menjadi hijau muda kekuningan yang telah dihaluskan, menunjukkan sampel yang sudah mengeluarkan PCP dan siap untuk dilakukan proses dialisa. Lebih jelasnya ditunjukkan pada Gambar 11



Gambar 11.Proses (A) Penyaringan (B) Penggerusan sampel *N. oculata*
(sumber : dokumentasi pribadi)

Sampel yang didapatkan dari proses penggerusan adalah berupa isolat sebanyak 66 ml. Hasil tersebut kemudian dimasukkan kedalam eppendorf steril berukuran 2 ml. Banyaknya sampel yang dimasukkan kedalam eppendorf harus

seragam, ditentukan sebanyak 2 gram sampel yang digunakan tiap eppendorf. Didapatkan hasil 44 eppendorf dari proses penimbangan, yang selanjutnya dilakukan proses sentrifuge dengan kecepatan 10000 rpm, selama 10 menit dengan suhu 4°C. Setelah proses sentrifuge selesai, memisahkan hasil supernatan yaitu larutan yang berwarna bening pada bagian atas dalam eppendorf dengan pellet yaitu bagian yang menggumpal dan menggendap dibawah eppendorf. Pemisahan antara supernatan dan pellet dapat dilihat pada Gambar 12.

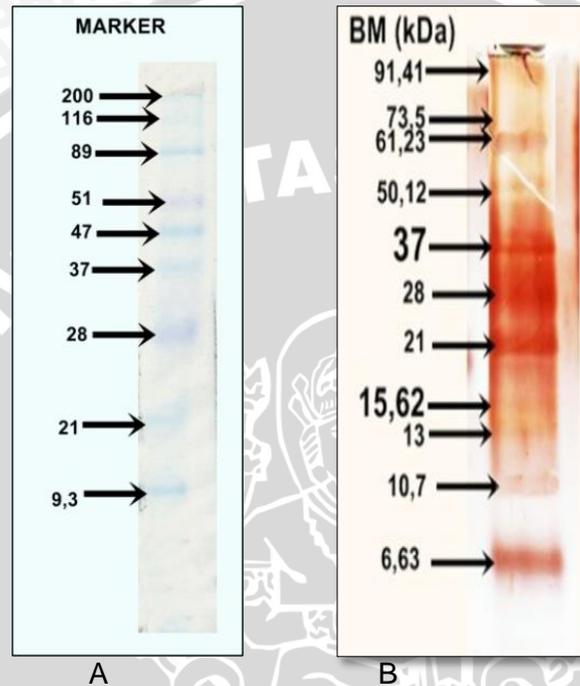


Gambar 12. (A) Hasil sentrifuge (B) supernatan *N. oculata* dari proses sentrifuge (sumber : dokumentasi pribadi)

Hasil supernatan yang didapatkan kemudian dipindahkan kedalam kantong selofan. Kontong ini merupakan kantong semi permiable, yang bertujuan untuk menyaring protein murni yang terdapat pada supernatan tersebut. Proses untuk merubah hasil isolat menjadi PCP murni, dilakukan dengan cara dialisa I dan dialisa II. Dalam proses dialisa digunakan larutan PBS pH 7,4 sebagai media perebusan kantong selofan. Proses dialisa dilakukan selama 2x24 jam. Setelah dilakukan proses dialisa, supernatan diambil dengan menggunakan filter berukuran 0,20 µl. Hasilnya adalah 53 ml, hasil tersebut kemudian dilakukan untuk mengukur konsentrasi protein menggunakan nano drop-spectrophotometry UV-VIS, dan didapatkan hasil elektroforesis sebesar 27 µg/ml.

4.3 Profil PCP *N. oculata*

Dari hasil SDS-PAGE protein *N. oculata* menggunakan pewarnaan silver stain, terdapat 9 pita protein pada marker yang dimulai dari 9,3 kDa, 21kDa, 28 kDa, 37 kDa, 47 kDa, 51 kDa, 89 kDa, 116 kDa, sampai 200 kDa. Pengamatan profil PCP mikroalga laut *N. oculata* dapat dilihat pada Gambar 13.



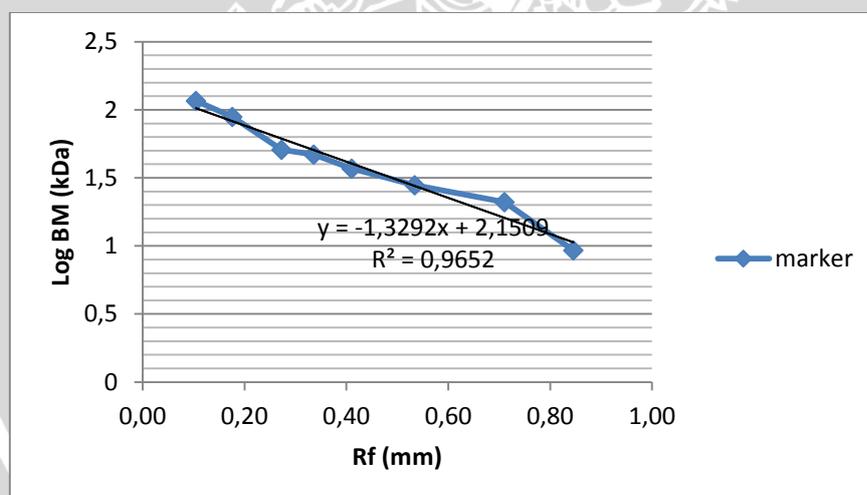
Gambar 13. (A) *Low Range Marker PRO-STAIN™* (B) Hasil Elektroforesis Pita *Crude Protein N. oculata* dengan *SDS-PAGE* dengan pewarnaan Silver Stain. (sumber: Laporan Penelitian Unggulan PT-BOPTN 2013-2014 Oleh Yanuhar).

Perhitungan BM pada pita Marker digunakan untuk mencari persamaan dalam menghitung BM yang muncul pada pita profil protein *N. oculata* lainnya. Marker yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Low Range Marker PRO-STAIN™* yang merupakan marker untuk menghitung spesifikasi BM protein. Tujuan dari perhitungan marker adalah mencari konversi untuk memudahkan dalam perhitungan hasil SDS-PAGE sampel *N. oculata*. Data perhitungan BM pita protein Marker *N. oculata* dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Perhitungan Berat Molekul Pita Protein molekul standar *Low Range Marker* PRO-STAIN™

Marker (BM)	Log BM (Y)	Marker		
		A (mm)	B (mm)	Rf (X)
116	2,064457989	76	726	0,10468
89	1,949390007	128	726	0,17630854
51	1,707570176	198	726	0,272727273
47	1,672097858	244	726	0,336088154
37	1,568201724	298	726	0,41046832
28	1,447158031	388	726	0,534435262
21	1,322219295	516	726	0,710743802
9,3	0,968482949	614	726	0,845730028

Setelah didapatkan hasil perhitungan BM pada pita protein marker *N. oculata* maka selanjutnya adalah menghitung persamaan linear dari hasil diatas dengan menggunakan microsoft excel. Hasil dari perhitungan grafik linear dapat dilihat pada Gambar 14.



Gambar14. Grafik linear pita protein marker *N. oculata*.

Dari gambar 14 didapatkan hasil persamaan linear pada pita protein marker *N. oculata* yaitu $y = (-1,329x) + 2,150$ dengan $R^2 = 0,965$. Dari persamaan tersebut kemudian dapat menentukan BM pada pita protein *N. oculata*. Nilai BM yang dihitung diperoleh dari persamaan linear dengan

memasukkan nilai Rf sebagai nilai (x) dan memangkatkan 10. Data perhitungan BM pita protein *N. oculata* dapat dilihat pada Tabel 8 :

Tabel 8.Perhitungan Berat Molekul Pita Protein Mikroalga Laut *N. oculata*

Profil Protein <i>N. oculata</i>					
pita	A (mm)	B (mm)	Rf (x)	$y = -1,3292x+2,1509$	BM
1	48	336	0,142857	1,961042857	91,42034526
2	72	336	0,214285714	1,866114286	73,47071828
3	92	336	0,273809524	1,787007143	61,23604632
4	114	336	0,339285714	1,699989286	50,11748692
5	148	336	0,44047619	1,565507143	36,77114411
6	178	336	0,529761905	1,446846429	27,97991743
7	210	336	0,625	1,320275	20,90619515
8	242	336	0,720238095	1,193703571	15,62081077
9	262	336	0,779761905	1,114596429	13,01956363
10	284	336	0,845238095	1,027578571	10,65561625
11	336	336	1	0,8219	6,635902555

Setelah menghitung nilai BM pada profil protein *N. oculata* didapatkan hasil 11 pita protein, dimulai dari 6,63 kDa, 10,7 kDa, 13 kDa, 15,62 kDa, 21 kDa, 28 kDa, 37 kDa, 50,12 kDa, 61,23 kDa, 73,5 kDa sampai dengan 91,41 kDa. Weis, *et al.* (2002), menyebutkan bahwa alga mempunyai dua bentuk peridinin, namun beberapa jenis alga hanya mempunyai satu bentuk piridinin saja. Peridinin mempunyai fungsi fisiologis sebagai zat antioksi dan dimana peridinin merupakan senyawa yang melindungi sel dari efek berbahaya radikal bebas. Bentuk dari peridinin adalah yang pertama bentuk pendek (homodimer), yaitu dengan berat molekul antara 14-16 kDa, dan untuk bentuk kedua adalah bentuk panjang (monomer) yang mempunyai berat molekul antara 30-37 kDa.

Hirschberg, *et al.* (1997) dalam Fasya (2013), mengatakan bahwa peridinin pada tumbuhan dan alga mempunyai peran yang sangat penting dipusat reaksi fotosintesis dan juga terlibat dalam proses transfer energi. Selain digunakan untuk menangkal radikal bebas dan meningkatkan kekebalan tubuh vertebrata, konsumsi komponen peridinin yang sudah berasosiasi dalam bentuk

karotenoid dalam jumlah tertentu secara signifikan mampu mengurangi resiko kanker. Dari hasil Elektroforesis *N. oculata* menggunakan SDS-PAGE pada gambar diatas, dapat dilihat bahwa pita protein muncul pada 37 kDa atau disebut sebagai bentuk panjang (monomer) hal ini ditunjukkan dengan munculnya garis tebal berwarna jingga pada gel aragosa hasil elektroforesis. Sedangkan pada pita pendek (homodimer), pita protein muncul tipis pada berat molekul 15,62 kDa.

Pirenoid pada ganggang hijau sebagai tempat pembentukan amilum, pada ganggang lain, pirenoid digunakan sebagai tempat menyimpan cadangan makanan. Sudarsono (2013), pirenoid digunakan sebagai pusat fiksasi karbondioksida dalam kloroplas ganggang, dan merupakan wilayah khusus di dalam plastida. Pirenoid sendiri terletak didalam sel yang diselubungi oleh pati yang menutupinya. Zat pati merupakan bahan utama yang dihasilkan oleh tumbuhan untuk menyimpan kelebihan glukosa atau digunakan sebagai produk fotosintesis dalam jangka panjang. Zat pati sering disebut dengan amilum yang merupakan karbohidrat, yang tidak larut dalam air dan tidak berbau. Amilum inilah yang dirombak sebagai bahan bakar dan dimanfaatkan oleh sel. Oleh karena itu, pirenoid sering diasosiasikan sebagai gudang zat pati yang dihasilkan oleh sel.

4.4 Pengujian In Vivo Ikan Kerapu Tikus

Pemeliharaan ikan Kerapu Tikus dilakukan di BBAP Situbondo selama 23 hari. Panjang tubuh (*total length*) ikan rata-rata sama yakni 15 cm dengan berat tubuh rata-rata 46 gram. Isolat PCP yang didapatkan melalui proses isolasi selanjutnya diujikan pada ikan Kerapu Tikus masing-masing pada hari pertama pemberian pakan (hari ke-0) sebesar 137 μ l, pada hari kelima sebesar 143 μ l, pada hari ke-9 sebesar 145 μ l, hari ke-14 sebesar 146 μ l, hari ke-18 sebesar 148 μ l dan pada hari ke-22 sebesar 151 μ l. Pemberian PCP dilakukan dengan cara

menyonde. Data berat ikan kontrol dan ikan perlakuan selama masa pemeliharaan di BBAP Situbondo disajikan pada lampiran 2.

Selama masa pemeliharaan ikan Kerapu Tikus, ikan diberikan pakan rucah yang disesuaikan dengan bukaan mulut ikan yang masih berusia larva. PCP diberikan kepada tubuh ikan sebagai materi hayati untuk meningkatkan respon kekebalan tubuh. Apabila PCP masuk ke dalam tubuh ikan, maka imunostimulan akan merangsang makrofag untuk memproduksi interleukin yang akan mengaktifkan sel limfosit yang kemudian membelah menjadi limfosit T dan B (Raa *et al*, 1992 dalam Sudarsono, 2013).

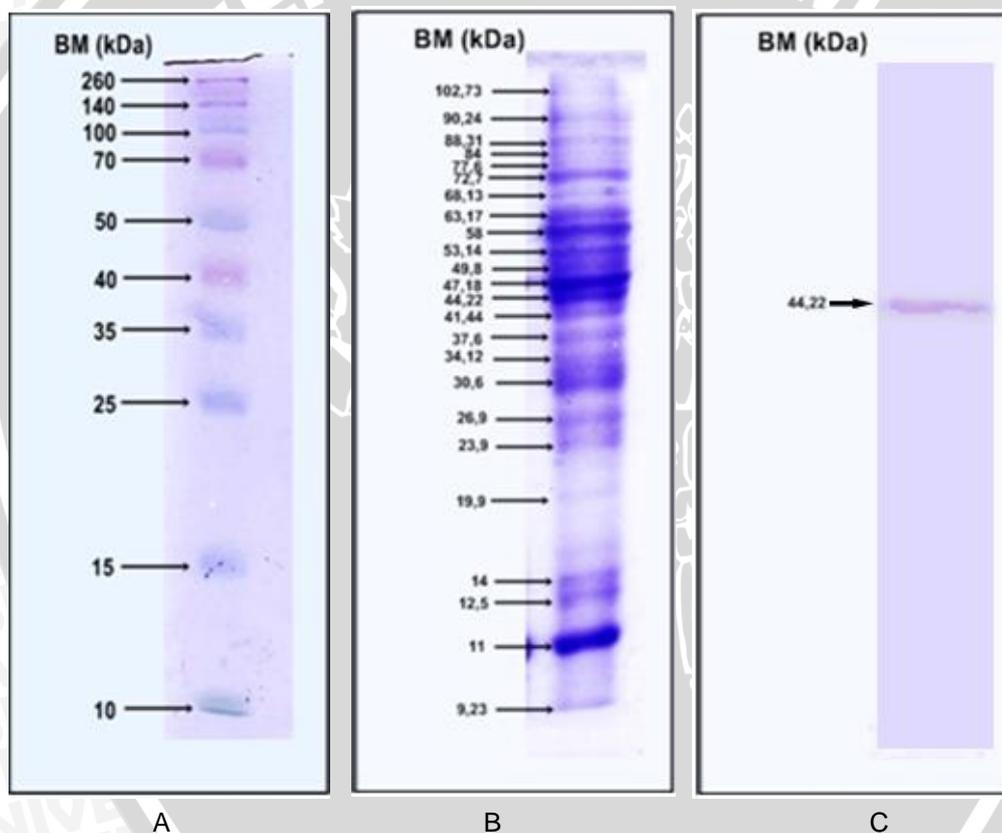
Setiap harinya, rata-rata berat ikan mengalami penambahan secara bertahap. Rata-rata berat tubuh ikan kontrol adalah 57,068 gram sedangkan ikan perlakuan memiliki berat rata-rata 57,441 gram. Pakan yang diberikan harus sedikit demi sedikit untuk menghindari sisa pakan yang akan mengendap ke dalam perairan yang akan mempengaruhi kualitas perairan. Analisa kualitas air digunakan sebagai data pendukung dalam penelitian ini.

4.5 Profil Protein Organ Insang Ikan Kerapu Tikus Menggunakan Metode SDS-PAGE

Ikan Kerapu Tikus yang telah diberikan perlakuan menggunakan PCP, maka akan diamati profil proteinnya menggunakan SDS-PAGE. SDS-PAGE merupakan tahapan untuk menganalisa protein. Organ target yang digunakan pada penelitian ini adalah insang, dimana insang sebagai bagian eksternal dari tubuh dari ikan yang berhubungan langsung dengan lingkungan hidup ikan. Insang ikan yang diamati berjumlah dua buah, yakni terdiri dari insang dari ikan kontrol dan insang perlakuan, yaitu yang sudah ditambahkan PCP pada masa pemeliharaan ikan dalam rentan waktu 23 hari.

Analisa profil protein pada insang ikan Kerapu Tikus dimulai dari pengambilan sampel organ target (insang) yang kemudian dipotong halus dan

dihaluskan menggunakan mortar dan alu dengan penambahan tris HCl kurang lebih 5 ml. Hasil dari gerusan insang tersebut kemudian dibuat gel gel running yang telah diberi perlakuan pewarnaan (*staining*) dengan *Cromassive Brilliant Blue* (CBB) yang berfungsi untuk memberi warna pita protein sehingga dapat diamati. Selanjutnya dilakukan proses pencucian (*destaining*), tujuannya adalah untuk memudahkan pewarna yang digunakan pada gel sehingga dapat dibaca dengan jelas. Hasil SDS-PAGE kemudian di scan menggunakan GelDock. Gambar 15 merupakan hasil elektroforesis SDS-PAGE organ insang ikan kontrol ikan Kerapu Tikus.



Gambar 15. Hasil SDS-PAGE. **A:** *Low Range Marker* PRO-STAIN™. **B:** Insang Ikan Kontrol. **C:** Spesifikasi dengan menggunakan WB. (sumber: Laporan Penelitian Unggulan PT-BOPTN 2013-2014 Oleh Yanuhar).

Hasil dari elektroforesis menggunakan SDS-PAGE diperoleh 10 pita protein marker, yaitu 10 kDa, 15 kDa, 25 kDa, 35 kDa, 40 kDa, 50 kDa, 70 kDa, 100 kDa, 140 kDa dan 260 kDa. Pengamatan terhadap hasil ekspresi molekul MHC I pada gambar diatas, organ insang tanpa perlakuan (ikan kontrol)

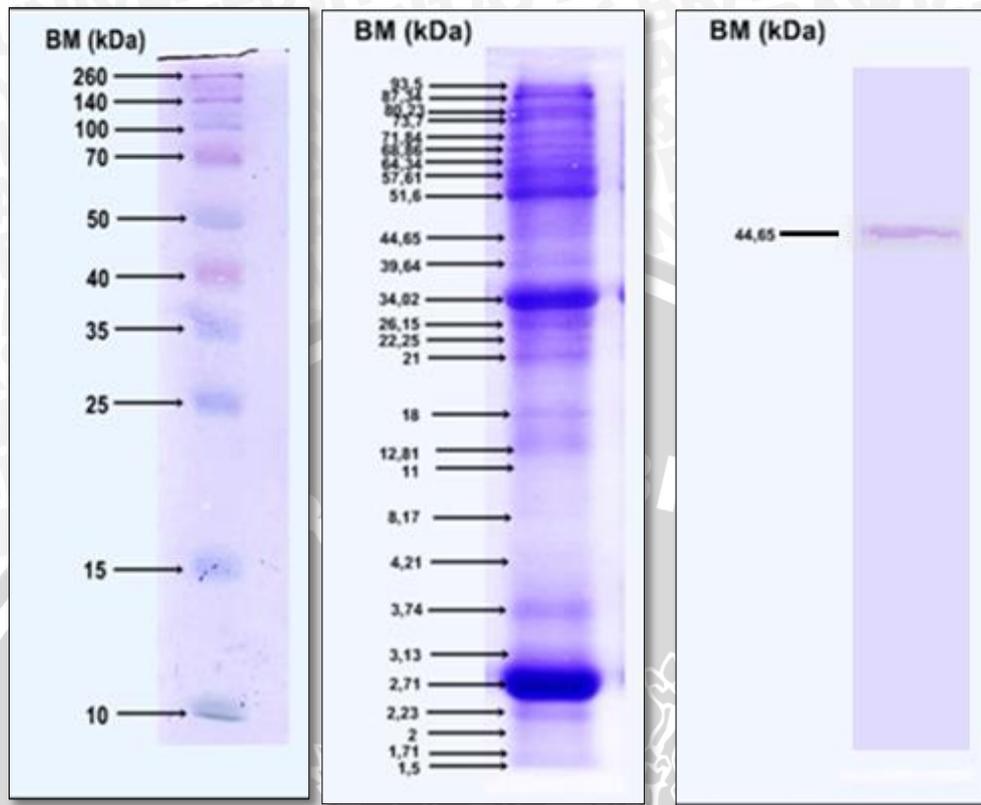
menunjukkan adanya ekspresi MHC I pada tubuh ikan. Judarwanto (2012), mengatakan bahwa protein MHC I mampu diekspresikan pada semua permukaan sel yang berinti. Protein ini memiliki fungsi untuk mempresentasikan antigen peptida ke sel T yang secara langsung akan menghancurkan sel yang mengandung antigen asing. Pada organ insang ikan kontrol, MHC I terekspresi pada 44,22 kDa dengan munculnya pita protein yang tebal.

Munculnya BM pada insang ikan kontrol sebesar 44,22 kDa ini menunjukkan bahwa adanya ekspresi protein MHC I secara alamiah dari dalam tubuh ikan Kerapu Tikus, khususnya pada organ insang. Dimana setiap permukaan sel yang memiliki inti, sudah secara *innate* memiliki protein MHC. Ikan yang digunakan adalah ikan kontrol atau tidak ditambahkan dengan agen virus asing, maka BM yang muncul hanya pada kisaran rantai alfa. Jika ikan ditambahkan dengan agen virus yang konsentrasinya tinggi, maka kemungkinan protein MHC I ini akan melemah atau nilainya akan menurun karena didalam tubuh ikan tidak mempunyai sumber imunostimulan. Namun jika konsentrasi agen virus yang diberikan sedikit dan dibawah konsentrasi antibodi dalam tubuh ikan, maka virus akan dapat dimatikan dengan baik dan sel memory akan menyimpan kode virus tersebut. Hal ini berguna jika pada suatu saat nanti virus yang sama menyerang ikan Kerapu Tikus ini, maka virus akan dimatikan atau dimusnahkan dengan kecepatan atau kemampuan lebih cepat dari awalnya.

Ketika patogen akan masuk kedalam tubuh, maka tubuh akan bereaksi ditunjukkan dengan sel APC yang menginduksi sel T CD 8⁺ terhadap antigen mikroba intraseluler. Pandey (2007), menyebutkan bahwa MHC-I merupakan suatu heterodimer yang diekspresikan pada permukaan sebagian besar sel yang memiliki inti, terdiri dari sebuah rantai alfa (berat molekul 45 kDa) dan sebuah rantai beta (12 kDa) disebut juga sebagai β_2 -mikrogobulin, sedangkan Ribic (2012), menyebutkan bahwa MHC I mempunyai rantai alfa dengan BM antara

42-48 kDa dan sebuah rantai beta dengan BM 11-13 kDa. Protein MHC kelas I mampu diekspresikan pada semua permukaan sel yang berinti, protein ini bertugas mempresentasikan antigen peptida ke sel-T sitotoksik (Tc) yang secara langsung akan menghancurkan sel yang mengandung antigen asing tersebut.

Insang Kerapu Tikus yang diberikan perlakuan dengan penambahan PCP secara berkala, mempunyai hasil pita protein MHC I yang sedikit berbeda dengan hasil insang ikan kontrol yang diamati dengan menggunakan SDS-PAGE. Pita atau rantai protein yang muncul adalah sebesar 44,65 kDa. Nilai ini ditunjukkan dengan rantai tipis pada pengamatan SDS-PAGE. Ikan yang ditambahkan dengan PCP akan memicu produksi antibodi yang berlebih karena PCP yang masuk kedalam tubuh akan mengaktifkan makrofag dengan komplemen dan lysosennya. Komplemen tersebut terdiri atas sejumlah besar protein yang bila diaktifkan akan memberikan proteksi terhadap infeksi dan berperan dalam respon inflamasi. Makrofag yang telah diaktifkan oleh PCP akan mengaktifkan interleukin untuk mengkode sel B memproduksi antibodi. Ketika sel B terbentuk maka dengan otomatis anti bodi akan meningkat dan jika ada benda asing yang masuk kedalam tubuh dengan konsentrasi dibawahnya akan dibunuh atau dimusnahkan. Hasil SDS-PAGE pada insang ikan perlakuan PCP dapat dilihat pada Gambar 16.



A **B** **C**
Gambar 16. Hasil SDS-PAGE. **A:** *Low Range Marker PRO-STAIN™*. **B:** Insang Ikan Perlakuan. **C:** Spesifikasi dengan menggunakan WB. (Laporan Penelitian Unggulan PT-BOPTN 2013-2014 Oleh Yanuhar).

Insang ikan Kerapu Tikus yang diberikan perlakuan dengan penambahan PCP yang berasal dari *N. oculata* mempunyai pita protein tipis atau dapat dikatakan bahwa kemunculan MHC I tidak begitu banyak, yaitu pada 44,65 kDa. Pemberian PCP kedalam tubuh ikan bertujuan untuk meningkatkan sistem kekebalan atau sistem imun ikan. Pemberian PCP secara oral diharapkan mampu lebih cepat diserap oleh tubuh sebagai bahan hayati imunostimulan untuk meningkatkan antibodi didalam tubuh. Junita (2002), mengevaluasi pengaruh alga terhadap peningkatan respon kekebalan ikan patin. Ikan patin yang telah diberikan PCP dapat berfungsi sebagai antigen permukaan yang mampu menstimulan respon kekebalan fisik dan non spesifik pada organisme vertebrata.

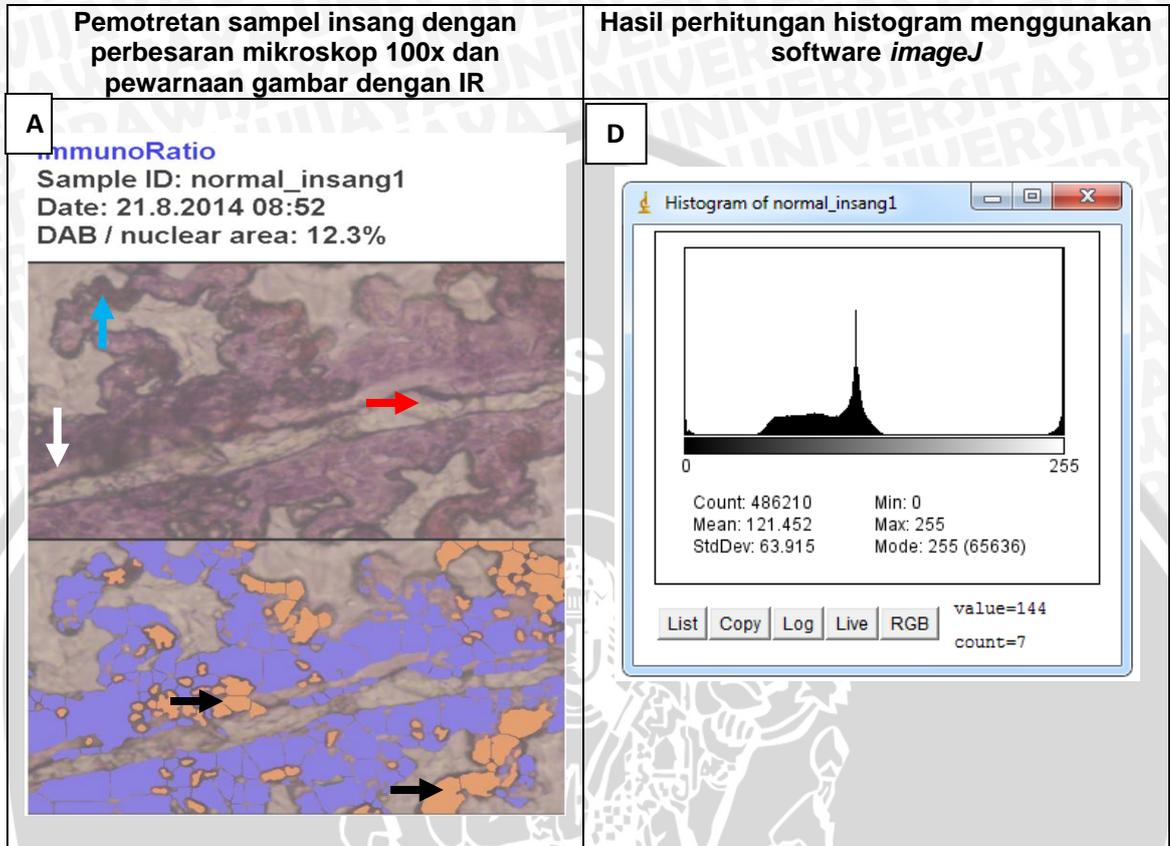
Insang ikan Kerapu Tikus yang telah ditambahkan PCP merupakan ikan yang telah diberikan sistem pertahanan *adaptive*. Jika MHC I yang sebenarnya sudah ada dan dimiliki oleh tubuh ikan, dengan penambahan PCP ikan harus lebih cepat dalam mempresentasikan jika ada patogen yang masuk. Patogen terdiri dari bakteri, virus, parasit dan jamur (*fungi*). Yanuhar (2014), mengatakan bahwa ikan yang sudah diberikan PCP atau pertahanan tubuh secara *adaptive* mempunyai proteksi jangka panjang terhadap patogen, sel yang berperan adalah sel B dan T, serta dapat mengenali patogen secara spesifik sehingga dalam memerangi benda asing yang masuk kedalam tubuh tidak akan salah dan akan menyimpannya kedalam sel memory.

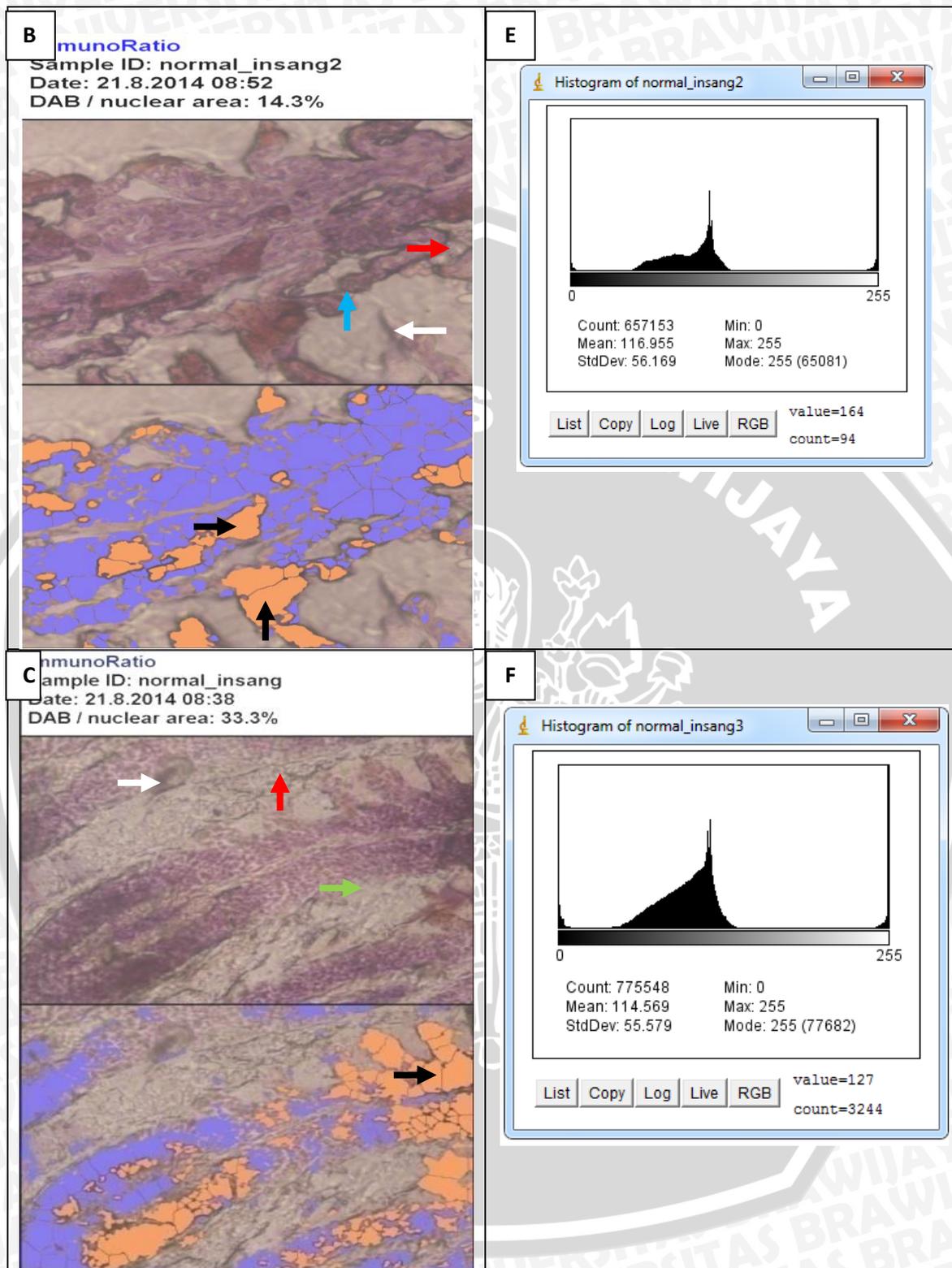
4.6 Hasil Uji Imunohistokimia PCP *N. oculata* terhadap organ Insang ikan Kerapu Tikus

Uji IHC merupakan teknik penentuan keberadaan (lokasi) antigen (protein target) dalam jaringan atau sel makhluk hidup dengan menggunakan reaksi antigen dan antibodi. Dijelaskan lebih lanjut oleh Hasdianah. *et al.* (2014), IHC digunakan untuk mendeteksi keberadaan antigen spesifik didalam suatu sel jaringan dengan menggunakan prinsip pengikatan antara antibodi dan antigen pada jaringan hidup. IHC sendiri berasal dari kata *immune* yang berarti melindungi dan *histo* yang berarti menunjukkan jaringan secara mikroskopis. Dalam penelitian ini menggunakan metode IHC langsung, atau disebut *direct method* yang menggunakan satu jenis antibodi terlabel yang berfungsi untuk mengenali antigen yang diidentifikasi pada jaringan, antibodi yang digunakan adalah antibodi anti MHC I.

Tahap analisa data yang digunakan dalam IHC, mengacu pada tehnik yang digunakan oleh Ramadhani, *et al.* (2012), yaitu menggunakan *ImmunoRatio* (IR). IR digunakan secara bebas secara *on line* maupun *off line* untuk menganalisis citra digital hasil pewarnaan IHC. Berikut merupakan hasil IHC

pada insang Kerapu Tikus kontrol atau normal dengan menggunakan IR dapat dilihat pada Gambar 17:

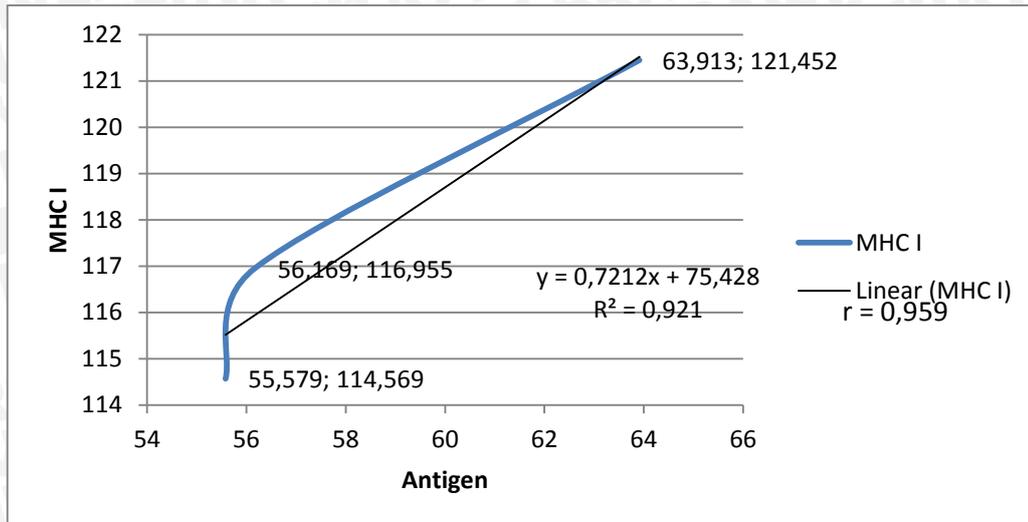




Gambar 17. Pemotretan sampel insang ikan kontrol dengan perbesaran mikroskop 100x. Fusi (panah biru), Hiperplasia (panah putih), Edema (panah merah) hilangnya struktur lamella (panah hijau). Warna cokelat menunjukkan keberadaan protein target (panah hitam) dengan menggunakan IR.

Dari ketiga gambar yang diperoleh dari pemotretan insang ikan kontrol didapatkan hasil munculnya protein target sedikit. Bukan berarti insang ikan kontrol yang digunakan tidak mempunyai protein MHC, mengingat protein MHC tersebut terletak dipermukaan sel. Sel-sel yang terdapat pada insang diantaranya adalah sel granulasit dan sel leukosit yang berperan menghasilkan sel Tc sebagai eliminasi virus dan menghasilkan sel B yang berperan dalam pembentukan antibodi. Pada insang ikan kontrol protein MHC yang ditemukan sangat sedikit. Gambar A, B dan C menunjukkan banyaknya warna ungu pada hasil IR yang didapatkan yang berarti protein target yang dicari hanya dapat muncul sedikit. Kemunculan protein target yang dapat dipresentasikan oleh antibodi sekunder anti MHC I ditunjukkan oleh tanda panah berwarna hitam pada gambar A, B dan C yang selanjutnya ditunjukkan secara kuantitatif data melalui histogram pada nilai mean yang muncul pada gambar D, E dan F.

Pada gambar A kemunculan protein target ditunjukkan oleh gambar D adalah sebesar 121,452. Begitu juga pada gambar B dan gambar C, tanda panah hitam menunjukkan banyaknya kemunculan protein target yang ditunjukkan pada gambar E yaitu sebesar 116,955 dan pada gambar C kemunculan protein ditunjukkan oleh gambar F adalah sebesar 114,560. Rata-rata kemunculan protein target pada insang ikan kontrol adalah sebesar 117,659. Pada gambar D, E dan F menunjukkan masing-masing gambar histogram dengan nilai maksimal 255. Gambar grafik tertinggi dari gambar diatas menunjukkan nilai mean yang berartinormal terlabil MHC. Lebih jelas dapat dilihat pada grafik model pada gambar 18.

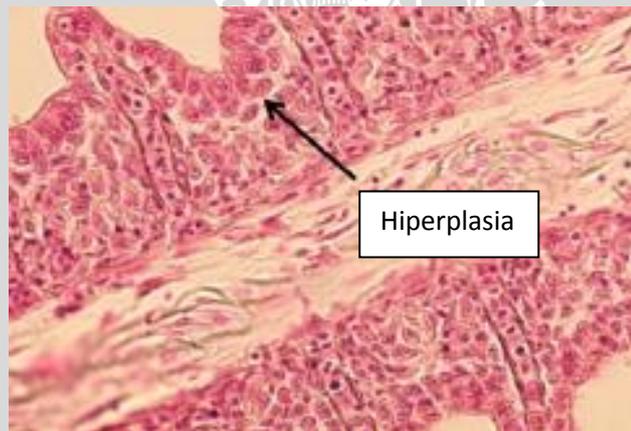


Gambar 18. Regresi ekspresi MHC I pada insang ikan kontrol dengan hasil pelabelan antibodi sekunder anti MHC I anti *groupers*

Grafik pada gambar diatas menunjukkan modelling ekspresi MHC I insang ikan kontrol. Regresi pada model diatas menunjukkan model logaritmik. Insang ikan kerapu yang tidak diberikan perlakuan bisa dikatakan mempunyai hasil negatif atau kemunculan protein target yang rendah dengan rata-rata Diaminobenzidine sebesar 19,967% yang menunjukkan protein target ditemukan sedikit pada insang kontrol. Nilai R^2 adalah determinasi yaitu nilai yang menunjukkan keterkaitan antara MHC I dengan antigen, diperoleh dari grafik diatas adalah sebesar 0,921. Nilai keragaman atau r adalah sebesar 0,959. Yang artinya faktor MHC I terekspresi karena dipengaruhi oleh antigen sebesar 95%.

Ikan yang secara kasat mata terlihat normal, dalam penglihatan secara patologi belum tentu benar. Warna putih pada gambar 17 A, B dan C merupakan perubahan bentuk pada jaringan insang yang disebut dengan hiperplasia. Hiperplasia lamela sekunder merupakan perubahan histopatologi yang paling banyak ditemukan pada insang. Kurniasih (1999) dalam Novalia, *et al.* (2013), menyebutkan bahwa hiperplasia merupakan peningkatan ukuran dari suatu organ yang disebabkan oleh peningkatan jumlah sel dari dalam organ tersebut. Hiperplasia bisa terjadi pada lamella primer yang disebabkan oleh pembelahan

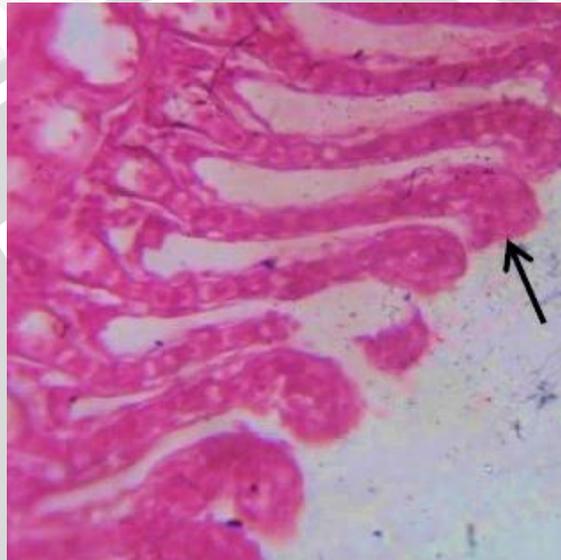
sel klorid secara berlebihan sedangkan pada lamella sekunder, hiperplasia terjadi akibat adanya pembelahan sel epitel yang tidak terkontrol oleh pengaruh kualitas air seperti efek pH air yang terlalu rendah berkaitan dengan hujan asam dan peningkatan absorpsi aluminium tanah (Robert, 2001). Pembelahan sel klorid yang terjadi secara berlebihan pada lamella primer akan menyebabkan organ insang memproduksi *mucus* (lendir) secara berlebihan. *Mucus* yang dihasilkan berperan dalam melindungi lamella primer dari kerusakan yang lebih parah, jika hal ini terjadi secara terus-menerus ikan akan mengalami gangguan pertukaran ion di epitel dan terganggunya fungsi normal sel kloride. Gambar 19 merupakan gambar histopatologi insang yang muncul hiperplasia pada lamella sekunder.



Gambar 19. Hiperplasia sel-sel epitel lamella insang (panah hitam) pada insang ikan hias air laut dengan perbesaran 1000x (Sudaryatma dan Eriawati, 2012).

Selain munculnya hiperplasia pada organ insang ikan kontrol pada penelitian ini, kemunculan edema juga ditemukan pada beberapa sampel ikan kontrol yang ditunjukkan oleh panah warna merah pada gambar 17 A, B dan C. Pazra (2008), mengatakan bahwa hiperplasia lamella sekunder berkaitan dengan edema pada lamella hipertropi. Edema adalah meningkatnya jumlah cairan dalam kopartemen jaringan intraseluler yang dapat terjadi pada jaringan ikat longgar (sub kutis) dan rongga-rongga badan (rongga perut dan didalam paru-

paru) (Underwood, 1992). Edema yang terdeteksi pada organ insang ikan kontrol dalam penelitian ini tergolong rendah karena bak penampung air yang digunakan selama proses penelitian tidak tercemar oleh bahan-bahan kimia seperti pestisida maupun logam berat. Contoh insang ikan yang terkena edema dijelaskan pada gambar 20.



Gambar 20. Edema pada jaringan insang ikan Asang (*Osteochilus hasseltii*) yang diambil di Danau Singkarak dengan perbesaran 1000 kali (Saputra, *et al.*, 2013).

Kemunculan edema pada organ insang ikan kontrol bisa terjadi akibat ekskresi ammonia dari metabolisme pakan dalam bentuk NH_3 yang berlebihan sehingga dapat mengakibatkan peningkatan permeabilitas vaskuler dan bersifat toksik bagi ikan. Pazra (2008), juga menyebutkan bahwa selain pencemaran bahan kimia, edema dapat terjadi karena aflatoxikosis nutrisi akut yang dapat menyebabkan edema hebat pada lamella. Munculnya hiperplasia dan edema pada insang akan merangsang kemunculan fusi (penyatuan) lamella insang. Fusi dapat menimbulkan kerusakan dan berkurangnya permukaan respirasi insang serta dapat mengakibatkan efisiensi difusi gas. Fusi merupakan tahap lanjut dari kerusakan insang yang ditunjukkan pada gambar 16 pada gambar A dan B yang ditunjukkan oleh panah warna biru. Pada gambar 16 terlihat bahwa lamella

sekunder mengalami penyatuan yang diindikasikan dengan munculnya hiperplasia dan edema terlebih dahulu.

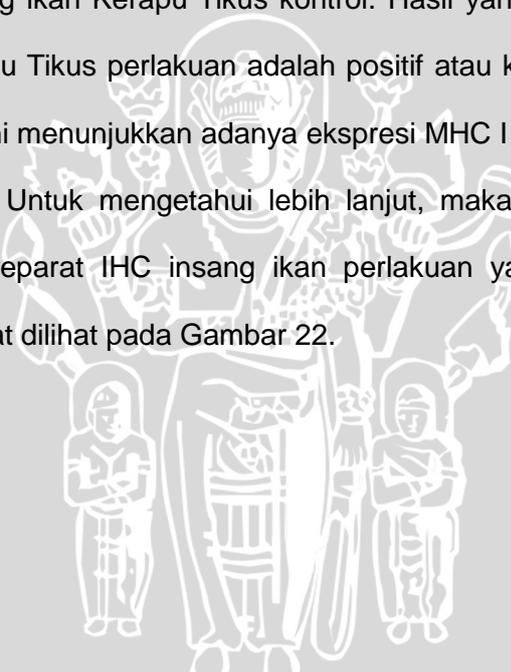
Gambar 17 C tidak terlihat adanya fusi yang muncul, namun terindikasi hilangnya struktur lamella pada lamella sekunder yang diberi tanda panah hijau. Pada gambar ini, insang ikan kontrol sudah mengalami perubahan histopatologi yang menyebabkan terganggunya kesehatan pada ikan. Perubahan struktur pada lamella merupakan tingkatan lebih lanjut dari fusi atau dapat dikatakan sudah mengalami kasus berat. Hal ini sesuai dengan pernyataan Sipahutar (2013), fusi lamella terjadi akibat peningkatan patologi hiperplasia secara terus-menerus dan menyebabkan terisinya ruang antar lamella sekunder oleh sel baru yang akhirnya memicu pelekatan pada kedua sel lamella. Fusi lamella yang muncul pada insang diakibatkan oleh hiperplasia yang dapat mengurangi efisiensi difusi gas (Hoole, *et al.* 2001). Lebih lanjut dijelaskan oleh Benli dan Ozkul (2008), bahwa fusi lamella merupakan level kerusakan berat karena fusi lamella merupakan kerusakan tahap lanjut dari kerusakan hiperplasia pada insang. Gambar 21 merupakan gambar kerusakan jaringan pada insang.



Gambar 21. Hilangnya struktur lamella pada insang (a) dan fusi (b) pada insang ikan hias air laut dengan perbesaran 1000x (Sudaryatma dan Eriawati, 2012).

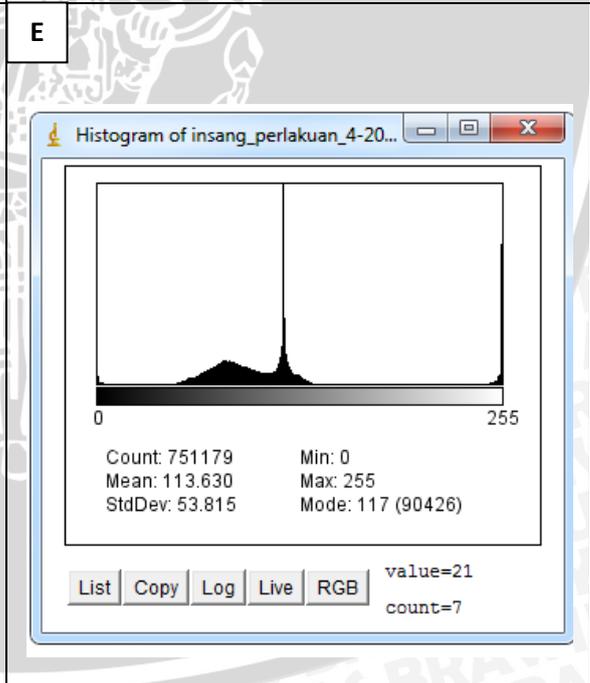
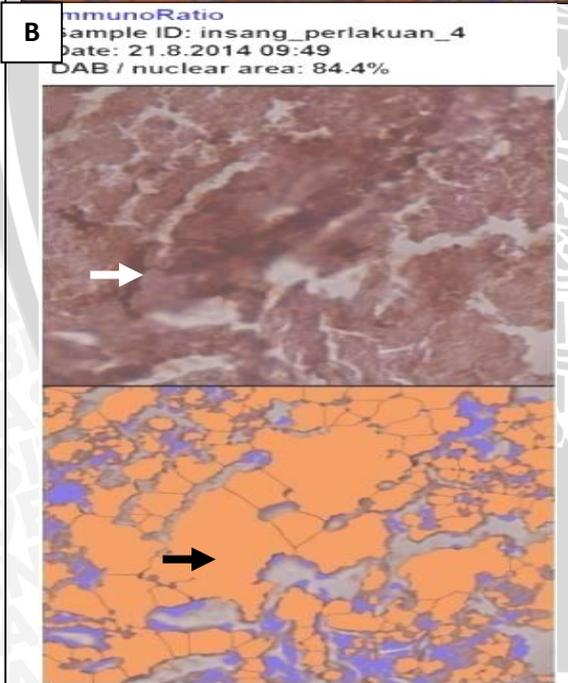
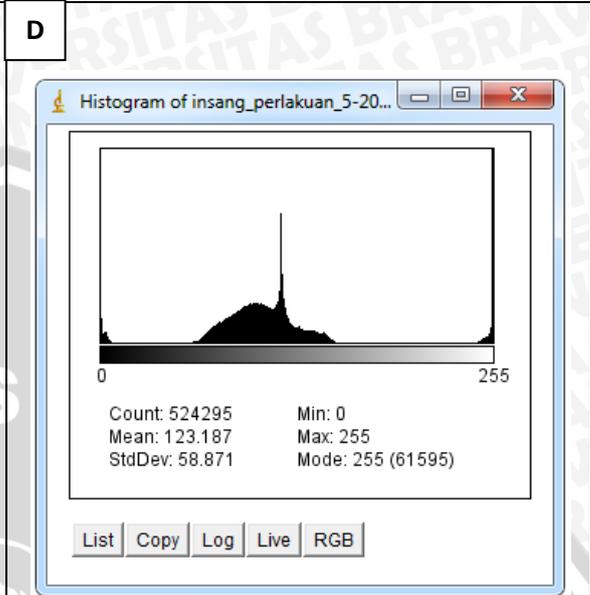
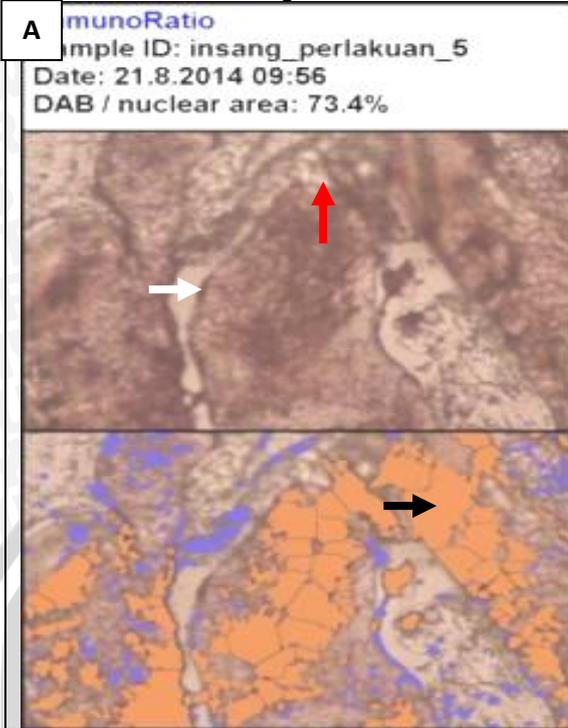
Munculnya edema, hiperplasia, fusi hingga kelainan struktur pada lamella tidak berpengaruh fatal kepada ikan yang digunakan. Adanya pergantian atau sirkulasi air yang cukup bagus pada bak yang digunakan dalam pemeliharaan ikan Kerapu Tikus. Selain itu faktor utama yang menyebabkan kelainan pada insang disebabkan oleh metabolisme sisa pakan didalam kolam yang pernah terjadi pada bak pemeliharaan. Dalam hal ini sistem imun *innate*/alamiah ikan berfungsi dengan baik, dapat melawan gangguan patologi pada ikan Kerapu Tikus dan didukung oleh alat yang baik selama masa pemeliharaan.

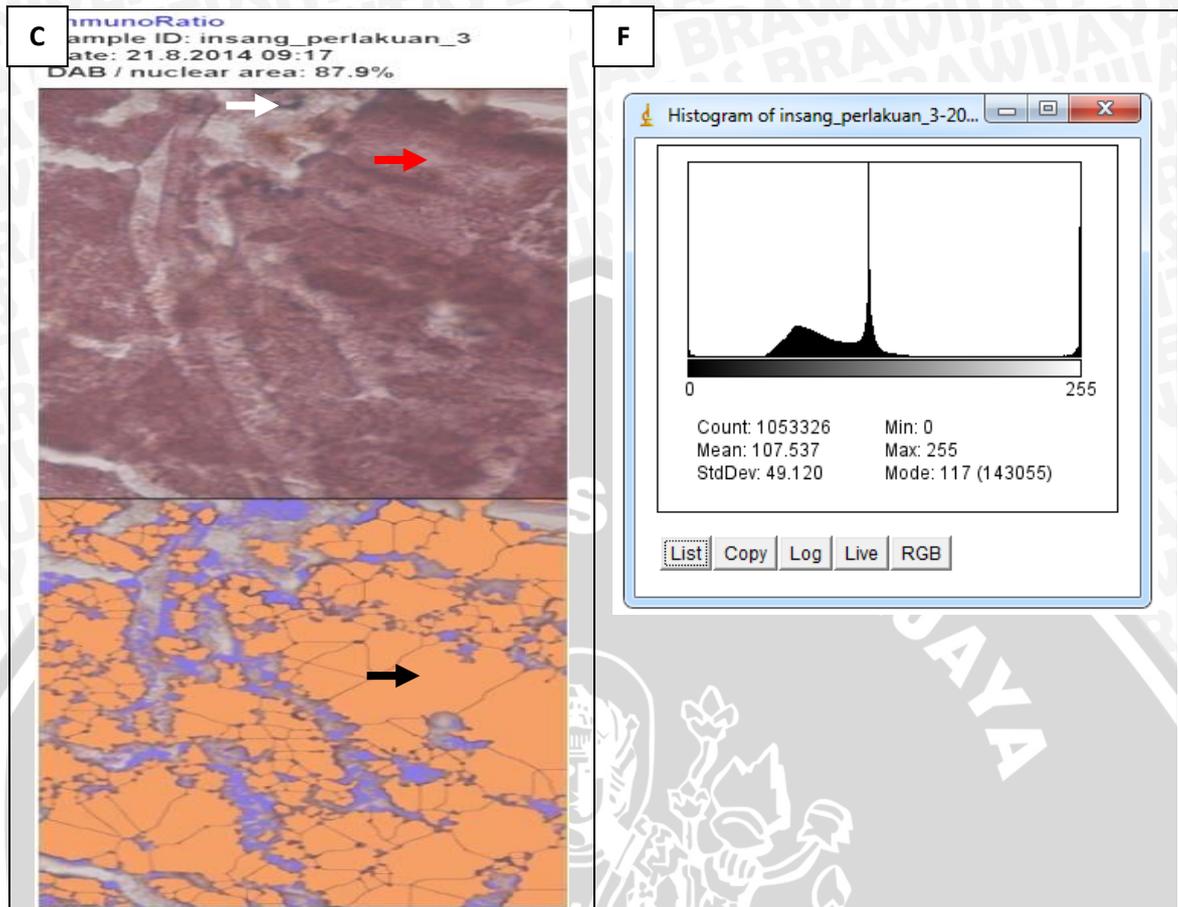
Perlakuan pada insang ikan Kerapu Tikus yang ditambahkan PCP berbeda dengan insang ikan Kerapu Tikus kontrol. Hasil yang didapatkan pada IHC insang ikan Kerapu Tikus perlakuan adalah positif atau kemunculan protein target lebih tinggi, yakni menunjukkan adanya ekspresi MHC I pada organ insang ikan yang digunakan. Untuk mengetahui lebih lanjut, maka dibawah ini akan disajikan hasil foto preparat IHC insang ikan perlakuan yang telah diwarnai menggunakan IR, dapat dilihat pada Gambar 22.



Hasil Pemotretan sampel insang dengan mikroskop dan pewarnaan gambar dengan IR

Hasil perhitungan histogram menggunakan software *imageJ*



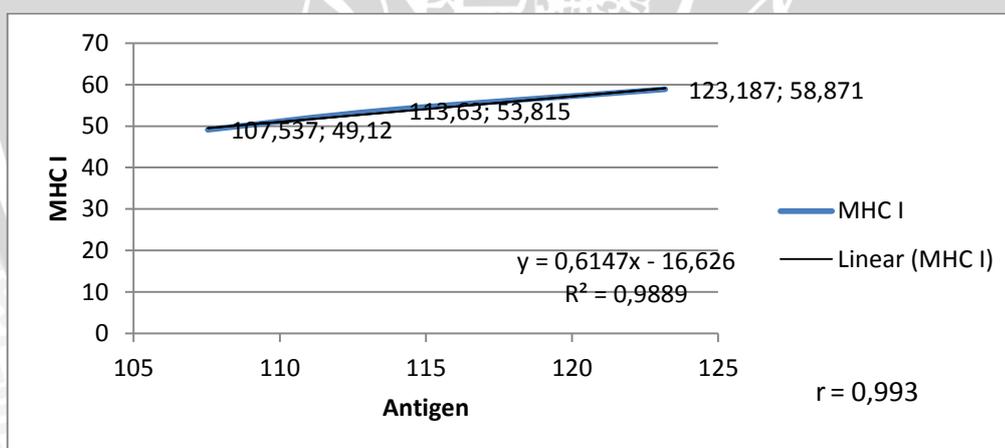


Gambar 22. Pemotretan sampel insang perlakuan dengan perbesaran mikroskop 100x. Hiperplasia (panah putih), Edema (panah merah).Warna coklat menunjukkan keberadaan protein target (panah hitam) dengan menggunakan IR.

Protein target yang diperoleh melalui metode IHC ditunjukkan dengan warna coklat yang diberi tanda panah warna hitam pada gambar 22 A, B dan C. Warna coklat mengindikasikan protein MHC I pada insang ikan perlakuan PCP, sedangkan warna ungu bukan protein target. IHC yang diamati pada insang ikan perlakuan adalah 3 buah. Normal terlabel MHC ditunjukkan pada grafik tertinggi pada gambar D, E dan F atau dapat dilihat pada nilai mean yang ditunjukkan. Histogram berguna untuk mempermudah dalam menganalisa data dengan mengubah data kualitas menjadi kuantitas menggunakan software *ImageJ*. Nilai histogram tertinggi atau yang mempunyai sensitifitas paling tinggi ditunjukkan dengan nilai mean yang tinggi pula, yaitu pada gambar D nilai mean menunjukkan 123,187.

Dengan adanya penambahan PCP pada ikan perlakuan maka diperoleh hasil yang berbeda terhadap IHC dengan ikan kontrol. Ikan perlakuan yang telah ditambahkan PCP akan memiliki antibodi yang lebih tinggi, hal ini ditunjukkan dengan hasil IR yang diperoleh adalah positif, dengan ditunjukkan banyaknya warna coklat yang terdapat pada gambar insang. Gambar B memiliki nilai sensitifitas untuk dapat menunjukkan protein target sebesar 113,630 yang dapat dilihat pada gambar E dan untuk gambar C menunjukkan kemunculan protein target sebesar 107,537. Nilai maksimal dari kemunculan protein target adalah 255.

Rata-rata kemunculan protein pada insang ikan perlakuan adalah sebesar 114,785 dimana hasil ini menunjukkan sensitifitas yang cukup tinggi. PCP yang ditambahkan pada ikan perlakuan ini digunakan sebagai agen hayati yang akan memicu timbulnya imunostimulan pada ikan Kerapu Tikus. Gambar 23 dibawah ini akan menunjukkan model ekspresi MHC I pada ikan perlakuan.



Gambar 23. Regresi ekspresi MHC I pada insang ikan perlakuan dengan hasil pelabelan antibodi sekunder anti MHC I anti *grouper*

Dari gambar 23 ditunjukkan bahwa model ekspresi MHC I pada insang ikan Kerapu Tikus dengan penambahan PCP menunjukkan keberadaan protein target. Atau grafik yang ditunjukkan adalah positif. Pada penelitian ini dibuktikan bahwa dengan penambahan PCP pada ikan Kerapu Tikus dapat meningkatkan

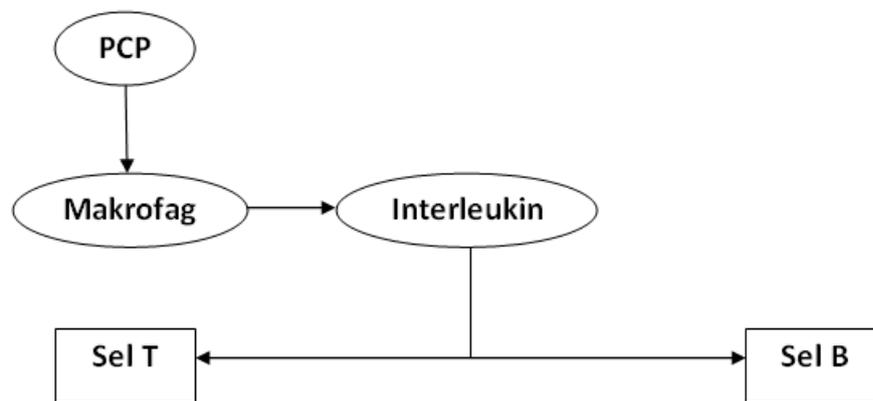
respon protein MHC I. Nilai keterkaitan atau R-square pada insang perlakuan mengalami kenaikan sebesar 0,067 yaitu sebesar 0,998. Artinya 99% terekspresinya MHC I dipengaruhi oleh adanya antigen PCP dan 1% sisanya dipengaruhi oleh faktor lainnya.

Didalam insang ikan Kerapu Tikus terdapat sel granular dan sel leukosit dimana sel-sel tersebut yang menghasilkan sel B dan sel T, selanjutnya sel akan mengaktivasi *Antigen Presenting Cell* (APC) untuk kemudian mengekspresi MHC I pada permukaan insang ikan (Yanuhar, 2014). ketika sel B terbentuk, antibodi akan meningkat dan otomatis jika ada patogen yang masuk kedalam tubuh ikan dengan konsentrasi dibawahnya akan langsung terbunuh (Fasya, 2013). Insang yang digunakan pada penelitian ini adalah semua bagian insang yang meliputi lembaran-lembaran insang (*gill filament*), *gill rakers* dan *gill arch*.

Ikan yang sudah ditambahkan dengan PCP tidak lepas dengan munculnya kelainan pada insang ikan secara histopatologi. Hal ini ditunjukkan pada gambar 19 masih terdapat beberapa gejala penyakit yang muncul seperti hiperplasia yang ditunjukkan dengan panah putih pada gambar 22 A, B dan C. Seperti yang telah disebutkan diatas pada penjelasan insang ikan kontrol, bahwa hiperplasia lamella sekunder merupakan histopatologi yang paling banyak ditemukan pada insang. Pada gambar 22 menunjukkan hiperplasia yang rusak terjadi pada lamella sekunder, yang berarti kerusakan yang terjadi tidak terlalu berat. Pazra (2008), menyebutkan hiperplasia lamella sekunder yang berat terjadi jika hampir diseluruh lamella sekunder insang mengalami penebalan, sedangkan hiperplasia lamella sekunder ringan terjadi jika sebagian lamella sekunder insang yang mengalami penebalan.

Edema juga terlihat muncul pada gambar 22 A dan C. Edema merupakan pembengkakan sel atau sering disebut hipertropi sel epitel, yaitu bertambahnya ukuran atau volume suatu bagian oleh peningkatan jumlah sel. Salah satu ciri kemunculan edema yang paling mudah untuk dilihat adalah dengan adanya cairan pada jaringan yang telah dilakukan histopatologi. Edema dapat muncul akibat pembendungan aliran darah yang disebabkan trauma fisik sirkulasi pada lamella yang akhirnya menyebabkan pembengkakan (Saputra, *et al.* 2013), sedangkan hiperplasia disebabkan oleh panas dan polusi seperti asam, amonia, logam berat dan pestisida yang menyebabkan perubahan struktur sel klorid.

Tingkat kerusakan pada insang ikan perlakuan belum sampai pada tahap fusi atau tahap berat. Hal ini dipicu oleh penambahan PCP yang diberikan pada ikan perlakuan, PCP yang diberikan secara oral dapat berpoliferasi didalam tubuh dengan baik sehingga protein yang terkandung dalam MHC dengan sistem imun akan bersama-sama bekerja untuk mengaktifkan makrofag dengan komplemennya dan lysosen. Komplemen terdiri dari sejumlah besar protein yang bila diaktifkan akan memberikan proteksi terhadap infeksi dan berperan dalam respon inflamasi. PCP yang telah mengaktifkan makrofag sebagai sistem imun *innate* akan mengaktifkan interleukin didalam tubuh yang akan memicu interleukin untuk memproduksi sel T dan sel B. Sel B akan memproduksi antibodi yang akan ditransfer kepada sel T yang akan membunuh patogen. Untuk lebih ringkasnya dapat dilihat pada gambar 24.



Gambar 24. Aktivasi PCP dalam memproduksi sel T dan sel B

Pada masa pemeliharaan, ikan terlebih dahulu diberikan PCP dalam bentuk protein sebagai imunostimulan. Harapannya ikan akan memproduksi sel B secara berlebih yang bertujuan untuk meningkatkan kekebalan tubuh ikan Kerapu Tikus. Dengan adanya antibodi yang telah diproduksi didalam tubuh ikan, ikan dapat mengeleminir patogen dengan bantuan sel Tc sehingga kemunculan kerusakan pada insang tidak terlampau parah hingga tahap fusi ataupun kerusakan struktur lamella seperti yang terjadi pada insang ikan kontrol. Sel granular dan leukosit merupakan sel yang terdapat dalam insang yang mempunyai fungsi untuk memproduksi sel Tc dan sel B didalam tubuh. Kedua sel ini sangat berfungsi dalam menahan munculnya penyakit yan lebih parah didalam organ insang.

Selain faktor penyebab terjadinya edema dan hiperplasia yang telah disebutkan diatas, berkurangnya efisiensi insang dalam menyerap oksigen dalam perairan juga dapat menimbulkan munculnya cairan diantara sel-sel insang (edema). Tanjung (1982) dalam Saputra, et al. (2013), kerusakan insang dibagi menjadi beberapa tingkatan yang berhubungan dengan toksisitas yaitu sebagai berikut. Tingkat I, terjadi edema pada lamella dan terlepasnya sel-sel epithelium dan jaringan dibawahnya; tingkat II, terjadi hiperplasia pada basal proximal

lamella sekunder; tingkat III, hiperplasia menyebabkan bersatunya dua lamella sekunder; tingkat IV, hampir seluruh lamella sekunder mengalami hiperplasia; dan tingkat V, hilangnya struktur lamella sekunder dan rusaknya filamen.

4.7 Data kualitas air

Air sebagai media media hidup ikan baik secara internal maupun eksternal. Sebagai media internal, air berfungsi sebagai bahan baku reaksi, mengangkut bahan makanan untuk diedarkan keseluruh tubuh, mengangkut sisa-sisa metabolisme dan sebagai pengatur penyeimbang tubuh. Sementara sebagai media eksternal air berfungsi sebagai habitat. Oleh karenanya peran air bagi biota sangat penting agar biota terhindar dari stress, tidak mudah terserang penyakit dan dapat tumbuh dengan baik (Kordi dan Andi, 2007).

A. Parameter Fisika Air

1. Suhu

Suhu tergolong dalam parameter fisika yang mempengaruhi kehidupan organisme dan kualitas perairan. Tingginya suhu perairan berhubungan dengan besarnya intensitas cahaya yang masuk kedalam badan air. Cahaya yang masuk tersebut akan menentukan derajat panas. Semakin banyak sinar matahari yang masuk kedalam badan air, akan menyebabkan tingginya suhu pada perairan. Sebaliknya jika peningkatan kedalaman dalam perairan terjadi, maka akan menyebabkan rendahnya suhu perairan (Nurhaidah, 2013). Secara umum, laju pertumbuhan akan meningkat seiring dengan kenaikan suhu, tetapi kenaikan suhu yang terlalu ekstrem akan menyebabkan kematian.

Hasil pengukuran suhu yang diperoleh dari penelitian pada kolam ikan Kerapu Tikus kontrol dan pada kolam ikan Kerapu Tikus yang telah diberi perlakuan PCP cenderung konstan dan tidak mengalami perubahan yang begitu besar, dapat dilihat pada Tabel 9.

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

Tanggal	Kolam Kontrol		Kolam perlakuan PCP	
	Waktu pengamatan			
	Pagi	Sore	Pagi	Sore
26-Apr	29,7	30	29,7	30
27-Apr	29	30	29	30
28-Apr	29	30	29	30
29-Apr	29	30	29	30
30-Apr	29	30	29	30
01-Mei	29	30	29	30
02-Mei	29	30	29	30
03-Mei	29	30	29	30
Rata-Rata	29,08	30	29,08	30

(Sumber: Laporan Penelitian Unggulan PT-BOPTN 2013-2014 Oleh Yanuhar)

Hasil rata-rata suhu pada pagi hari pada kolam ikan kontrol adalah $29,08^{\circ}\text{C}$ dan pada kolam ikan perlakuan PCP adalah $29,08^{\circ}\text{C}$. Pengamatan yang dilakukan pada pagi hari berkisar antara pukul 08.00 WIB. Tingginya pengaruh suhu disebabkan karena besar kecilnya cahaya matahari yang masuk kedalam badan air. Sering kali suhu disebut sebagai pengendali ekosistem perairan, karena dapat mempengaruhi kekentalan air yang akan mempengaruhi konsentrasi oksigen terlarut dan konsumsi oksigen terlarut. Perubahan suhu yang drastis dapat mematikan biota air akibat perubahan daya angkut darah.

Pada sore hari, pengamatan dilakukan pada pukul 15.00 WIB dimana nilai rata-rata suhu yang diperoleh adalah 30°C . Peningkatan suhu yang terjadi pada sore hari pada kedua kolam disebabkan karena cahaya matahari yang masuk ke perairan akan mengalami penyerapan dan perubahan menjadi energi panas. Proses ini berlangsung secara intensif pada lapisan atas, sehingga lapisan atas pada perairan memiliki suhu yang lebih tinggi dibandingkan dengan lapisan dibawahnya (Effendi, 2003).

Air yang digunakan sebagai media hidup ikan kerapu Tikus berasal dari air laut yang telah ditandon dan filter terlebih dahulu pada bak penampung yang kemudian disalurkan atau dialirkan pada tiap-tiap kolam penelitian. Air yang masuk pada kolam penelitian tidak akan menetap pada kolam terlalu lama, karena air akan langsung dibuang ke laut kembali. Pada prinsipnya, air yang digunakan akan terus berputar sehingga nilai suhu yang diperoleh tidak akan jauh berbeda. Hal ini dimaksudnya untuk menjaga kualitas air dalam kolam untuk meminimalkan pertumbuhan patogen sehingga ikan dapat hidup dan tumbuh secara optimal. Kordi (2010), suhu yang digunakan dalam pemeliharaan ikan haruslah mempunyai nilai yang konstan. Perubahan suhu yang tinggi dalam perairan akan mempengaruhi proses metabolisme aktivitas tubuh dan syaraf kecil.

Kordi (2009), menyebutkan pertumbuhan ikan pada wilayah tropis akan berlangsung optimal pada kisaran suhu 28°C - 32°C, sedangkan perairan yang memiliki suhu 18°C - 25°C akan dapat mempengaruhi nafsu makan ikan. Amiruddin. *et al*, (2012), ikan kerapu pada habitat aslinya ditemukan pada daerah terumbu karang, di perairan-perairan dangkal hingga 100 meter dibawah permukaan laut. Ikan kerapu muda hidup pada kedalaman 0,5 hingga 3 meter dengan suhu 27°C sampai 29°C. Hal ini sesuai dengan hasil yang didapatkan dalam penelitian dimana suhu yang diperoleh adalah termasuk kedalam range pertumbuhan ikan kerapu Tikus.

2. Salinitas

Salinitas menggambarkan padatan total di dalam air setelah semua bahan karbonat dikonversikan menjadi oksida, bromida yang telah dikonversikan menjadi iodida dan digantikan dengan klorida dan semua bahan organik yang telah dioksidasi. Salinitas dinyatakan dalam satuan g/kg atau promil (‰) (Kordi,

2009). Salinitas berpengaruh dalam reproduksi, distribusi dan osmoregulasi (Agus, 2008). Hasil pengukuran salinitas dari penelitian adalah berkisar antara 38‰ hingga 30‰. Pada pagi hari, nilai salinitas yang didapatkan pada masing-masing kolam ikan kontrol dan ikan yang telah diberikan perlakuan crude protein memiliki nilai yang sama yaitu 30‰. Berbeda pada hasil yang diperoleh pada sore hari, yang memiliki fluktuasi yang tidak begitu jauh hanya mengalami 1-2‰. Hasil pengukuran salinitas dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Hasil pengukuran salinitas (‰) pada kolam ikan Kerapu Tikus

Tanggal	Kolam Kontrol		Kolam perlakuan PCP	
	Waktu pengamatan			
	Pagi	Sore	Pagi	Sore
26-Apr	30	28	30	28
27-Apr	30	29	30	29
28-Apr	30	30	30	30
29-Apr	30	29	30	29
30-Apr	30	28	30	28
01-Mei	30	30	30	30
02-Mei	30	30	30	30
03-Mei	30	30	30	30
Rata-rata	30	29,25	30	29,25

(Sumber: Laporan Penelitian Unggulan PT-BOPTN 2013-2014 Oleh Yanuhar)

Rata-rata hasil dari nilai salinitas yang diperoleh pada pagi hari adalah 30‰ baik pada kolam ikan kontrol maupun pada kolam ikan perlakuan. Pada sore hari, nilai salinitas menurun namun tidak terlalu besar pada kedua kolam diperoleh nilai salinitas sebesar 29,25‰. Effendi (2003), nilai salinitas yang digunakan untuk habitat hidup ikan pada perairan payau berkisar antara 0,5‰ sampai 30‰. Sedangkan Amiruddin, *et al.*, (2012), menyatakan bahwa kisaran salinitas yang baik untuk pertumbuhan ikan Kerapu Tikus adalah 30‰ sampai 33‰. Hasil yang didapatkan dari penelitian sudah baik sebagai habitat ikan kerapu Tikus.

Sinar matahari dan kondisi cuaca menjadi pengaruh yang sangat besar terhadap nilai salinitas. Pada saat pengamatan, cuaca cerah yang menyebabkan nilai salinitas tinggi. Semakin banyak sinar matahari yang masuk akan menyebabkan suhu perairan menjadi meningkat dan perairan akan menguap atau yang disebut dengan evaporasi. Evaporasi ini menyebabkan kadar garam atau salinitas menjadi meningkat. Pada sore hari intensitas sinar matahari cenderung menurun dan menyebabkan salinitas juga turun. Selain itu perubahan salinitas terjadi karena pengaruh curah hujan dan oksigen terlarut. Perubahan salinitas ini tidak begitu mempengaruhi kehidupan ikan Kerapu Tikus karena air dalam kolam akan terus dimasukkan dari dalam tandon dan akan langsung dibuang kelaut lagi. sehingga kelarutan gas-gas ataupun ion-ion tidak akan berpengaruh jauh terhadap pertumbuhan ikan.

Ukuran ikan juga berpengaruh terhadap kelangsungan hidup ikan yang memiliki nilai salinitas yang cenderung berubah-ubah. Menurut Suryanti dan Ismail (1993) dalam Kordi dan Andi (2007), bahwa semakin besar ukuran ikan pada saat adaptasi makan akan semakin tinggi resiko ikan tersebut mati atau dapat dikatakan bahwa semakin besar ukuran ikan maka ikan tersebut akan lebih sensitif jika dibandingkan dengan ikan yang memiliki ukuran lebih kecil. Ikan yang lebih kecil akan lebih mudah beradaptasi pada lingkungan barunya sehingga akan lebih bisa bertahan.

B. Parameter Kimia Air

1. pH

Derajat keasaman atau pH air menunjukkan aktivitas ion hidrogen dalam larutan tersebut dan dinyatakan sebagai konsentrasi ion hidrogen (dalam mol per liter). pH air mempengaruhi tingkat kesuburan perairan karena mempengaruhi kehidupan jasad renik. Perairan dengan pH rendah akan menyebabkan kelarutan

oksigen juga ikut rendah yang akan mengakibatkan aktivitas pernafasan akan naik dan akan menyebabkan nafsu makan pada ikan akan berkurang (Kordi dan Andi, 2007).

Dari hasil pengukuran pH pada kolam ikan kontrol dan ikan perlakuan yang diberikan *crude protein* memiliki nilai pH yang sama atau tidak mengalami perubahan, baik pada pagi maupun pada sore hari di masing-masing kolam. Hasil yang didapatkan dapat dilihat pada tabel 11.

Tabel 11. Hasil pengukuran pH pada kolam ikan Kerapu Tikus

Tanggal	Kolam Kontrol		Kolam perlakuan PCP	
	Waktu pengamatan			
	Pagi	Sore	Pagi	Sore
26-Apr	8	8	8	8
27-Apr	8	8	8	8
28-Apr	8	8	8	8
29-Apr	8	8	8	8
30-Apr	8	8	8	8
01-Mei	8	8	8	8
02-Mei	8	8	8	8
03-Mei	8	8	8	8
Rata-rata	8	8	8	8

(Sumber: Laporan Penelitian Unggulan PT-BOPTN 2013-2014 Oleh Yanuhar)

Rata-rata nilai pH yang didapatkan pada masing-masing kolam ikan kontrol dan ikan perlakuan baik pada pagi maupun sore hari menunjukkan nilai yang konstan, yaitu 8. Nilai pH yang diperoleh sudah memenuhi standar baku kualitas air dalam budidaya. Kordi dan Andi (2007), menyatakan bahwa untuk menunjang pertumbuhan ikan, pH yang optimal adalah 6,5-9,0. Bila nilai pH lebih atau kurang dari nilai 6,5-9,0 maka akan menyebabkan gangguan klinis pada ikan. Selain karena dapat memunculkan beberapa jenis penyakit, pH yang kurang baik akan mempengaruhi aktivitas biologi ikan. Effendi (2003), sebagian besar ikan menyukai pH yang berkisar antara 7-8,5. pH sangat mempengaruhi proses biokomawi perairan, misalnya proses nitrifikasi akan terhambat atau

berakhir jika pH dalam perairan menurun nilainya. Nilai pH yang didapatkan dalam penelitian adalah optimal untuk pertumbuhan ikan.

Pemberian pakan secara *adlibitum* adalah cara yang tepat untuk menghindari fluktuasi nilai pH pada perairan. Sisa pakan yang mengendap pada perairan akan menyebabkan nilai pH berubah menjadi asam dan dapat mengganggu pertumbuhan ikan Kerapu Tikus, selain itu hal ini dapat mempengaruhi kerusakan insang secara histopatologi yang akan memunculkan berbagai kerusakan seperti edema, hiperplasia dan fusi. Dengan adanya pergantian air yang dilakukan secara terus-menerus akan dapat menunjang pertumbuhan ikan lebih baik.

2. Oksigen Terlarut/ Disolved Oxygen (DO)

Kadar oksigen terlarut berfluktuasi secara harian dan musiman, tergantung pada pencampuran dan pergerakan massa air, aktivitas fotosintesis dan respirasi yang masuk kedalam badan air (Effendi, 2003). Kordi dan Andi (2007), menyatakan bahwa oksigen sebagai faktor pembatas. Jika ketersediaan oksigen dalam perairan tidak mencukupi maka akan mempengaruhi aktivitas dalam perairan tersebut. Oksigen digunakan oleh biota perairan sebagai bahan bakar atau sebagai suplai makanan yang menyebabkan ikan mampu berenang dengan baik, menunjang pertumbuhan dan aktivitas lainnya.

Upaya untuk meminimalisir munculnya patogen ataupun penyakit dari sisa metabolisme yang mengendap didasar perairan, maka penambahan aerasi sangat diperlukan untuk pengadukan massa air. Pengadukan secara alamiah dapat terjadi dengan bantuan arus ataupun angin. Pada kolam yang digunakan dalam penelitian, massa air sudah mengalami pengadukan dengan adanya mesin blower dan pergantian massa air didalam kolam yang begitu cepat. Hal ini tentunya untuk menjaga kelarutan oksigen didalam air dan mencegah munculnya

patogen, yang utamanya diakibatkan oleh sisa metabolisme biota air. Hasil pengukuran oksigen terlarut dalam kolam kontrol dan kolam perlakuan dapat dilihat pada Tabel 12.

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

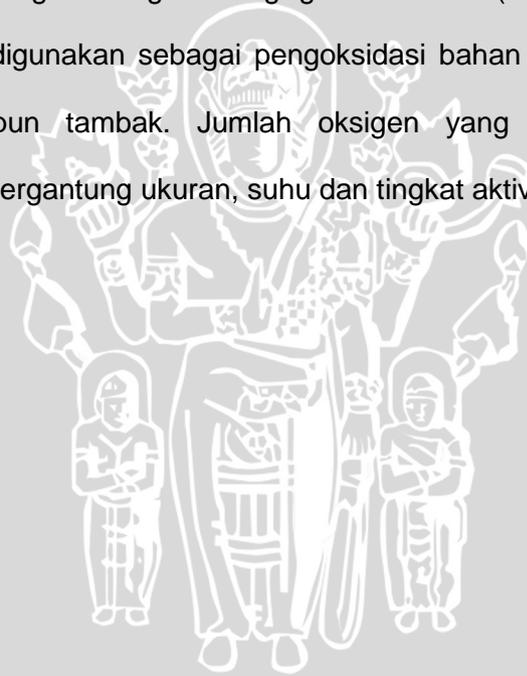
Tanggal	Kolam Kontrol		Kolam perlakuan PCP	
	Waktu pengamatan			
	Pagi	Sore	Pagi	Sore
26-Apr	5,98	5,86	5,98	5,86
27-Apr	6,04	5,92	6,04	5,92
28-Apr	5,96	5,84	5,96	5,84
29-Apr	5,96	5,84	5,96	5,84
30-Apr	6,06	5,84	6,06	5,84
01-Mei	5,96	5,9	5,96	5,9
02-Mei	6	5,84	6	5,84
03-Mei	5,96	5,98	5,96	5,98
Rata-rata	5,99	5,87	5,99	5,87

(Sumber: Laporan Penelitian Unggulan PT-BOPTN 2013-2014 Oleh Yanuhar)

Pada tabel 12 menunjukkan hasil pengukuran oksigen terlarut selama 6 hari yang didapatkan kisaran 5,84 mg/l sampai 6,06 mg/l. Rata-rata nilai oksigen terlarut pada pagi hari adalah 5,99 mg/l baik kolam ikan kontrol maupun kolam perlakuan adalah sama. Sore hari diperoleh rata-rata nilai oksigen terlarut sebesar 5,87mg/l. Dari hasil pengukuran oksigen terlarut kedua kolam menunjukkan bahwa pada pagi hari, oksigen terlarut dalam perairan dominan mempunyai nilai yang lebih besar dibandingkan dengan yang sore hari. Penurunan oksigen dipengaruhi oleh nilai suhu yang lebih tinggi daripada pagi hari. Suhu yang meningkat pada sore hari mempengaruhi nilai kelarutan oksigen dalam perairan. Apridayanti (2005), menyatakan ikan Kerapu Tikus dapat hidup dengan baik pada konsentrasi oksigen lebih dari 5ppm.

Hasil yang diperoleh pada pengukuran oksigen terlarut cukup tinggi yaitu lebih dari 5 ppm, namun ikan Kerapu Tikus dapat hidup dengan baik pada *range* kadar oksigen terlarut demikian. Ukuran ikan yang tergolong dalam usia larva

juga ikut mempengaruhi kecukupan oksigen yang digunakan untuk bernafas. Ikan yang berusia lebih muda akan lebih sering bergerak atau berenang aktif didalam perairan jika dibandingkan dengan ikan yang telah dewasa. Ikan dewasa akan lebih diam pada sudut kolam sehingga tidak begitu membutuhkan oksigen yang telampau banyak. Pada usia larva, ikan membutuhkan oksigen lebih banyak per unit tubuhnya yang digunakan untuk pergerakannya yang agresif tersebut, namun jika membendingkan dengan usia, ikan larva akan membutuhkan oksigen per unit tubuhnya, tetapi jika dilihat dari siklus reproduksinya ikan dewasa juga membutuhkan oksigen lebih banyak terutama pada ikan dewasa yang sedang matang gonad. Kordi (2003), mengatakan bahwa oksigen juga digunakan sebagai pengoksidasi bahan organik yang ada didasar kolam ataupun tambak. Jumlah oksigen yang diperlukan untuk pernapasan biota air bergantung ukuran, suhu dan tingkat aktivitasnya.



5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini bahwa Protein MHC I pada insang kontrol mempunyai BM 44,22 kDa dan insang perlakuan diperoleh BM 44,65 kDa. Insang ikan kontrol kurang mampu mengekspresikan MHC I dengan pemeriksaan antibodi anti MHC I anti grouper memiliki daya tahan tubuh yang rendah sehingga memicu kemunculan beberapa kerusakan jaringan seperti edema, hiperplasia, fusi dan perubahan struktur lamella pada insang ikan kontrol.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan adalah perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai rekombinan PCP sebagai bahan hayati yang dapat mempengaruhi sistem imun ikan Kerapu Tikus. Perlu adanya rekayasa MHC I pada ikan yang lain, untuk manajemen pengembangan kesehatan ikan.

DAFTAR ISTILAH

Ajuvan	Bahan yang berbeda dari antigen, meningkatkan respon sel T melalui aktivasi dan pengumpulan leukosit lain yang disebut sel asesori, ditempat terpajan dengan antigen.
Antibodi	Molekul yang terbentuk dalam tubuh hewan dan manusia sebagai tanggapan terhadap adanya antigen.
Antigen	Substansi yang biasanya berupa protein yang mampu menstimulasi organisme untuk memproduksi antibodi dan mampu berkombinasi sehingga diproduksi antibodi.
Antiviral	Anti virus
Apoptosis	Kematian sel secara terprogram
Badan sel	Bagian dari neuron yang merupakan pusat metabolik dan genetik dari semua sel saraf dan juga peka terhadap rangsangan serta menjadi tempat sintesis neurotransmitter
Cluster of Differentiation (CD)	Molekul permukaan sel yang diekspresikan pada berbagai jenis sel sistem imun yang ditunjukkan dengan penomoran Cluster of Differentiation (CD)
Elektroforesis	Teknik pemisahan molekul selular berdasarkan ukurannya, dengan menggunakan medan listrik yang dialirkan pada medium yang mengandung sample yang akan dipisahkan
Fagositosis	Proses penghancuran antigen oleh sel makrofag (sel fagosit) atau penelanan bakteri dan partikel asing lain oleh sel fagosit
Gen	Terdiri dari DNA, unit dasar informasi yang diturunkan dalam sel
Hapten	Bahan kimia kecil yang diikat antibodi, tetapi harus diikat oleh makromolekul sebagai pembawa untuk merangsang respons imun spesifik
Hermaprodit protogini	Pada perkembangan mencapai dewasa (matang gonad) berjenis kelamin betina dan akan berubah menjadi jantan apabila ikan tersebut tumbuh menjadi lebih besar atau bertambahnya umur
HLA	Molekul didalam makrofag yang mengikat peptida antigen, dikontrol oleh gen dalam kromosom 6, dapat meningkatkan respons imun tertentu dan inflamasi
Imun	Reaksi yang dikoordinasi sel-sel, molekul-molekul dan bahan lainnya terhadap mikroba
Imunogen	Setiap bahan yang dapat memacu respons imun. semua imunogen adalah antigen tetapi tidak semua antigen adalah imunogen
Infeksi	Pengenalan agen infeksi seperti virus atau bakteri ke dalam host sel atau organisme.
Inflamasi	Kompleks reaksi sistem imun nonspesifik di jaringan berpembuluh darah yang melibatkan akumulasi dan aktivasi leukosit dan protein plasma ditempat infeksi, pajanan dengan toksin atau kerusakan sel.
Komplemen	Terdiri atas sejumlah besar protein yang bila diaktifkan akan memberikan proteksi terhadap infeksi dan berperan dalam

	respon inflamasi
Konjugat	Molekul protein seperti fluorescein atau enzyme untuk molekul antibodi untuk mendeteksi antigen, misalnya untuk immunofluorescence atau immunoperoxi-dase staining
Ligan	Molekul atau ion pemicu sinyal yang terikat ke sebuah daerah ikatan pada protein target. Atau diartikan sebagai molekul yang dapat menyumbangkan pasangan elektronnya pada atom pusat
Limfosit B	Sel-sel dalam sistem imun yang mengkhususkan diri dalam pembentukan antibodi
Limfosit T	Sel-sel yang berperan pada berbagai fungsi imunologi yang berbeda, yaitu sebagai efektor pada respons imun seluler dan sebagai regulator yang akan mengatur kedua respons imun
Makrofag	Sel-sel fagosit
MHC	Lokus genetik, termasuk gen sangat polimorfik yang menyandi molekul untuk mengikat peptida yang dikenal dengan sel T. Dalam lokus MHC termasuk juga gen yang menyandi sitokin dan protein komplemen
Natural Killer (NK)	Subset limfosit asal sumsum tulang yang berbeda dari sel T dan sel B, berfungsi dalam imunitas nonspesifik. Menimbulkan lisis langsung melalui sekresi IFN- γ . Sel NK tidak mengekspresikan reseptor permukaan seperti Ig atau TCR
Netrofil	Sel-sel fagosit
PRO-STAIN™	Marker yang digunakan sebagai pembanding pita protein yang muncul yang dihitung bobot molekulnya (BM) melalui regresi-korelasi
Protein	Merupakan polimer asam-asam amino (polipeptida) yang mempunyai fungsi utama : (1) katalisator reaksi dalam sel. (2) pengangkut molekul kecil dan ion. (3) berperan dalam sistem pergerakan yang terkoordinasi. (4) bagian sistem kekebalan tubuh. (5) sebagai feromon. (6) sebagai pengatur ekspresi genetik. (7) penerus impuls saraf, dan (8) pendukung kekuatan regang.
Replikasi	Proses perbanyakkan bahan genetik
Reseptor	Bagian target pada tingkat molekuler yang mengelilingi substansi sebagai hasil dari interaksi spesifik. Bagian organisme yang merespon terhadap stimuli spesifik seperti chemoreseptor, osmoreseptor atau potoreseptor
SDS-PAGE	Teknik elektroporesis yang berguna untuk menentukan (determinasi) berat molekuler rantai polipeptida. Hal ini didasarkan pada pemisahan protein oligomerik dengan sodium dodecyl sulfate pada pH netral dan mercaptoethaol (untuk memutuskan ikatan disulfida protein).
Sel Memory	Pengembangan klon sel B dan sel T yang diproduksi selama respons imun primer dan dijadikan siap bereaksi terhadap antigen asalnya pada respons imun sekunder.
Sistem Imun	Gabungan sel, molekul dan jaringan yang berperan dalam resistensi terhadap infeksi
Sistem imun Adaptive	Adalah sistem imun dapatan yang mempunyai ciri ;(1) memiliki spesifitas yang dapat membedakan tiap-tiap

	molekul dari agen penginfeksi dan (2) memiliki sistem memori yang mampu untuk mengingat agen penginfeksi yang pernah masuk atau terpapar di dalam tubuhnya
Sistem imun Innate	System kekebalan alami atau system imun non spesifik yang merupakan pertahanan tubuh terdepan dalam menghadapi berbagai antigen.
Sitokin	Protein yang diproduksi banyak jenis sel yang berperan dalam inflamasi dan reaksi imun. sitokin merupakan mediator utama dalam komunikasi antar sel sistem imun
Tc	Sel yang membunuh sel sasaran dengan cara yang antigen spesifik
Transkripsi	Proses penyalinan urutan nukleotida yang terdapat pada molekul DNA



DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, Syamsul dan Sudaryanto. 2002. Pembenihan dan Pembesaran Kerapu Bebek. Penebar Swadaya Jogjakarta
- Akbar, Syamsul; sudjiharno dan Sunaryat. 2011. Pembesaran Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) di Keramba Jaring apung. Departemen Kelautan dan Perikanan. Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya, Balai Budidaya Laut, Lampung
- Alifuddin, M. 2001. Imunostimulasi pada Hewan Akuatik. Jurnal Akuakultur Indonesia 1(2) : 87 – 92 (2002).
- Amiruddin, H, R.K Dongaran, R. Nurhadi dan L. Darto. 2012. Manajemen Induk Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) sebagai Upaya Optimalisasi Produksi telur Berkualitas. Balai Budidaya Laut Ambon.
- Apridayanti, Eka. 2005. Evaluasi Pengelolaan Lingkungan Perairan Waduk Lahor Kabupaten Malang, Jawa Timur. Tesis. Universitas Diponegoro. Semarang
- Arina, Yuliana, M.D. 2003. Pengaruh Aging Terhadap Sistem imun. Fakultas Kedokteran gigi, Universitas Jember
- Aslianti, Titiek, Bedjo Slamet dan Gelar Sapta Prasetya. 2012. Aplikasi Budidaya Kerapu Bebek, *Cromileptes altivelis* di Teluk Ekas Kabupaten Lombok Timur. Bali.
- Atmirah, septinawati dan wahyu tjahjaningsih. 2010. Manajemen pembesaran Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) di Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau (BBPAP) jepara Jawa Tengah. Jurnal ilmiah perikanan dan kelautan Vol.2, No. 1 April. 2010
- Baratawidjaja, Karnen Garna dan Iris Rengganis. 2010. Immunologi Dasar. Edisi ke-10. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Benli. A.C.K. dan A. Ozkul. 2008. Sublethal Ammonia Exposure of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Effect on Gill, Liver, and Kidney. Pesticide Biochemistry and Physiology. Chemosphere, New York.
- Buletin Budidaya laut. 2012. Balai Besar pengembangan Budidaya Laut Lampung. Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya kementerian Kelautan dan Perikanan. ISSN 0853-4411
- Darmono dan Hasan A. M. 2002. Menyelesaikan Skripsi dalam Satu Semester. PT Grasindo. Jakarta.

- Effendi, Hefni. 2003. Telaah Kualitas Air Bagi Pengelolaan Sumber Daya dan Lingkungan Perairan. Kanisus: Yogyakarta
- Ekawati, arning wilujeng. 2005. Budidaya Makanan Alami. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Malang
- Ernest, Prima 2012, Pengaruh kandungan ion nitrat terhadap pertumbuhan *Nannochloropsis oculata*. Fakultas Teknik, Universitas Indonesia. Depok, Jakarta
- Evalawati; Maya meiyana dan T.W. Aditya. 2011. Pembesaran Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) di Keramba Jaring apung. Departemen Kelautan dan Perikanan. Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya, Balai Budidaya Laut, Lampung
- Fasya, Arif Habib. 2013. Efek Inhibitory VNN (*Viral Nervous Necrotic*) pada Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) yang diinduksi PCP (*Peridinin Chlorofil Protein*) Halimeda sp melalui Ekspresi MHC I. Tesis. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.
- Fatchiyah; Estri L. Arumingtyas; Sri Widyarti dan Sri Rahayu. 2011. Biologi Molekular. Erlangga: Jakarta
- Fatmah. 2006. Respon Imunitas yang Rendah Pada Tubuh Manusia usia lanjut. . Departemen Gizi Kesehatan masyarakat, fakultas kesehatan Masyarakat, universitas Indonesia, Depok. MAKARA, kesehatan Vol.10 No. 1.
- Fujaya, Yushinta. Fisiologi Ikan, Dasar Pengembangan Teknologi Perikanan. Rineka Cipta. Yogyakarta
- Habibi, Sugiyanta dan Andhika Yusuf. 2011. Panduan Penangkapan dan penanganan Perikanan Kerapu dan Kakap. Versi 1 Oktober
- Hartanti, N. 2008. Pencemaran Organik Limbah Tahu di Sungai Desa Kalisari Kecamatan Ajibarang Kabupaten Banyumas. *CERMIN*. Edisi 042. Hlm 4.
- Hasdianah; Prisma Dewi; Yuli Peristiwati dan Sentot Iman. 2014. Imunologi, Diagnosa dan Teknik Biologi Molekuler. Muha Medika. Yogyakarta
- Hermanto, Mochammad Bagus; Sumardi; Siti Masithah Fiqtinovri. 2011. Perancangan Bioreaktor untuk pembudidayaan Mikroalga. Jurusan Keteknikan pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya. Jurnal teknologi pertanian Vol. 12 No. 3 153-162
- Hoole, D., D. Bucke, P. Burgess and I. Wellby. 2001. *Diseases of Carp and Other Cyprinid Fishes*. Blackwell Science Ltd, United Kingdom.
- Impra. 2009. Protein. Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya Malang.

Judarwanto, W. 2012. Imunologi Dasar Reaksi Radang dan Respon Inflamasi. <http://allergyclinic.wordpress.com/2012/02/03/imunologi-dasar-radang-dan-respon-inflamasi/>

Kantor Deputi Menegristek Bidang Pendayagunaan dan Pemasyarakatan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi. 2011.

Kawaroe M. 2008. Mikroalga Sumber Potensial Biofuel Bogor. Pusat Penelitian Surfaktan dan Bioenergi (SRBC), Institut Pertanian Bogor, Bogor

Kordi, K.M.G.H 2009. Budidaya Perairan, Buku ke-2. PT. Citra Aditya Bakti. Bandung

Kordi. K. M. Ghufran, H., dan A.B. Tancung. 2007. Pengelolaan Kualitas Air Dalam Budidaya Perairan. Rineka Cipta. Jakarta

_____. 2010. Pakan Udang Nutrisi Formula Pembuatan Pemberian. Akademia. Jakarta.

Marzuki. 1983. Metodologi Riset. Fakultas Ekonomi. UII Yogyakarta.

Munazir, Zaikudin. 2001. Respon Imun Terhadap Infeksi Bakteri. Sari Pediatri, Vol. 2, No. 4 (193-197).

Nurhaidah, Christin. 2013. Kandungan Nitrat dan Orthofosfat pada Tambak Udang Vaname di Desa Dalegan Kecamatan Panceng Kabupaten Gresik Jawa Timur. *Praktek Kerja Lapang*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

Novalia, Lisa; Berta Putri dan Henni. W. Maharani. 2013. Pengaruh Metil metsulfuron terhadap Jaringan Insang Patin Siam (*Pangasius hypophthalmus*). E-Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan. Volume II No I. ISSN: 2302-3600

Pandey. J.P. 2007. Major Histocompatibility Complex in Virella, G (Ed). Medical Immunology sixth edition. Informa Healthcare. New York. Hlm: 23-34.

Pazra, Debby Fadhilah. 2008. Gambaran Histopatologi Insang, Otot dan Usus Pada Ikan Lele (*Clarias sp*) Asal dari Daerah Bogor. *Skripsi* Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor

Prasetyo, Tommie 2009. Pola Resistensi. Fakultas Teknik, universitas Indonesia. Depok

Radji, maksum. 2009. Vaksin DNA: Vaksin Generasi Keempat. Departemen Farmasi FMIPA-UI-Depok, 16424. Majalah ilmu kefarmasian Vol. VI No. 1- ISSN 1693-9883

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

Ramadhani, Dwi; Iin Kurnia; Setiawan Soetopo; Devita Tetriana; Irwan Ramli; Budianingsih; Adrijono; Tjahja Kurjana dan Maringan D. Lumban Tobing. 2012. Analisa serta *Stitching* Citra Imunohistokimia MIB-1 dengan immuno-ratio dan Perangkat Lunak *Nish Element D 2.30*. Lokakarya Komputasi dalam Sains dan Teknologi Nuklir, Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi radiasi-BATAN Jakarta (187-196)

Ribic, Adema. 2012. Immune Privilege Revisited: The Roles of Neuronal MHC Class I Molecules in Brain Development and Plasticity. Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, New Haven, CT. Yale University. USA

Rizky NM. 2010. Optimasi Kultivasi Mikroalga Laut *Nannochloropsis oculata* dengan Perlakuan Pupuk Urea untuk Produksi Lemat Nabati. Fakultas Perikanan, Universitas Brawijaya, Malang

Robert, R. J. 2001. Fish Pathology. Third Edition. W. B. Saunders, London, Edinburgh, Philadelphia, St Louis, Sidney, Toronto. 472 hal

Safitri. M, Eka; Rara Diantari; Suparmono; dan Moh. Muhaemin. 2013. KANDUNGAN LEMAK TOTAL *Nannochloropsis* sp. PADA FOTOPERIODE YANG BERBEDA. *e-Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan* Volume I No 2 Februari 2013 ISSN: 2302-3600

Salmin. 2005. Oksigen Terlarut (DO) dan Kebutuhan Oksigen Biologi (BOD) Sebagai Salah Satu Indikator untuk Menentukan Kualitas Perairan. ISSN Vol. 30. No. 30.

Saputra, Hari Marta; Netti Marusin dan Putra Santoso. 2013. Struktur Histologis Insang dan Kadar Kemoglobin Ikan Asang (*Osteochilus hasseltii* C.V) di Danau Singkarak dan Maninjau, Sumatera Barat. *Jurnal Biologi Universitas Andalas (J. Bio. UA)* ISSN: 2303-2162

Sari, Ria Hidra; Agus Setiawan dan Suparmono. 2013. Peningkatan Imunogenitas Vaksin Inaktif *Aeromonas salmonicida* DENGAN PENAMBAHAN ADJUVANT PADA IKAN MAS (*Cyprinus carpio*). *E-Jurnal Rekayasa dan TEKNOLOGI Budidaya Perairan*. ISSN: 2302-3600.

Sipahutar, Luky Wahyu; Dwinna Aliza; Winaruddin dan Nazaruddin. 2013. Gambaran Histopatologi Insang Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) yang Dipelihara dalam Temperatur Air Di Atas Normal. *Jurnal Medika Veterinaria*: ISSN: 0853-1943

Schultz, Hank. 2013. New Algae omega 3s player kualitas goes head to head with krill. *Lipids in Health and Disease*

Sudarsono, Afik. 2013. STUDI *In vivo* TREATMENT CRUDE PYRENOID MIKROALGA LAUT *Nannochloropsis oculata* TERHADAP EKSPRESI TNF- α PADA IKAN KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*). *Skripsi*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang

Sudaryatma, Putu Eka dan Ni Nyoman Eriawati. 2012. Histopatologis Insang Ikan Hias Air Laut yang Terinfeksi *Dactylogyrus* sp. Balai Karantina, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Denpasar. Jurnal Sains Veteriner ISSN: 0126-0421

Surakhmad, Winarno. 1998. Pengantar Penelitian Ilmiah (Dasar, Metode dan Teknik). Tarsito. Bandung

Utami, B. Sri. 1997. Major Histocompatibility: Struktur, Fungsi, Hubungan dengan Penyakit dan Pemanfaatan dalam Respon Imun. *Media Litbangkes*. Vol. VII. No: 03 & 04.

Weis, Virginia M., E. Alan Verde., Wendy S and Reynold. 2002. Characterization of A Short From Peridinin-Chlorophyll Protein (PCP) cDNA and Protein From the Symbiotic Dinoflagellate *Symbiodium muscatinei* (*Dinophyceae*) From the sea Anemone *Anthopleura elegantissima* (*Cnidaria*). *J. Phycol* 38: 157-163

Widayati, Dyah Eka; Aunurrohim dan Nurlita Abdulgani. 2011. Studi Histopatologi Insang Ikan Mujair (*Oreochromis mossambicus*) pada Konsentrasi Sublethal Air Lumpur Sidoarjo. Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya

Widi, Restu Kartiko. 2010. Asas Metodologi Penelitian. Graha Ilmu. Yogyakarta

Yanuhar, Uun. 2009. Pengaruh Pemberian Bahan Aktif Ekstrak *Nannochloropsis oculata* Terhadap Kadar Radikal Bebas pada Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) yang Terinfeksi Bakteri *Vibrio alginoliticus*. Unpublished.

_____. 2012. Laporan Eksplorasi Karakter Molekuler Perinidin Chlorophyll Cell Pigmen Alga Laut *Nannochloropsis oculata* dan *Halimeda* sp: Upaya Pengendalian Penyakit Virus Pada Ikan Berbasis Bahan Hayati. Unpublished.

_____. 2013-2014. Laporan Penelitian Unggulan PT-BOPTN. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan, Melalui DIPA Universitas Brawijaya Nomor: DIPA-023.04.2.424989/2013, Tanggal 5 Desember 2012 dan Berdasarkan SK Rektor Universitas Brawijaya Nomor: 295/SK/2013 Tanggal 12 Juni 2013. Unpublished.

Zulfikri. 2013. Identifikasi Peridinin Klorofil Protein (PCP) pada Makroalga Laut *Halimeda* Sp dengan Metode Elektroforesis SDS-PAGE (Sodium Dedosil Sulphat-Poliakrilamida Gel) dan Hemaglutinasi (HA). *Skripsi*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian

A. Alat

Nama Alat	Fungsi Alat
pH meter	Mengukur pH pada perairan
Refraktometer	Mengukur salinitas pada perairan
Termometer	Mengukur suhu pada perairan
DO meter	Mengukur oksigen terlarut pada perairan
Akuarium	Sebagai tempat pengamatan ikan
Pipet tetes	Mengambil larutan dalam skala kecil
Beaker glass	Sebagai tempat larutan
Perangkat aerasi	Sebagai suplai oksigen pada perairan
Erlenmeyer	Sebagai tempat menghomogenkan larutan
Cawan petri	Sebagai wadah aquades untuk membilas kantong celonan
Mortar dan Alu	Untuk menghaluskan sampel
Autoclave	Untuk mensterilisasikan alat dan bahan
Sectio set	Untuk membedah ikan Kerapu Tikus
Microplate	Untuk mengambil laputan dalam skala yang sudah ditentukan
Spatula	Untuk mengaduk bahan
Eppendorf 1; 1,5 dan 2 ml	Untuk meletakkan sampel
Falcon 15 dan 50 ml	Untuk menyimpan bahan dalam skala tertentu
mikropipet 20, 200, dan 1000 μ l	Untuk mengambil larutan dalam skala mikroliter
Blue tip	Untuk mengambil larutan pada skala 2000 mikroliter
Yellow tip	Untuk mengambil larutan dalam skala 1000 mikroliter
Deepfreezer -80°C	Untuk menyimpan sampel mikroalga dan ikan Kerapu Tikus
Freezer -20°C	Untuk menyimpan bahan
Senriuge 4°C	Untuk memisahkan supernatan dan pelet dalam sampel mikroalga
Refrigerator 4°C	Untuk menyimpan bahan
Spuir 1 cc 1/2"X26G	Untuk mengambil bahan dalam skala kecil
Timbangan analitik	Untuk menimbang sampel dengan ketelitian 10^{-2}
Nanodrop spektrofometer	Untuk mengukur kadar protein
Magnetik stirrer	Untuk membantu menghomogenkan larutan
Sendok erlenmeyer	Untuk megambil bahan

Kantong celovan	Untuk memisahkan protein murni dalam proses dialisa
Tubing petri disk	Untuk menjepit kantong celovan
Hot plate	Untuk memanaskan PBS dan Na-EDTA
Objek glass	Sebagai tempat pembuatan preparat
Cover glass	Untuk menutup objek pada preparat
Mikroskop okuler	Untuk mengamati jaringan insang
Spatula	Untuk membantu menghomogenkan larutan
Tabung nitrogen cair	Sebagai tempat nitrogen cair
Chamber	Sebagai tempat melakukan proses SDS-PAGE
Water bath shaker	Sebagai tempat pembilasan
Seperangkat alat elektroforesis (SDS-PAGE)	Untuk mengukur kadar protein
Nampan	Sebagai wadah alat dan bahan
Kotak penyimpanan gel	Sebagai wadah penyimpanan gel SDS-PAGE
Kamera DSLR	Untuk mengambil gambar pengamatan

B. Bahan

Nama Bahan	Fingsi Bahan
Ikan Kerapu Tikus	Sebagai ikan uji
<i>N. oculata</i>	Sebagai sampel yan diambil PCP nya
Buffer ekstrak	sebagai penyeimbang pH
Phospat Buffer Saline (PBS)	Untuk menjaga integritas sel atau tidak merusak sel
Masker	Untuk melindungi bahan dari kontaminasi
Sarung tangan	Untuk melindungi bahan dari kontaminasi
Alkaline Phospatase Subtrat (chromogen NBT)	Untuk membentuk senyawa berwarna
Aquadest	Untuk mengkalibrasi alat dan bahan
Stacking gel 5%, terdiri dari : 1. Akrilamid 30%, 2. Tris HCL 1.5 M pH 6.8, 3. dH ₂ O, 4. Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 10%, 5. Ammonium Persulfat (APS) 10%, 6. Tetra ethylene diamine (TEMED)	Sebagai bahan membuat gel pada proses SDS-PAGE
separating gel 12,5%, terdiri dari : 1. Acrilamid 30%, 2. Tris HCL 1.5 M pH 8.8, 3. dH ₂ O, 4. SDS 10%, 5. 10%, 6. TEMED 7. Reducing Sampel Buffer	Sebagai bahan membuat gel pada proses SDS-PAGE

(RBS) dengan perbandingan 1:1 (RSB : sampel)	
Marker PRO-STAIN™	Sebagai acuan untuk mengetahui ukuran BM hasil ampifikasi
<i>Staining solution</i> (commasie blue)	Sebagai pewarna dalam proses SDS-PAGE
<i>Destaining solution</i>	Untuk memisahkan molekul-molekul protein berdasarkan berat molekul
<i>Running buffer</i>	Memisahkan protein dengan bantuan arus listrik
Es batu	Untuk menjaga ikan agar tetap dingin
Es kering	Untuk menjaga ikan agar tetap dingin
<i>Xylen</i>	Sebagai pelarut dalam proses IHC
<i>Xylol</i>	Sebagai pelarut dalam proses IHC
Glicyn	Sebagai pelarut pada saat isolasi protein
Na-EDTA	Untuk menjaga larutan agar tidak menggumpal
Air laut	Sebagai media hidup ikan
Nitrogen cair	Sebagai bahan untuk memecah protein pada <i>N. oculata</i>
<i>Aluminium foil</i>	Untuk menyimpan bahan pada suhu ekstrim
Kertas saring	Untuk menyaring sampel <i>N. Oculata</i>
Minyak cengkeh	Untuk membius ikan Kerapu Tikus sebelum di bedah
Alkohol 70%	Untuk sterilisasi alat yang akan digunakan
Monoklonal anti MHC-I	Sebagai antibodi primer pada saat melakukan IHC dan WB
Anti MHC I anti grouper	Sebagai antibodi sekunder pada saat melakukan IHC dan WB
Tali wol	Untuk mengikat kantong celovan pada saat dialisa
Plastik klip	Untuk menyimpan organ setelah dihaluskan
Isolasi kertas	Untuk memberi label pada alat dan bahan

Lampiran 2. Data berat ikan ikontrol dan ikan perlakuan selama masa pemeliharaan

Hari ke-	Ikan Kontrol (gram)	Ikan Perlakuan (gram)
0*	46	46
1	46	46
2	48	48,2
3	50,2	50,4
4	52	52,6
5*	52,4	52,8
6	50	53,2
7	49	54,3
8	50	54,5
9	51	54,8
10	51	55
11	51,8	55,4
12	52,1	55,5
13	51,8	55,8
14*	51,8	56,2
15	53,8	56,8
16	56,8	57,4
17	59,8	57,6
18*	63,4	58,3
19	65,5	59,3
20	66,8	60,2
21	67,4	61,2
22*	68,9	62,2
Jumlah	1255,5	1263,7
Rata-rata	57,068	57,441

Keterangan : [*] hari penyondean atau penambahan PCP

Lampiran 3. Perhitungan dosis PCP dari *N. oculata* untuk uji klinis pada ikan Kerapu Tikus. (Sumber : Yanuhar, 2012).

1. Penyondean I (hari ke-0)

- Konsentrasi PCP hasil spektrofotometri adalah 0,027 mg/ml = 27 µg/ml.
- Dosis pemberian dalam uji klinis adalah 33,3 µg/ml 150 gram ikan dengan volume 0,1 mg/ikan atau 100 µl.
- Ikan biasanya diinduksi dengan volume 0,1 ml atau 0,2 ml.
- Jika 150 gr = 33 µg, maka 46 gr = $(150/46) * 33 = 10,31$ µg diambil dari konsentrasi 27 µg/ml

Sehingga :

$$v_1 \times N_1 = v_2 \times N_2$$

$$27 \mu\text{g} \times a = 0,1 \mu\text{g} \times 10,31 \mu\text{g}$$

$$a = 1,038 \mu\text{g}/27$$

$$a = 0,038 \text{ ml} \text{ ml dilarutkan dalam } 0,1 \text{ ml}$$

Dosis untuk 46 gram ikan adalah

$$= 0,038 \mu\text{g} + 0,1 = 0,138 \text{ ml}$$

Jadi pada saat penyondean pertama kali pada hari ke-0 menggunakan dosis PCP sebanyak 138 µl.

2. Penyondean II (hari ke-5)

- Konsentrasi PCP hasil spektrofotometri adalah 0,027 mg/ml = 27 µg/ml.
- Dosis pemberian dalam uji klinis adalah 33,3 µg/ml 150 gram ikan dengan volume 0,1 mg/ikan atau 100 µl.
- Ikan biasanya diinduksi dengan volume 0,1 ml atau 0,2 ml.
- Jika 150 gr = 33 µg, maka 52,8 gr = $(150/52,8) * 33 = 11,61$ µg diambil dari konsentrasi 27 µg/ml

Sehingga :

$$v_1 \times N_1 = v_2 \times N_2$$

$$27 \mu\text{g} \times a = 0,1 \mu\text{g} \times 11,61 \mu\text{g}$$

$$a = 1,161 \mu\text{g} / 27$$

$$= 0,043 \text{ ml} \text{ ml dilarutkan dalam } 0,1 \text{ ml}$$

Dosis untuk 52,8 gram ikan adalah

$$= 0,043 \mu\text{g} + 0,1 = 0,143 \text{ ml}$$

Jadi pada saat penyondean ke dua (hari ke-5) menggunakan dosis PCP sebanyak 143 μl .

3. Penyondean III (hari ke-9)

- Konsentrasi PCP hasil spektrofotometri adalah $0,027 \text{ mg/ml} = 27 \mu\text{g/ml}$.
- Dosis pemberian dalam uji klinis adalah $33,3 \mu\text{g/ml}$ 150 gram ikan dengan volume $0,1 \text{ mg/ikan}$ atau $100 \mu\text{l}$.
- Ikan biasanya diinduksi dengan volume $0,1 \text{ ml}$ atau $0,2 \text{ ml}$.
- Jika $150 \text{ gr} = 33 \mu\text{g}$, maka $54,8 \text{ gr} = (150/54,8) * 33 = 12,08 \mu\text{g}$ diambil dari konsentrasi $27 \mu\text{g/ml}$

Sehingga :

$$v_1 \times N_1 = v_2 \times N_2$$

$$27 \mu\text{g} \times a = 0,1 \mu\text{g} \times 12,08 \mu\text{g}$$

$$a = 1,209 \mu\text{g} / 27$$

$$= 0,045 \text{ ml} \text{ ml dilarutkan dalam } 0,1 \text{ ml}$$

Dosis untuk 54,8 gram ikan adalah

$$= 0,045 \mu\text{g} + 0,1 = 0,145 \text{ ml}$$

Jadi pada saat penyondean ke tiga (hari ke-9) menggunakan dosis PCP sebanyak 145 μl .

4. Penyondean IV (hari ke-14)

- Konsentrasi PCP hasil spektrofotometri adalah $0,027 \text{ mg/ml} = 27 \text{ } \mu\text{g/ml}$.
- Dosis pemberian dalam uji klinis adalah $33,3 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 150 gram ikan dengan volume $0,1 \text{ mg/ikan}$ atau $100 \text{ } \mu\text{l}$.
- Ikan biasanya diinduksi dengan volume $0,1 \text{ ml}$ atau $0,2 \text{ ml}$.
- Jika $150 \text{ gr} = 33 \text{ } \mu\text{g}$, maka $56,2 \text{ gr} = (150/56,2) * 33 = 12,41 \text{ } \mu\text{g}$ diambil dari konsentrasi $27 \text{ } \mu\text{g/ml}$

Sehingga :

$$v_1 \times N_1 = v_2 \times N_2$$

$$27 \text{ } \mu\text{g} \times a = 0,1 \text{ } \mu\text{g} \times 12,41 \text{ } \mu\text{g}$$

$$a = 1,241 \text{ } \mu\text{g}/27$$

$$= 0,046 \text{ ml ml dilarutkan dalam } 0,1 \text{ ml}$$

Dosis untuk $56,2 \text{ gram}$ ikan adalah

$$= 0,046 \text{ } \mu\text{g} + 0,1 = 0,146 \text{ ml}$$

Jadi pada saat penyondean ke empat (hari ke-14) menggunakan dosis PCP sebanyak $146 \text{ } \mu\text{l}$.

5. Penyondean V (hari ke-18)

- Konsentrasi PCP hasil spektrofotometri adalah $0,027 \text{ mg/ml} = 27 \text{ } \mu\text{g/ml}$.
- Dosis pemberian dalam uji klinis adalah $33,3 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 150 gram ikan dengan volume $0,1 \text{ mg/ikan}$ atau $100 \text{ } \mu\text{l}$.
- Ikan biasanya diinduksi dengan volume $0,1 \text{ ml}$ atau $0,2 \text{ ml}$.
- Jika $150 \text{ gr} = 33 \text{ } \mu\text{g}$, maka $58,3 \text{ gr} = (150/58,3) * 33 = 12,84 \text{ } \mu\text{g}$ diambil dari konsentrasi $27 \text{ } \mu\text{g/ml}$

Sehingga :

$$v_1 \times N_1 = v_2 \times N_2$$

$$27 \mu\text{g} \times a = 0,1 \mu\text{g} \times 12,84 \mu\text{g}$$

$$a = 1,284 \mu\text{g} / 27$$

$$= 0,048 \text{ ml} \text{ ml dilarutkan dalam } 0,1 \text{ ml}$$

Dosis untuk 58,3 gram ikan adalah

$$= 0,048 \mu\text{g} + 0,1 = 0,148 \text{ ml}$$

Jadi pada saat penyondean ke lima (hari ke-18) menggunakan dosis PCP sebanyak 148 μl .

e. Penyondean VI (hari ke-22)

a. Konsentrasi PCP hasil spektrofotometri adalah $0,027 \text{ mg/ml} = 27 \mu\text{g/ml}$.

b. Dosis pemberian dalam uji klinis adalah $33,3 \mu\text{g/ml}$ 150 gram ikan dengan volume $0,1 \text{ mg/ikan}$ atau $100 \mu\text{l}$.

c. Ikan biasanya diinduksi dengan volume $0,1 \text{ ml}$ atau $0,2 \text{ ml}$.

d. Jika $150 \text{ gr} = 33 \mu\text{g}$, maka $62,2 \text{ gr} = (150/62,2) * 33 = 13,69 \mu\text{g}$ diambil dari konsentrasi $27 \mu\text{g/ml}$

Sehingga :

$$v_1 \times N_1 = v_2 \times N_2$$

$$27 \mu\text{g} \times a = 0,1 \mu\text{g} \times 13,69 \mu\text{g}$$

$$a = 1,369 \mu\text{g} / 27$$

$$= 0,051 \text{ ml} \text{ ml dilarutkan dalam } 0,1 \text{ ml}$$

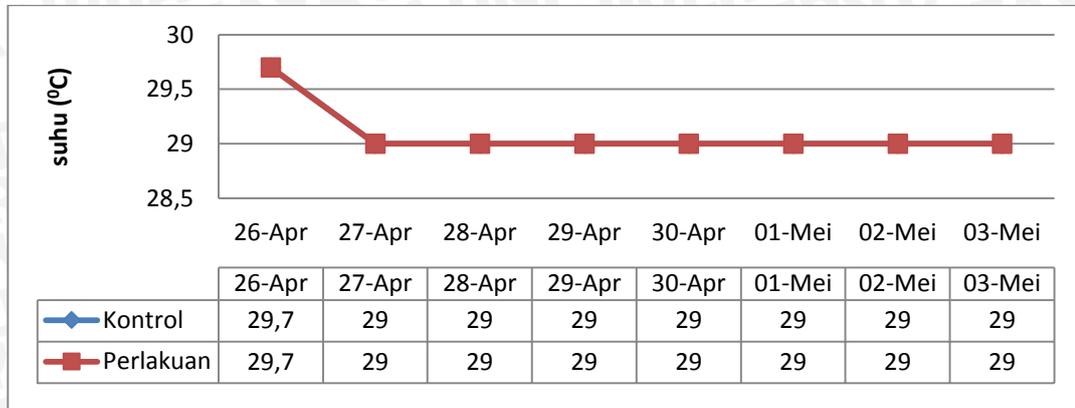
Dosis untuk 62,2 gram ikan adalah

$$= 0,051 \mu\text{g} + 0,1 = 0,151 \text{ ml}$$

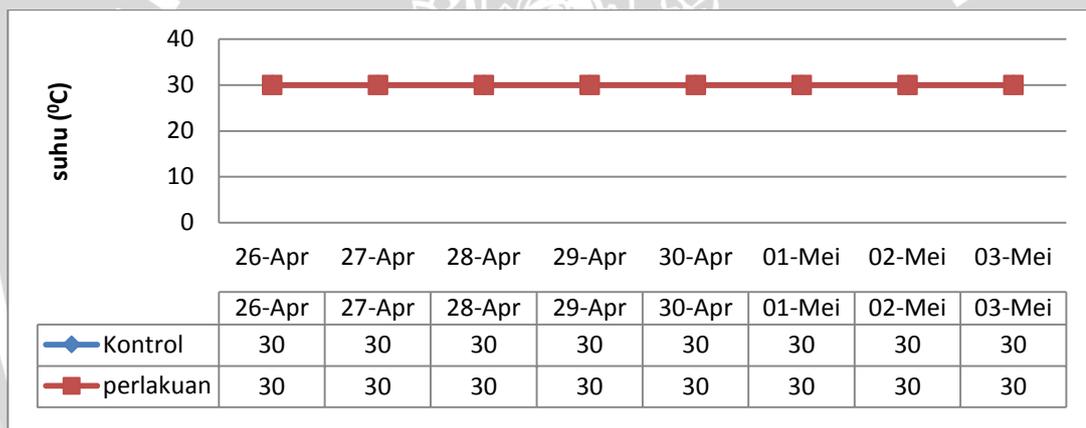
Jadi pada saat penyondean ke enam (hari ke-22) menggunakan dosis PCP sebanyak $151 \mu\text{l}$.

Lampiran 4. Grafik hasil Pengukuran Kualitas Air

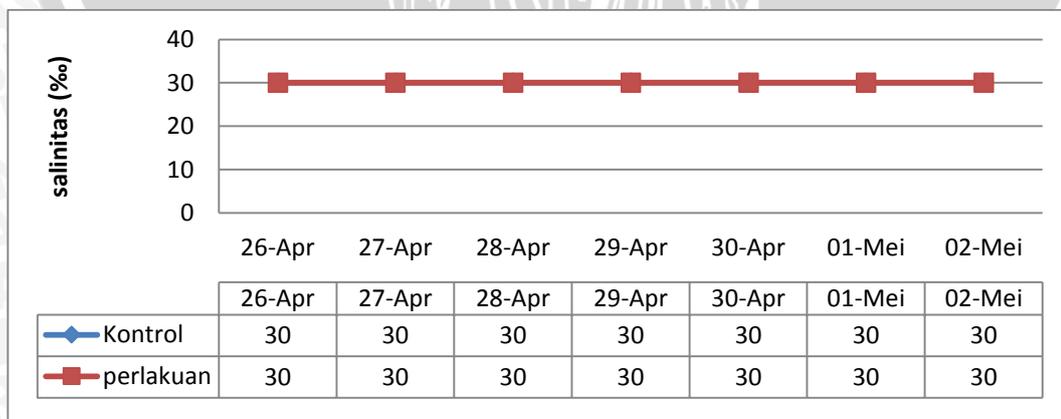
a. Grafik hasil pengukuran suhu ($^{\circ}\text{C}$) pada pagi hari kolam ikan Kerapu Tikus



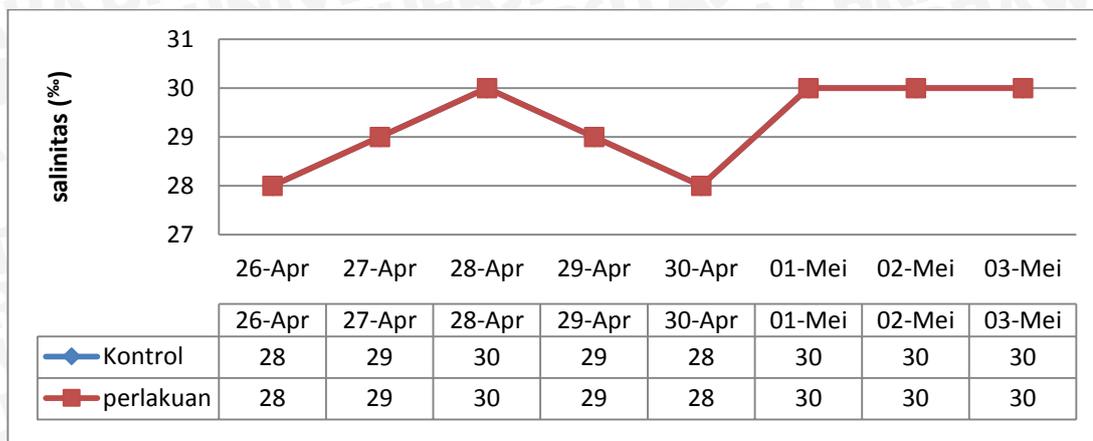
b. Grafik hasil pengukuran suhu ($^{\circ}\text{C}$) pada sore hari kolam ikan Kerapu Tikus



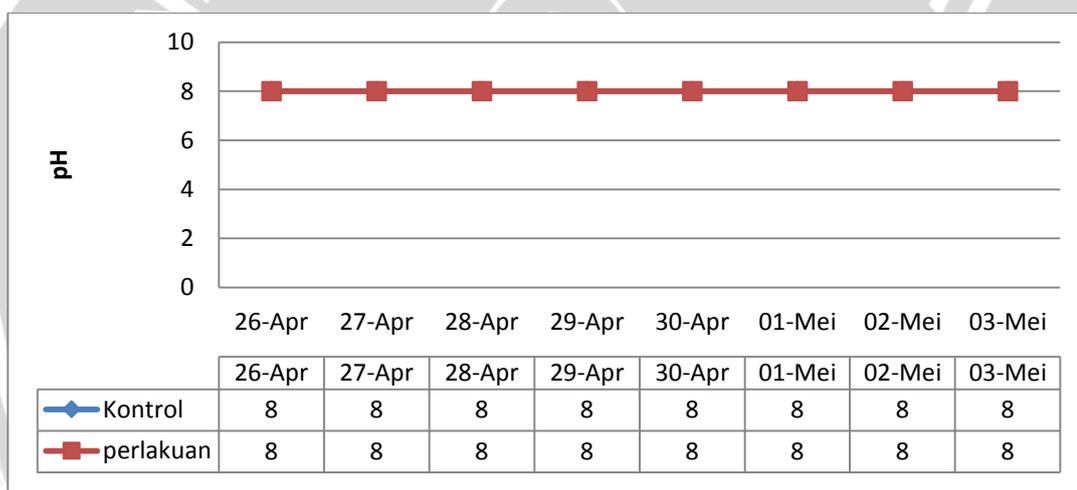
c. Grafik hasil pengukuran salinitas (‰) pada pagi hari kolam ikan Kerapu Tikus



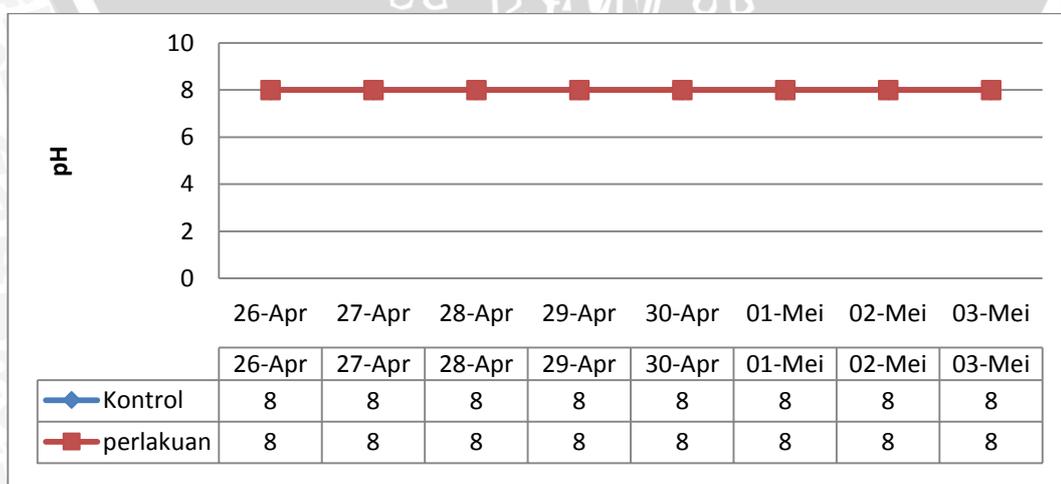
d. Grafik hasil pengukuran salinitas (‰) pada sore hari kolam ikan Kerapu Tikus



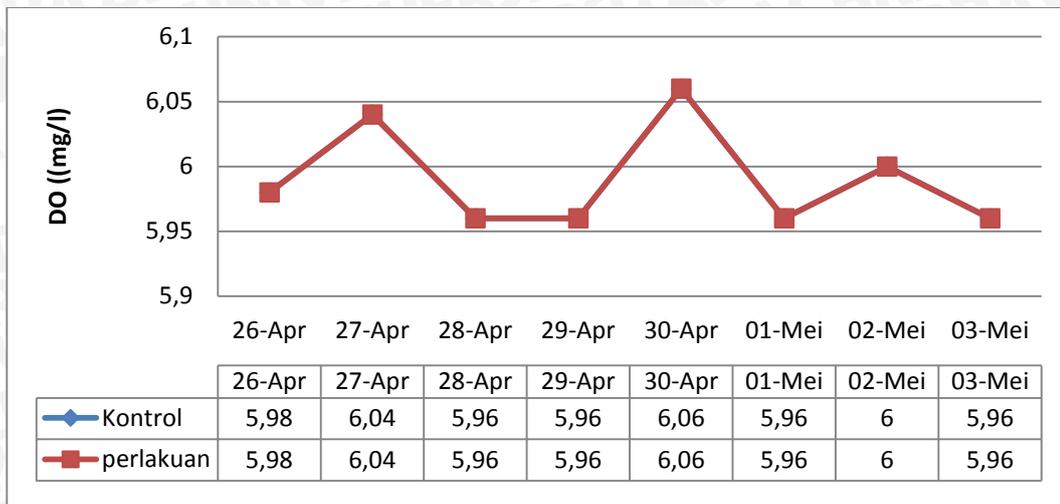
e. Grafik hasil pengukuran pH pada pagi hari kolam ikan Kerapu Tikus



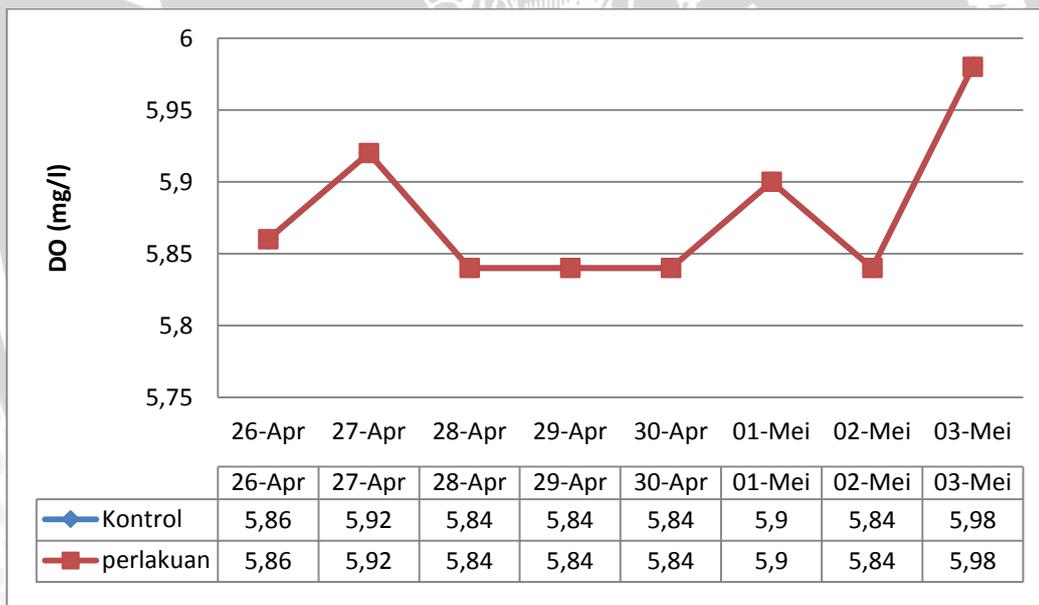
f. Grafik hasil pengukuran pH pada sore hari kolam ikan Kerapu Tikus



g. Grafik hasil pengukuran oksigen terlarut (DO) (mg/l) pada pagi hari kolam ikan Kerapu Tikus



h. Grafik hasil pengukuran oksigen terlarut (DO) (mg/l) pada sore hari kolam ikan Kerapu Tikus



Lampiran 5. Dokumentasi selama proses penelitian.



Proses penyaringan *N. oculata*



N. oculata setelah proses penyaringan



Supernatan hasil isolasi



Sentrifugasi *N. oculata*



Crude Pirenoide dari *N. oculata*



Penyondean



Ikan Kerapu Tikus yang digunakan dalam penelitian



Sterilisasi alat dan bahan menggunakan autoclave



Pipeting Sampel



Proses Fragsinasi



Proses Staning



Pembuatan larutan PRS

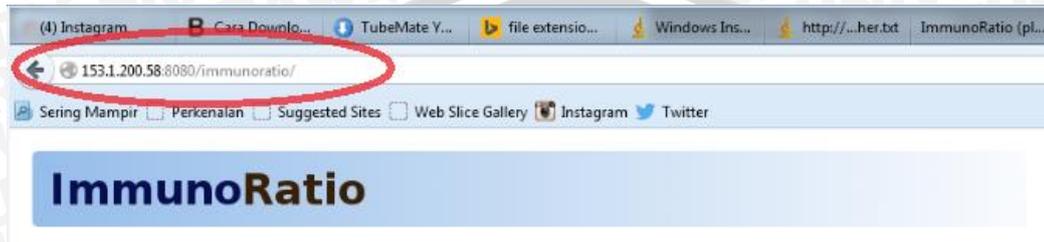


Pembuatan larutan

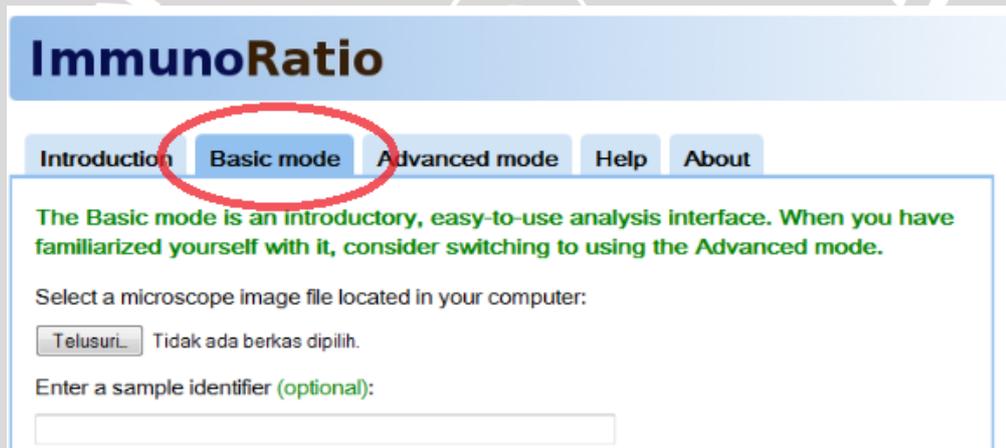
Lampiran 6. Tahapan menggunakan aplikasi IR pada software

Tahapan untuk melakukan analisa Imunohistokimia menggunakan software *ImmunoRatio* (IR) dilakukan dengan tahap berikut ini:

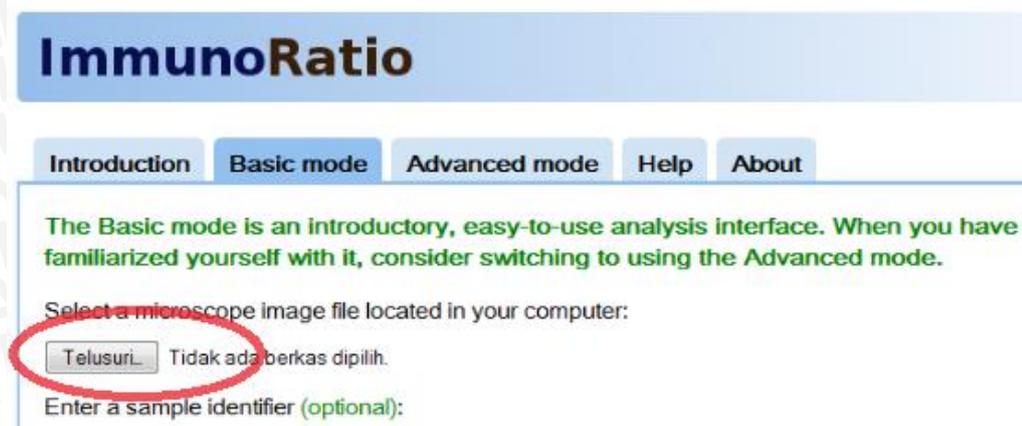
1. Buka web aplikasi IR dengan alamat (immunoratio.com) seperti gambar dibawah ini



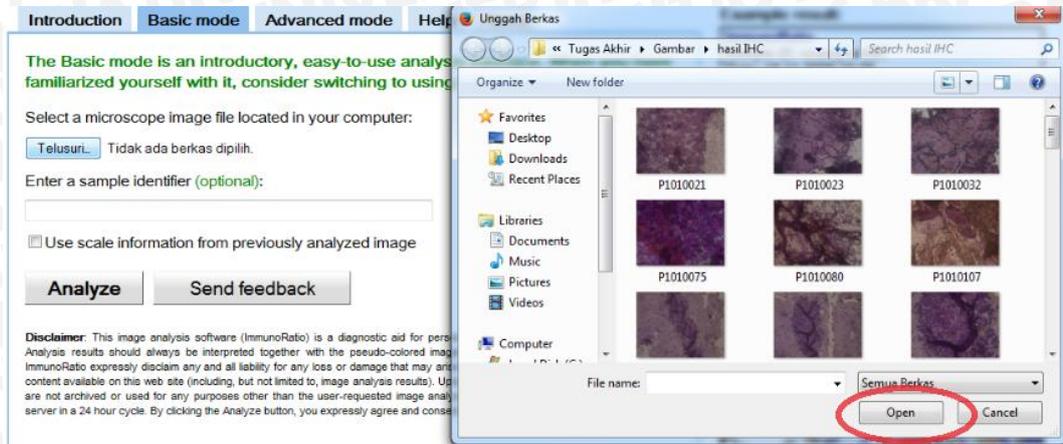
2. Pilih "Basic mode" pada menu pilihan



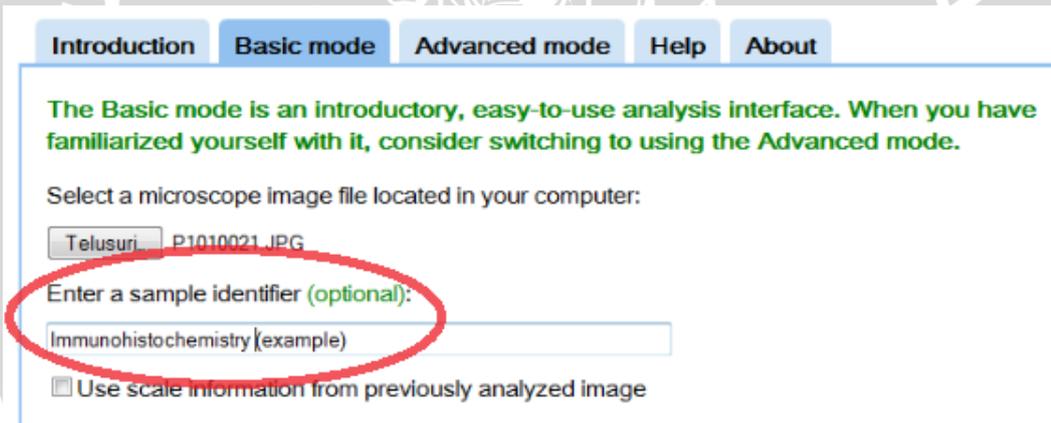
3. Klik "Telusuri" pada menubar untuk mengambil gambar yang akan dianalisa menggunakan aplikasi IR pada PC



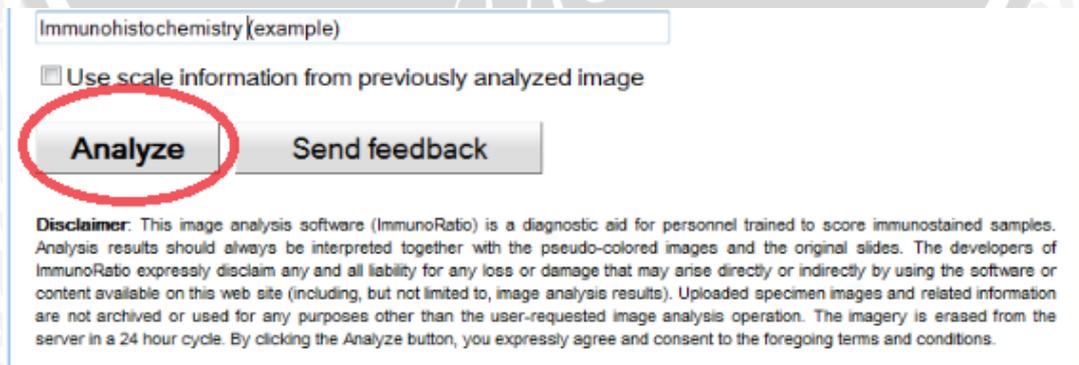
4. Pilih salah satu foto yang akan dianalisa menggunakan aplikasi IR dan Klik “open” pada tab unggah berkas



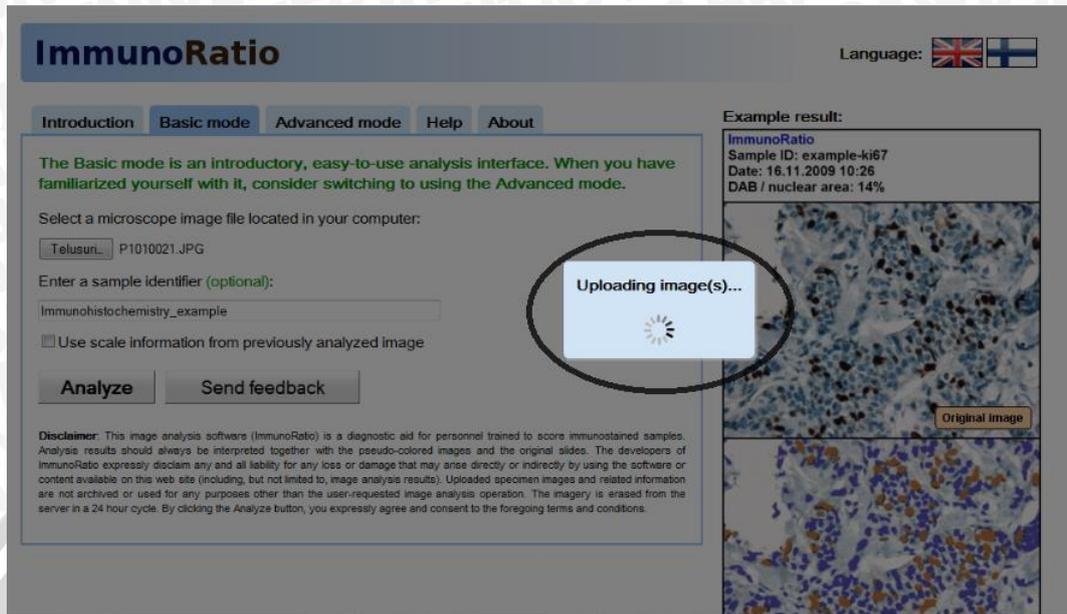
5. Tulis nama yang akan digunakan untuk membedakan antara foto yang telah dianalisa sebelumnya pada kolom “Enter a sample identifier (optional)”



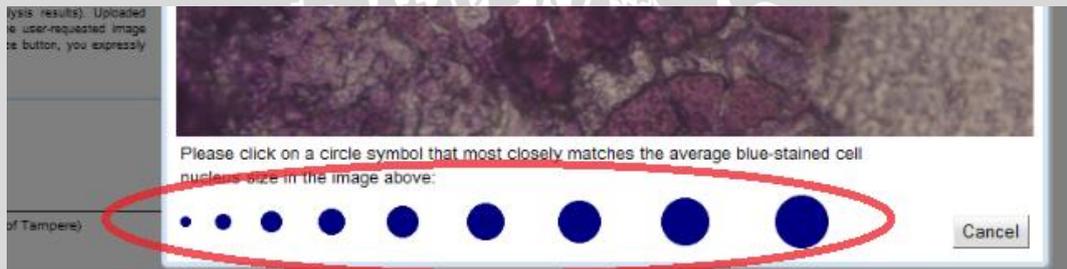
6. Klik “analyze” untuk menunculkan hasil IR



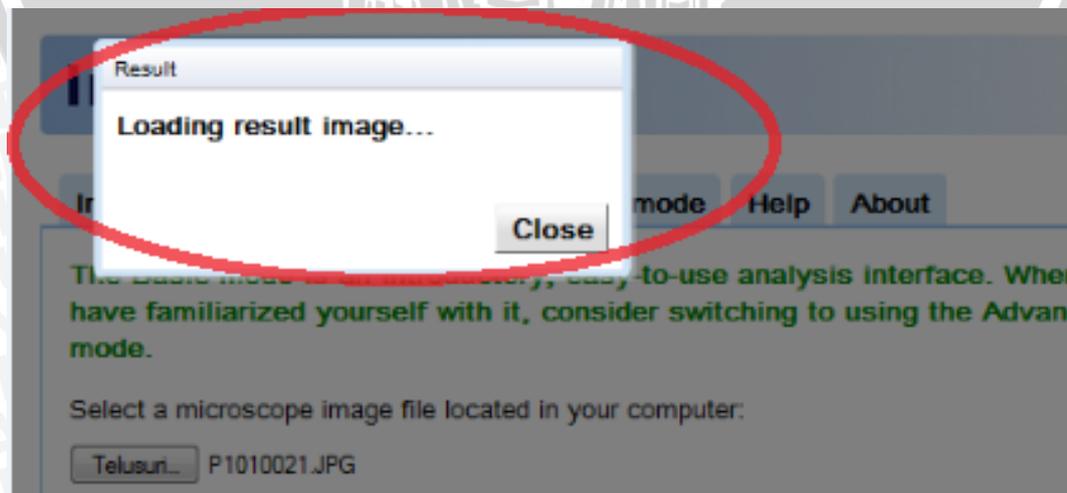
7. Tunggu uploading image(s) sampai muncul seperti gambar dibawah ini



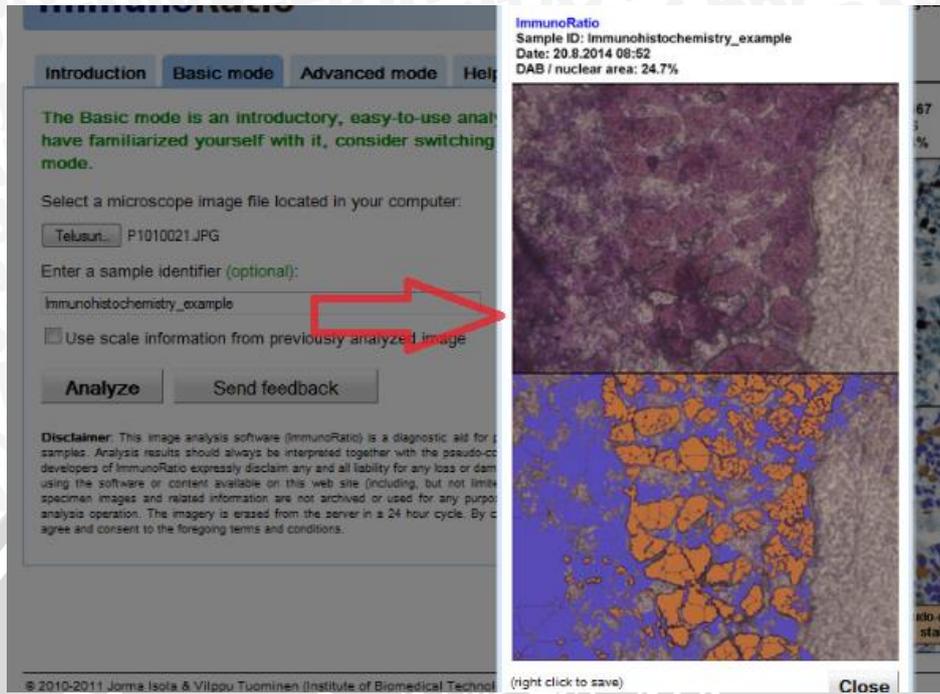
8. Pilih besaran simbol atau scale yang akan digunakan



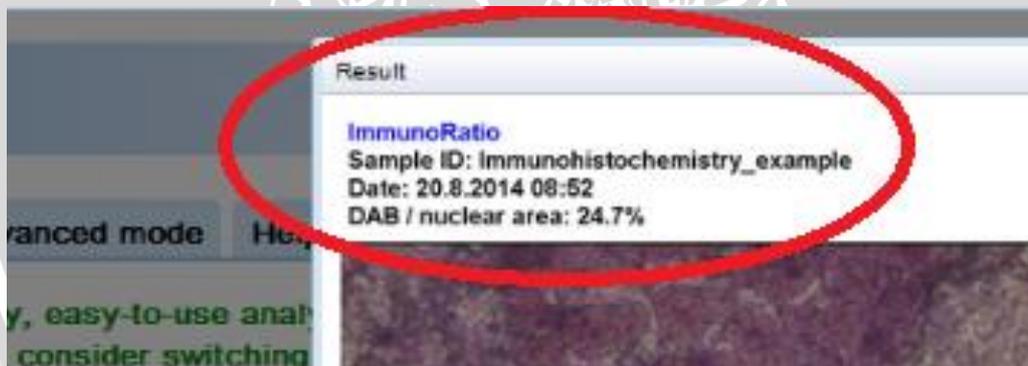
9. Tunggu hasil IR keluar hingga muncul seperti pada gambar dibawah ini



10. Hasil IR akan muncul seperti pada tampilan berikut ini



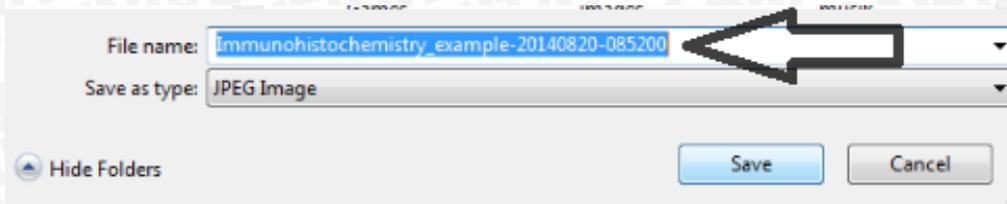
11. Nilai persentasi DAB akan muncul yang menunjukkan positif dan negatif



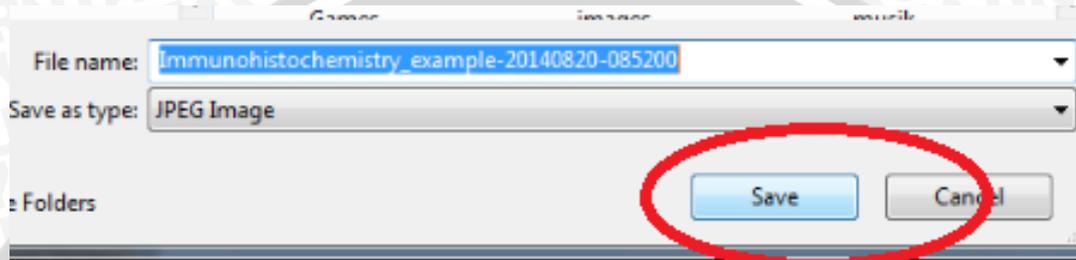
12. Simpan hasil analisa menggunakan aplikasi IR dengan cara "klik kanan" dan pilih menu "simpan gambar dengan nama"



13. "Rename" file dan pilih letak file untuk menyimpan data analisa



14. "klik" save dan diperoleh hasil analisa menggunakan IR



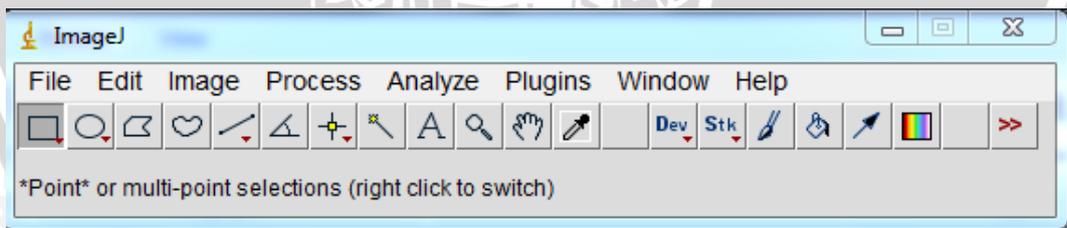
Lampiran 7. Tahapan menggunakan software “imageJ”

Tahapan untuk menggunakan software “imageJ” dapat dilakukan melalui melalui beberapa tahapan, seperti pada langkah dibawah ini:

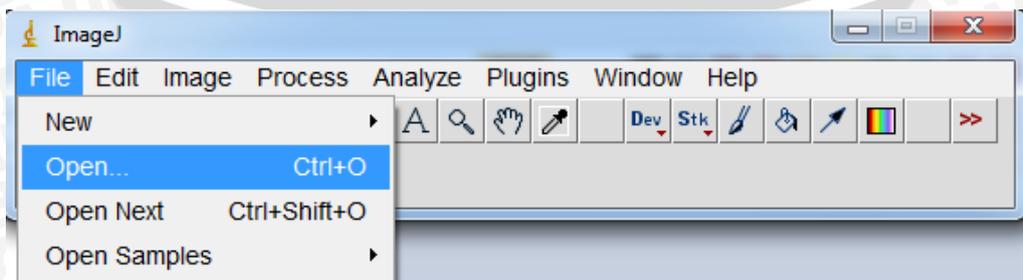
1. Download dan install aplikasi software “ImageJ” yang dapat diperoleh secara gratis yang tersedia di internet



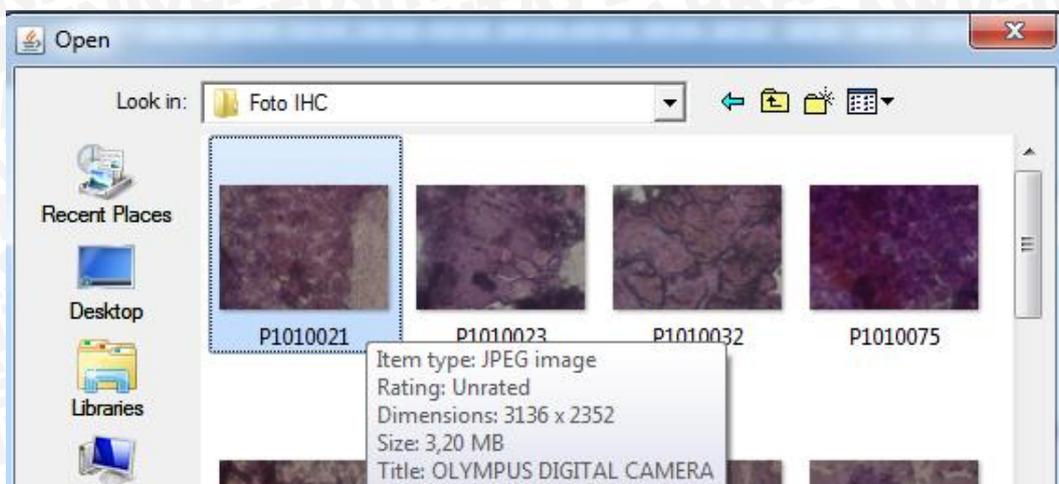
2. Tampilan “ImageJ” dapat dilihat pada gambar dibawah ini



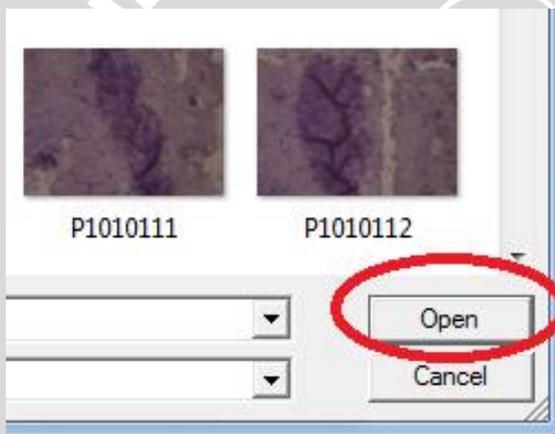
3. Klik “file” dan pilih menu “open” untuk memelih foto yang akan digunakan



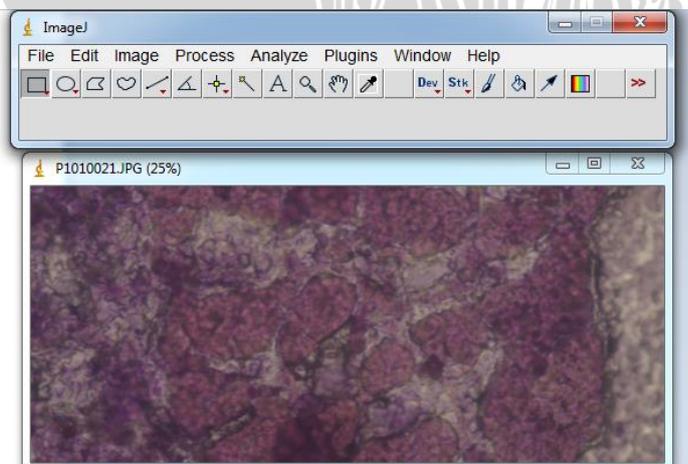
- Pilih file yang akan digunakan



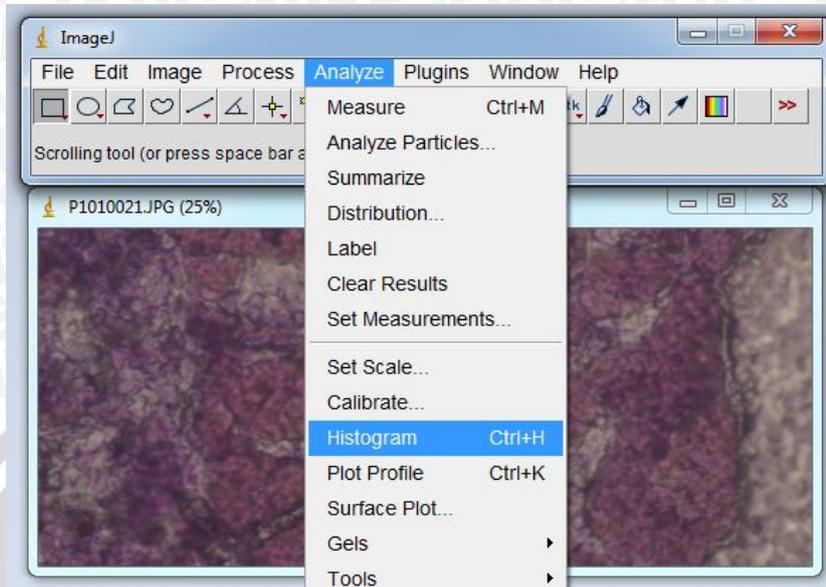
- Klik "open"



- Setelah di klik "open" akan muncul tampilan sebagai berikut



- Untuk melakukan analisa histogram, klik "Analyze" dan pilih "Histogram" atau dapat menggunakan (Ctrl+H) seperti tampilan berikut



- Setelah itu akan diperoleh tampilan analisa histogram seperti tampilan berikut ini

