

repository.ub.ac.id

**PEMANFAATAN *Fragmen Pigmen Protein* MIKROALGA *Chlorella vulgaris*  
YANG DIUJI SECARA IN VIVO PADA IKAN KERAPU TIKUS  
(*Cromileptes altivelis*)**

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

Oleh :

**AMIRA MASITHA  
NIM. 115080107111002**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2015**



PEMANFAATAN *Fragmen Pigmen Protein MIKROALGA Chlorella vulgaris*  
YANG DIUJI SECARA IN VIVO PADA IKAN KERAPU TIKUS  
(*Cromileptis altivelis*)

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 :

AMIRA MASITHA  
NIM. 115080107111002



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2015

SKRIPSI  
PEMANFAATAN *Fragmen Pigmen Protein MIKROALGA Chlorella vulgaris*  
YANG DIUJI SECARA IN VIVO PADA IKAN KERAPU TIKUS  
(*Cromileptes altivelis*)

Oleh :  
AMIRA MASITHA  
NIM. 115080107111002

telah dipertahankan didepan penguji  
pada tanggal 11 Agustus 2015  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Dosen penguji I

Ir. Supriatna M.Si  
NIP. 19640551 19903 1 003  
Tanggal :

Dosen Penguji II

Ir. Herwati Umi S. MS  
NIP. 19520402 198003 2 001  
Tanggal :

Menyetujui,  
Dosen Pembimbing I

Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, MSi  
NIP. 19730404 200212 2 001  
Tanggal :

Dosen Pembimbing II

Dr.Ir. Muhammad Musa, MS  
NIP. 19570507 1986802 1 002  
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, Agustus 2015

Mahasiswa,

AMIRA MASITHA  
NIM. 115080107111002

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Terimakasih yang dalam penulis persembahkan Kedua orang tua yaitu ayahanda Slamet Rijadi dan Ibu Nurul Hidayati, kakak tersayang Iqbal Rizqhie Yustisi dan seluruh keluarga besar terima kasih atas do'a, semangat, kasih sayang dan dukungannya.
2. Ibu Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si dan Dr. Ir. Muhammad Musa, MS. selaku dosen pembimbing yang telah membimbing dan mengarahkan penulis dalam menyelesaikan laporan Skripsi ini.
3. Bapak Ir. Supriatna M.Si dan ibu Ir. Herwati Umi S., MS selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan masukan yang bermanfaat dan membangun bagi penulis.
4. Teman-teman tim Alga 2015, Mas Khumaidi, Mbak Leni, Mas Lukman, Lisa, Yovan, Fariq, Hendra Nanuk, Lufi, Dita, Arif, Fahmi dan Ocha yang sabar dan luar biasa yang saling memberi memotivasi kepada penulis.
5. Teman-teman Ciliped, Erlita, Vina, Fitri, Lisa, Novi, Bunga, Shinta, Ima, Elsa yang luar biasa yang saling memberi motivasi kepada penulis.
6. Muhammad N.H. Ridlo yang selalu menemani, mendukung, dan memberikan semangat kepada penulis.
7. Rekan-rekan ARM 2011 yang banyak memberikan bantuan ikut berperan dalam memperlancar dalam menyelesaikan laporan praktek kerja lapang ini.
8. Terima kasih untuk Watumujur no.2, Sheila Astari, Maya, Elsa, Ita, Silvi, Dinda. Terima kasih untuk semangat dan dukungannya
9. Kepada berbagai pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu per satu yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan laporan Studi Lapangan ini.

Malang, 11 Agustus 2015

Penulis

## LEMBAR KHUSUS

Penelitian ini dibiayai oleh Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Direktorat Jendral Pembelajaran dan Kemahasiswaan Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi, sesuai dengan Addendum Surat Perjanjian Penugasan Dalam Rangka Pelaksanaan Program Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Nomor : 007/Add/SP2H/PL/DIT.LITABMAS/V/2015, tanggal 12 Mei 2015. dengan Judul “ **Produksi dan Pengembangan Produk Antiviral Berbasis Peridinin Chlorophyl Cell Pigmen Spesies Mikroalga Laut Untuk Komoditas Unggulan Ikan Ekspor** ” yang diketuai oleh Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si.,

Penelitian melibatkan mahasiswa S2 dan S1 :

1. Ach. Khumaidi, S. Pi
2. Leni Sri Wahyuni
3. Luqman Hariono
4. Yovan Endik Irawanto
5. Amira Masitha
6. Dian Novalisa
7. Fariq Maghfiroh Al-habsy

ADAPUN JUDUL SKRIPSI DALAM PENELITIAN INI ADALAH:  
**PEMANFAATAN *Fragmen Pigmen Protein MIKROALGA Chlorella vulgaris* YANG DIUJI SECARA IN VIVO PADA IKAN KERAPU TIKUS (*Cromileptis altivelis*)**

Mengetahui,  
Ketua Peneliti



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

## RINGKASAN

**AMIRA MASITHA.** Skripsi mengenai PEMANFAATAN *Fragmen Pigmen Protein* MIKROALGA *Chlorella vulgaris* YANG DIUJI SECARA IN VIVO PADA IKAN KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*) (dibawah bimbingan **Dr. UUN YANUHAR, S.Pi, M.Si dan Dr.Ir. MUHAMMAD MUSA, MS**).

*Chlorella* adalah genus ganggang hijau bersel tunggal yang hidup di air tawar, laut dan tempat basah. Banyak nutrisi yang terkandung didalam *C. vulgaris*, seperti *Fragmen Pigmen Protein* (FPP). Cara untuk memperoleh FPP dari dalam sel yaitu dengan mengisolasi protein menggunakan teknik manual maupun menggunakan teknologi seperti pemisahan molekul dengan sentrifuge. FPP 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 karena ikan belum mempunyai sistem imun secara sempurna.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian FPP dari mikroalga *C. vulgaris* yang diujikan secara in vivo pada ikan kerapu tikus dengan melihat ekspresi  $\beta$ -aktin. Metode yang digunakan dalam penelitian adalah eksperimen dengan 3 perlakuan berbeda yaitu pemberian FPP, penginjeksian VNN dan emberian FPP serta VNN. Selanjutnya analisa data menggunakan RAL dengan 3 kali pengulangan. Teknik pengambilan sampel dilakukan melalui beberapa tahapan, yaitu dimulai dengan melakukan kultur *C. vulgaris* yang selanjutnya dilanjutkan pada tahapan isolasi FPP *C. vulgaris*, uji profil FPP *C. vulgaris*, uji in vivo FPP pada ikan Kerapu Tikus, pengamatan ekspresi  $\beta$ -aktin pada organ hati ikan Kerapu Tikus dengan menggunakan Imunohistokimia (IHC). Data pendukung yang digunakan dalam penelitian ini adalah data kualitas air yang meliputi parameter fisika yang terdiri dari suhu dan parameter kimia yang terdiri dari pH, salinitas dan oksigen terlarut.

Hasil SDS-PAGE FPP *C. vulgaris* terdapat 4 band protein yaitu dengan berat molekul 33 kDa, 29 kDa, 21 kDa, dan 15 kDa. Berdasarkan hasil berat molekul yang tampak, dapat diindikasikan bahwa FPP dari mikroalga *C. vulgaris* merupakan *Piridin Chlorophyl Protein* (PCP) yang memiliki dua *piridin* yaitu bentuk monomer (bentuk panjang) dengan berat molekul 33 kDa dan bentuk homodimer (bentuk pendek) dengan berat molekul 15 kDa. Pengujian in vivo ikan dengan menggunakan FPP dilakukan sebanyak 6 kali selama 27 hari masa pemeliharaan. Yaitu pada hari ke-0 dengan dosis hari ke-0 (306  $\mu$ l), hari ke-6 (315  $\mu$ l), hari ke-9 (322  $\mu$ l), hari ke-14 (326  $\mu$ l), hari ke-19 (345  $\mu$ l) dan hari ke-24 (351  $\mu$ l).

Pengamatan ekspresi  $\beta$ -aktin pada organ hati ikan Kerapu Tikus dilakukan dengan menggunakan *immunoratio*. Pada organ hati ikan kontrol tampak warna kecoklatan yang menandakan adanya ekspresi  $\beta$ -aktin. Pada ikan kontrol DAB rata-rata ekspresi  $\beta$ -aktin sebesar 27,03%, pada ikan dengan pemberian FPP nilai rata-rata DAB sebesar 61%, dan ikan dengan penginjeksian VNN nilai DAB rata-ratanya sebesar 63,57%, serta terlihat adanya beberapa kerusakan yang terjadi seperti kerusakan vakuolis (ruang kosong) dan necrosis (pembengkakan). Sedangkan setelah diberikan perlakuan penginduksian FPP dan pemberian VNN terjadi peningkatan ekspresi  $\beta$ -aktin yang cukup tinggi yaitu sebesar 74,63 %. Hasil pengukuran kualitas air yaitu, suhu perairan berkisar antara 28 °C-31°C, salinitas berkisar antara 29‰-30‰,

pH memiliki nilai 7,6-7,9 sedangkan hasil pengukuran oksigen terlarut (DO) memiliki kisaran antara 5,3mg/l-6,2 mg/l.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah FPP yang ditemukan dalam *C. vulgaris* berupa PCP, yang memiliki dua *piridin* yaitu bentuk monomer (bentuk panjang) dengan berat molekul 33 kDa dan bentuk homodimer (bentuk pendek) dengan massa molekul (berat molekul) 15 kDa. Pemberian Fragmen pigmen protein (FPP) mikroalga *C. vulgaris* mampu meningkatkan ekspresi  $\beta$ -aktin. Pada ikan kontrol DAB rata-rata ekspresi  $\beta$ -aktin sebesar 27,03%, pada ikan dengan pemberian FPP nilai rata-rata DAB sebesar 61%, ikan dengan penginfeksi VNN nilai DAB rata-ratanya sebesar 63,57%, dan ikan dengan penginduksian FPP dan penginfeksi VNN nilai DAB rata-ratanya sebesar 74,63%. *Peridinin chlorophyll protein* (PCP) yang terkandung dalam *C. vulgaris* mampu menjadi biokatalisator terekpresinya  $\beta$ -aktin. Peningkatan ekspresi  $\beta$ -aktin dalam penelitian ini menjadi indikator peningkatan respon imun pada ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*).

Saran yang dapat diberikan pada penelitian ini adalah Perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mengeksplorasi pemanfaatan sumberdaya hayati laut dalam menanggulangi serangan penyakit dan virus yang menyerang ikan kerapu tikus. Dalam penelitian dan pengkajian secara biologi molekuler tentang fungsi genomik dan proteomik dalam pembentukan gen-gen antivirus.



## KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan syukur kehadiran Allah SWT karena atas berkat limpahan rahmat, taufik dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan laporan skripsi yang berjudul PEMANFAATAN *Fragmen Pigmen Protein MIKROALGA Chlorella vulgaris* YANG DIUJI SECARA IN VIVO PADA IKAN KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*). 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, Agustus 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>LEMBAR PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>PERNYATAAN ORISINALITAS</b> .....	iii
<b>UCAPAN TERIMA KASIH</b> .....	iv
<b>LEMBAR KHUSUS</b> .....	iv
<b>RINGKASAN</b> .....	vi
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	viii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xiii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xv
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	xvi
<b>DAFTAR ISTILAH</b> .....	xvii
<b>1. PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.4 Manfaat .....	3
1.5 Waktu dan Tempat .....	3
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Mikroalga <i>Chlorella vulgaris</i>	
2.1.1 Klasifikasi .....	5
2.1.2 Morfologi .....	5
2.1.3 Biologi dan Habitat .....	6
2.1.4 Fase Pertumbuhan .....	10
2.1.5 Fakto-faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan .....	12
2.2 Fragmen Pigmen Protein.....	15
2.3 Ikan Kerapu Tikus ( <i>Cromileptes altivelis</i> )	

2.3.1 Klasifikasi .....	16
2.3.2 Morfologi .....	16
2.3.3 Habitat dan Penyebaran .....	17
2.3.4 Reproduksi .....	18
2.3.5 Kebiasaan Makan dan Makanannya .....	18
2.3.6 Kualitas Air Ikan Kerapu Tikus .....	19
2.4 Sistem Pertahanan Tubuh Ikan	
2.4.1 Sistem Imun Non Spesifik .....	22
2.4.2 Sistem Imun Spesifik .....	23
2.5 $\beta$ aktin .....	25
2.6 Viral Nervous .....	27
2.6.1 Karakteristik VNN .....	28
2.6.2 Gejala Klinis dan Faktor Penyebab VNN .....	28
2.6.3 Transmisi dan Mekanisme Infeksi VNN .....	29

### 3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian .....	31
3.2 Alat dan Bahan	
3.2.1 Alat .....	31
3.2.2 Bahan .....	31
3.3 Metode Penelitian	
3.3.1 Teknik Pengambilan Data .....	31
3.3.1.1 Data Primer .....	32
3.3.1.2 Data Sekunder .....	33
3.4 Prosedur Penelitian	
3.4.1 Sterilisasi Alat .....	33
3.4.2 Kultur Mikroalga <i>C. vulgaris</i> .....	34
3.4.3 Isolasi Protein <i>C. vulgaris</i> .....	36
3.4.4 Elektroforesis Protein dengan Metode SDS-PAGE .....	37
3.4.4.1 Menyiapkan Sampel .....	37
3.4.4.2 Pembuatan Media/Gel Elektroforesis SDS-PAGE .....	37
3.4.4.3 Running Elektroforesis SDS-PAGE .....	39
3.4.4.4 Running Sampel .....	39
3.4.4.5 Pewarnaan Media/Gel Hasil SDS-PAGE .....	40
3.4.5 Pengukuran Berat Molekul Protein Sampel .....	41
3.4.6 Aklimatisasi Ikan Kerapu Tikus .....	41
3.4.7 Pengukuran Kualitas Air .....	42
A. Parameter Fisika Air .....	42
B. Parameter Kimia Air .....	42
3.4.8 Uji In-vivo FPP Pada Ikan Kerapu Tikus .....	44
3.4.9 Imunohistokimia (IHC) .....	44
3.4.10 Analisa Data .....	46

### 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

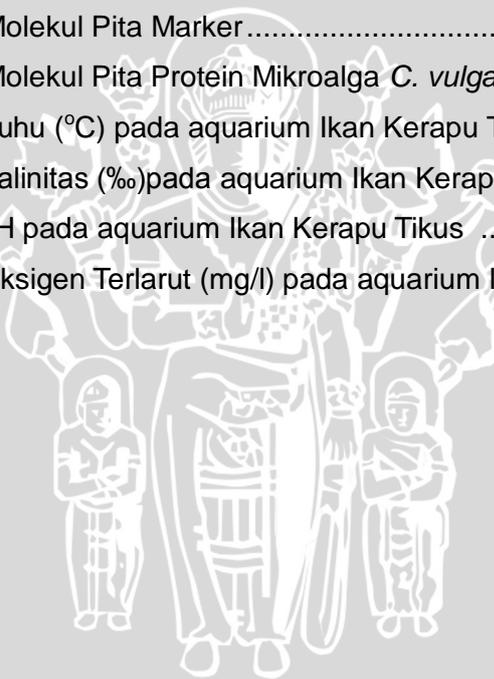
4.1 Kultur Mikroalga <i>C. vulgaris</i> .....	49
4.2 Isolasi FPP <i>C. vulgaris</i> .....	52

4.3 Profil FPP <i>C. vulgaris</i> .....	54
4.4 Pengujian In Vivo Ikan Kerapu Tikus .....	56
4.5 Profil $\beta$ aktin pada Organ Ikan kerapu Tikus .....	57
4.5.1 Organ Hati Ikan Perlakuan Kontrol .....	57
4.5.2 Organ Hati Ikan Perlakuan FPP .....	60
4.5.3 Organ Hati Ikan Perlakuan VNN .....	62
4.5.4 Organ Hati Ikan Perlakuan FPP dan VNN .....	64
4.6 Analisa Data .....	67
4.7 Mekanisme $\beta$ aktin pada Sel Ikan Kerapu Tikus .....	68
4.8 Analisa Kualitas Perairan Pemeliharaan <i>C. altivelis</i> .....	71
<b>5 KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
5.1 Kesimpulan .....	76
5.2 Saran .....	76
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	77
<b>LAMPIRAN</b> .....	83



DAFTAR TABEL

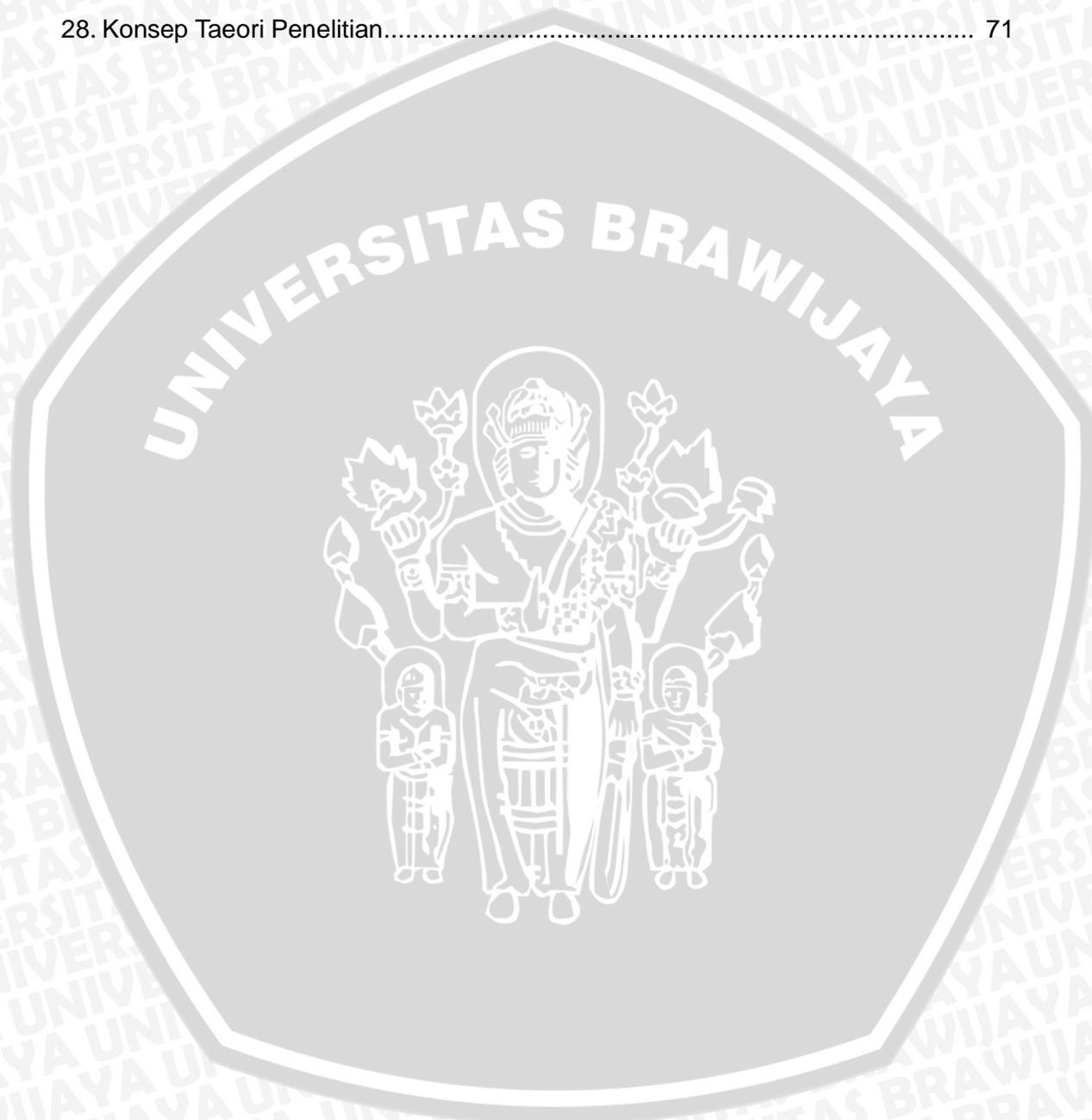
Tabel	Halaman
1. Profil Asam Amino pada <i>C.vulgaris</i> .....	7
2. Komposisi Gula Sederhana pada Dinding <i>C. vulgaris</i> .....	8
3. Potensi Pigmen pada <i>C. vulgaris</i> dalam Kondisi Optimal .....	9
4. Komposisi Mineral dan Vitamin <i>C. vulgaris</i> .....	9
5. Perbandingan Komposisi Nutrisi Medium Pembiakan .....	12
6. Analisa Sidik Ragam .....	47
7. Analisa of Varian (ANOVA).....	47
8. Perhitungan Berat Molekul Pita Marker .....	55
9. Perhitungan Berat Molekul Pita Protein Mikroalga <i>C. vulgaris</i> .....	56
10. Hasil Pengukuran Suhu (°C) pada aquarium Ikan Kerapu Tikus .....	72
11. Hasil Pengukuran Salinitas (‰) pada aquarium Ikan Kerapu Tikus .....	73
12. Hasil Pengukuran pH pada aquarium Ikan Kerapu Tikus .....	74
13. Hasil Pengukuran Oksigen Terlarut (mg/l) pada aquarium Ikan Kerapu Tikus .	75



DAFTAR GAMBAR

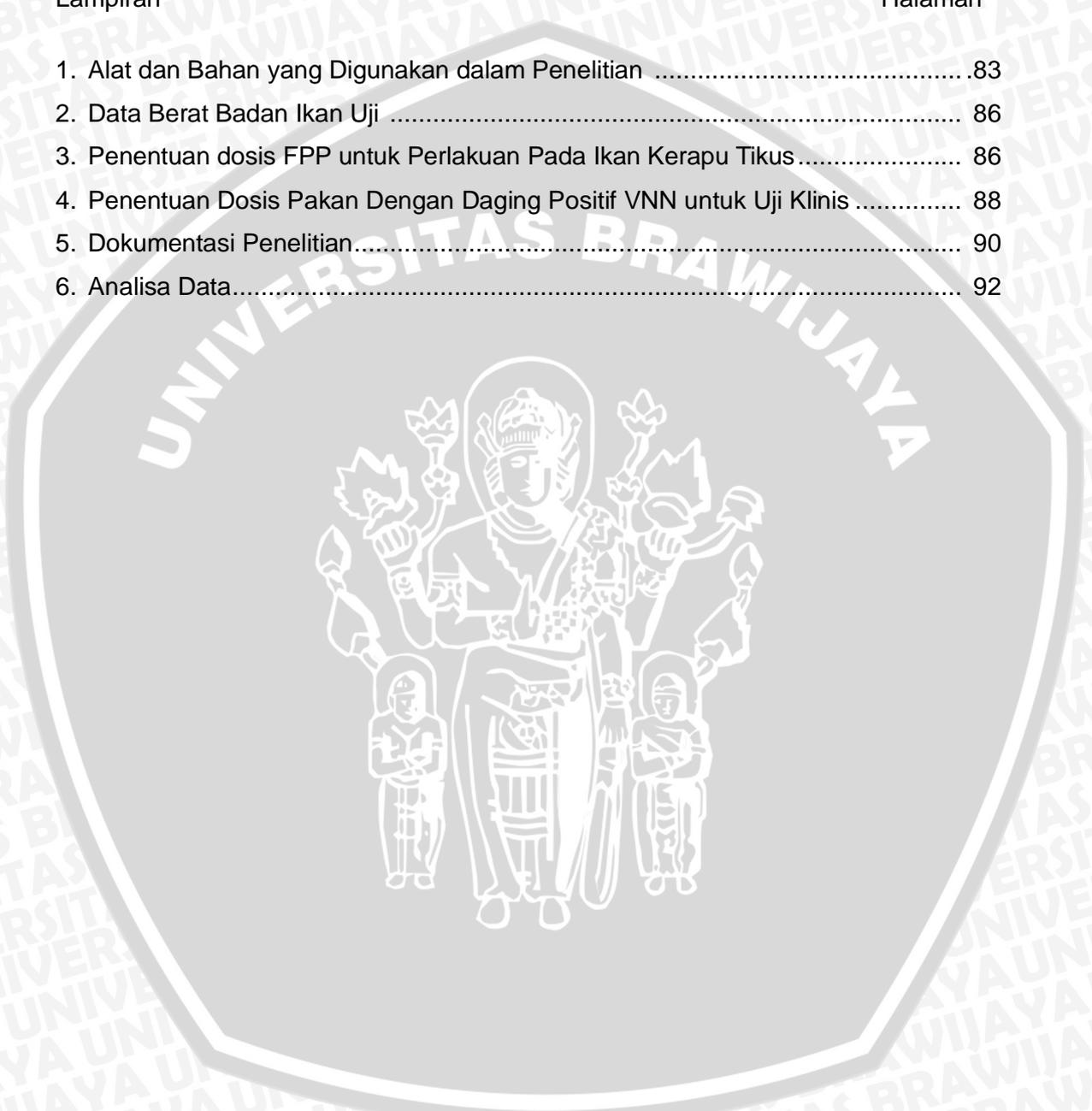
Gambar	Halaman
1. <i>Cholrella vulgaris</i> .....	4
2. Struktur Sel <i>C. vulgaris</i> .....	5
3. Kurva Pertumbuhan <i>C. Vulgaris</i> .....	10
4. Morfologi ikan kerapu tikus ( <i>Cromileptes altivelis</i> ) .....	17
5. Sel T pembunuh.....	25
6. Remodelling $\beta$ -aktin .....	27
7. Viral Nervous Necrosis.....	28
8. Siklus transmisi VNN.....	30
9. Inokulasi.....	49
10. Kultur Murni 1 dengan menggunakan toples berkapasitas 1liter .....	50
11. (A) Pemindahan bibit ke dalam toples berukuran 10 liter serta pemberian pupuk dan vitamin (B) Kultur murni 2 .....	51
12. Tahap kultur intermediet atau semi massal .....	51
13. (A) Bubur <i>C. vulgaris</i> yang disimpan dalam falcon 50 ml (b) pemberian nitrogen cair .....	52
14. Proses (A) Penggerusan sampel (B) Hasil supernatan proses sentrifuge .....	53
15. (A) Marker (B) Hasil SDS-PAGE Protein <i>C. vulgaris</i> .....	54
16. Grafik linear pita protein marker <i>C. vulgaris</i> .....	55
17. Teknik penyondean FPP pada ikan kerapu tikus ( <i>C. altivelis</i> ).....	57
18. Hasil Pengamatan Profil organ hati ikan kontrol .....	58
19. Grafik dan histogram dengan menggunakan software imageJ pada organ hati ikan kontrol .....	59
20. Hasil Pengamatan Profil organ hati ikan perlakuan FPP .....	60
21. Grafik dan histogram dengan menggunakan software imageJ pada organ hati ikan perlakuan FPP .....	61
22. Hasil Pengamatan Profil organ hati ikan perlakuan VNN.....	62
23. Grafik dan histogram dengan menggunakan software imageJ pada organ hati ikan perlakuan VNN .....	63

24. Hasil Pengamatan Profil organ hati ikan perlakuan FPP dan VNN .....	64
25. Grafik dan histogram dengan menggunakan software imageJ pada organ hati ikan perlakuan FPP dan VNN.....	65
26. Grafik Perubahan Ekspresi $\beta$ -aktin pada setiap perlakuan .....	66
27. Mekanisme Perubahan Dinamika $\beta$ -aktin Akibat Penginduksian FPP .....	70
28. Konsep Taeori Penelitian.....	71



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alat dan Bahan yang Digunakan dalam Penelitian .....	83
2. Data Berat Badan Ikan Uji .....	86
3. Penentuan dosis FPP untuk Perlakuan Pada Ikan Kerapu Tikus.....	86
4. Penentuan Dosis Pakan Dengan Daging Positif VNN untuk Uji Klinis .....	88
5. Dokumentasi Penelitian.....	90
6. Analisa Data.....	92



## DAFTAR SINGKATAN

µl	mikro liter
µm	Mikro meter
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
BM	Berat Molekul
BBAP	Balai Budidaya Air Laut
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	<i>Etilen Diamin Tetra Acetat</i>
Ig	<i>Imunoglobulin</i>
IHK	Immunohisto Kimia
kDa	kilo Dalton
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
TLR	<i>Toll Like Receptor</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>
FPP	<i>Fragmen Pigmen Protein</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>
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>

## DAFTAR ISTILAH

$\beta$ - aktin	Gen <i>Houskeeping</i> dan merupakan bagian penting dari sitoskeleton sel, yang terkespresi pada hampir semua sel eukariotik dan terlibat dalam mengendalikan fungsi dasar pembenahan seperti penyusunan dan pemeliharaan bentuk sel, migrasi, pembelahan, perkembangan dan pensinyalan sel.
<i>Adhesin</i>	Satu dari kelompok protein seperti <i>fibronectin</i> , <i>kollagen</i> , dan <i>fibrinogen</i> yang berada di <i>extraselluler matrik</i>
Aktin	Protein globular dengan massa sekitar 42-kDa yang memiliki berbagai fungsi dasar mikgrasi sel hingga transpor membran.
<i>Antibodi</i>	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.
<i>Antiviral</i>	Suatu agen yang secara eksperimental menghambat proliferasi dan kelangsungan hidup virus menular
<i>Histopatologi</i>	Gambaran keadaan jaringan organisme yang terpapar patogen
<i>Infeksi</i>	Pengenalan agen infeksi seperti virus atau bakteri ke dalam host sel atau organisme.
<i>Isolasi</i>	Memisahkan dan memurnikan suatu substansi
<i>Jaringan</i>	Sekumpulan sel yang tersimpan dalam suatu kerangka struktur atau matriks yang mempunyai suatu kesatuan organisasi yang mampu mempertahankan keutuhan dan penyesuaian terhadap lingkungan di luar batas dirinya
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
<i>Necrosis</i>	Sekelompok sel yang mengalami perubahan atau kematian tanpa terprogram

Vacuolis	Adanya ruang kosong pada jaringan
Organ	Sekumpulan sel atau sekumpulan jaringan dapat dikombinasikan menjadi suatu struktur untuk mengerjakan fungsi tertentu di dalam tubuh
Sistem Imun	System pertahanan atau kekebalan tubuh, yang terdiri dari Sistem imun <i>Innate</i> dan Sistem imun <i>Adaptive</i>
Sistem imun Spesifik	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 Non spesifik	Sistem kekebalan alami atau system imun non spesifik yang merupakan pertahanan tubuh terdepan dalam menghadapi berbagai antigen.
Sitokin	Sitokin merupakan glikoprotein yang dapat larut ketika dilepaskan oleh sel system immune (disekresi terutama dari leukosit) yang berperan dalam non <i>enzmatically</i> reseptor spesifik untuk meregulasi respon imun.
Sitoskeleton	Jaringan berkas-berkas protein yang menyusun sitoplasma dalam sel eukariotik maupun prokariotik.
Toll Like Receptor (TLR)	Reseptor pada membran sel atau kelompok protein pada membran sel sebagai reseptor yang secara luas mengenal molekul mikroba serta dapat stimulasi respon innate imun bawaan
Vertebrata	mencakup semua hewan yang memiliki tulang belakang yang tersusun dari vertebra, vertebrata memiliki sistem otot yang banyak terdiri dari pasangan massa, dan juga sistem saraf pusat yang biasanya terletak di dalam tulang belakang.
Virus	Suatu partikel yang mengandung bahan genetik berupa DNA atau RNA yang diselubungi oleh protein dan pada beberapa virus ada juga komponen lain, misalnya lemak

## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Di Indonesia budidaya Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) banyak dilakukan dan populer karena dianggap memiliki nilai ekonomi yang tinggi. Namun, para pembudidaya Ikan Kerapu Tikus dihadapkan dengan kendala yang muncul, salah satunya meluasnya penyakit dalam usaha budidaya yang diakibatkan oleh bakteri atau virus. Sehingga terjadi kematian massal yang mencapai 80% bahkan hingga 100%. Virus yang menyerang pada budidaya *C. altivelis* salah satunya adalah Viral Nervous Necrosis Virus (VNN). Virus ini salah satu penyebab hilangnya industri budidaya kerapu. VNN melemahkan sistem saraf ikan sehingga ikan akan kehilangan saraf kontrol, terjadi kelemahan gerak, dan akhirnya kematian (Yanuhar, 2011).

Berbagai penelitian mengenai penanggulangan penyakit dan virus banyak dilakukan para petani ikan untuk meminimalisir tingkat kerugian. Saat ini penanggulangan penyakit atau virus yang menyerang saat budidaya ikan kerapu tikus masih terbatas pada penggunaan bahan-bahan kimia. Pada umumnya bahan-bahan kimia tersebut tidak selektif sehingga dikawatirkan akan berdampak pada menurunnya mutu lingkungan dan bersifat resisten pada patogen (Yanuhar, 2009).

Salah satu makhluk hidup yang dapat digunakan sebagai bahan imunostimulan adalah alga. Secara biologis, alga merupakan kelompok tumbuhan yang berklorofil terdiri dari satu atau banyak sel dan berbentuk koloni. Di dalam alga terkandung bahan-bahan organik seperti hormon, vitamin, mineral, polisakarida dan senyawa bioaktif. Budidaya mikroalga sangat menarik karena tingkat pertumbuhannya yang tinggi, maupun menyesuaikan pada kondisi lingkungan yang bervariasi (Meritasari *et al*, 2010).

Salah satu jenis mikroalga yang sering dibudidayakan secara kontinyu adalah *Chlorella vulgaris*. *C. vulgaris* termasuk golongan alga hijau (*chlorophyta*) yang sering dijumpai disemua habitat air tawar serta air laut. Mikroalga ini memiliki komposisi yang terdiri 27% protein, 9,2% lemak, 15,4% selulosa, 31% hemiselulsa, 3,3% glukosamin dan abu yang banyak yang mengandung besi serta kapur (Harnadiemas, 2012). *C. vulgaris* juga memiliki beberapa jenis pigmen antara lain seperti  $\beta$ - karoten, astaxanthin, cantaxanthin, lutein, chlorophyll-  $\alpha$ , chlorophyll  $\beta$ , pheophytin-  $\alpha$  serta violaxantin (Safi *et al.*, 2014).

*Fragmen Pigmen Protein* juga merupakan komponen penyusun *C. vulgaris*. FPP merupakan protein dan pigmen dalam bentuk RNA atau enzim. Jenis fragmen pigmen protein dalam *C. vulgaris* seperti violaxanthin dan  $\beta$ -karoten merupakan jenis karotenoid yang memiliki kandungan antioksidan tinggi (Biehler *et al.*, 2012). Karotenoid dapat digunakan sebagai antivirus yang dapat membantu sel natural killer (NK) dalam membunuh virus yang menginfeksi tubuh ikan. Pada salah satu penelitian yang dilakukan Yanuhar (2015), menyatakan bahwa FPP dapat dikembangkan dan diaplikasikan sebagai antiviral dan anti-inflamasi pada infeksi virus pada ikan kerapu.

Di Indonesia FPP belum banyak dieksplor tentang fungsi dan pengaplikasiaannya. Berdasarkan penjelasan diatas, maka penting untuk dilakukan penelitian tentang pemanfaatan aplikasi FPP dari mikroalga *C. vulgaris* yang akan diujikan dengan menggunakan metode in vivo pada ikan kerapu tikus. Dalam penelitian ini FPP dari *C. vulgaris* diharapkan dapat berperan sebagai *inducer* (senyawa yang dapat mengaktifkan gen spesifik) pada sistem kekebalan tubuh ikan *C. altivelis*.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas maka dapat dirumuskan masalah dalam penelitian ini adalah apakah pemberian FPP dari mikroalga *C. vulgaris* dapat meningkatkan ekspresi  $\beta$ -aktin sebagai penanda respon peningkatan sistem imun tubuh ikan kerapu tikus.

## 1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian FPP dari mikroalga *C. vulgaris* yang diujikan secara in vivo pada ikan kerapu tikus dengan melihat ekspresi  $\beta$ -aktin.

## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Manfaat Teoritis

Memberikan informasi mengenai FPP yang diisolasi dari Mikroalga *C. vulgaris* baik dari segi profil protein hingga berat molekul sehingga dapat dilakukan eksplorasi potensi *Pigmen Protein* sebagai *inducer* ekspresi  $\beta$ - aktin yang mengindikasikan peningkatan sistem imun pada ikan kerapu tikus.

### 1.4.2 Manfaat Praktis

Sebagai langkah awal dalam menyusun suatu protein rekombinan berbahan materi hayati untuk selanjutnya dapat digunakan dalam perancangan vaksin untuk ikan kerapu atau spesies ikan lain terhadap infeksi penyakit maupun virus.

## 1.5 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Lingkungan dan Bioteknologi Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya dan Balai Budidaya Air Payau (BBAP) Situbondo, pada bulan Mei-Juni 2015.

## 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Mikroalga *Chlorella vulgaris*

Mikroalga adalah alga kecil berukuran 2-20  $\mu\text{m}$  berupa tanaman talus yang berklorofil sehingga mampu untuk melakukan proses fotosintesis. Mikroalga bereproduksi secara aseksual melalui pembelahan sel. Mikroalga ini banyak dikultur di berbagai Negara yang memiliki industri akuakultur seperti Indonesia, Thailand, Jepang, dan beberapa Negara di kawasan Eropa (Wijoseno, 2011).

*Chlorella* merupakan alga dengan kategori sel eukariotik yang hidup di dalam air bersih sebagai tanaman bersel tunggal yang memiliki nucleus dan klorofil. Nama *Chlorella* berasal dari bahasa latin yaitu "*chloros*" yang berarti hijau dan "*ella*" yang berarti kecil. Jadi *Chlorella* adalah suatu sel yang sangat kecil dan berwarna hijau. Karakteristik warna hijau tua-emerald *Chlorella* disebabkan karena sangat kaya akan klorofil (Najmuddin, 2011).

*Chlorella* adalah genus gangga hijau bersel tunggal yang hidup diartawar, laut dan tempat basah. *Chlorella* merupakan mikroorganisme yang termasuk dalam filum *Chlorophyta*. Dari sekian banyak spesies *Chlorella* yang paling sering dikembangkan dan digunakan dalam penelitian adalah *Chlorella vulgaris*. *C. vulgaris* hidup secara koloni dalam jumlah besar (Najmuddin, 2011).



**Gambar 1.** *Chlorella vulgaris* (Sumber : Google image, 2015)

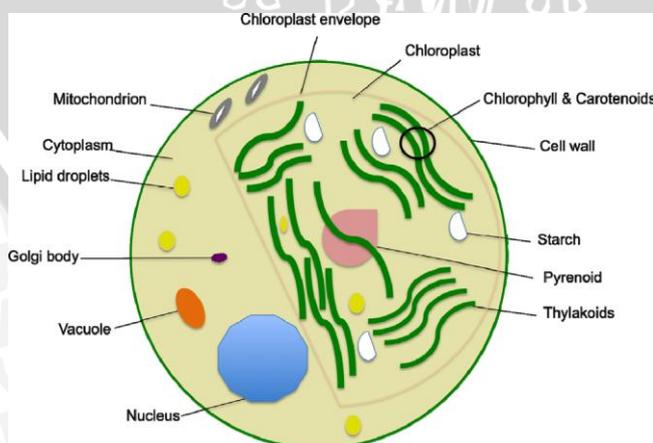
### 2.1.1 Klasifikasi

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

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

### 2.1.2 Morfologi

*C.vulgaris* merupakan alga yang termasuk kedalam organisme uniselular. Memiliki jenis sel eukariotik dengan kemampuan fotosintesis untuk menghasilkan makanannya. *C.vulgaris* memiliki bentuk sel yang bulat, bulat lonjong dengan garis tengah antar 2-8  $\mu\text{m}$ . Didalam tubuhnya terdapat kloroplas berbentuk mangkuk atau cawan dengan dinding yang keras dan padat (Amini *et al*, 2006). Dinding sel mikroalga ini tersusun atas selulosa (Wijoseno, 2011). Struktur sel *C.vulgaris* dapat dilihat pada gambar 2 berikut:



**Gambar 2.** Struktur Sel *C.vulgaris* (Sumber : Safi *et al.*, 2014)

a) Dinding sel

Kekakuan dinding sel pada dasarnya untuk melindungi inti sel dari luar. Kekerasan dinding sel bervariasi tergantung pada masing-masing fase pertumbuhan. Pada informasi awal, dinding sel yang terbentuk masih rapuh, membentuk 2 nm elektron tipis. Dinding sel secara bertahap akan meningkat ketebalannya sampai mencapai 17-21 nm, dimana lapisan mikrobial akan terbentuk dan melapisi kitosan yang terdiri atas glukosamin.

b) Sitoplasma

Sitoplasma merupakan zat yang menghalangi membran sel yang terdiri dari air, protein larut dan mineral. Didalam internal organel *C.vulgaris* terdapat mitokondria, nukleus kecil, kloroplas tunggal dan badan golgi.

c) Mitokondria

Setiap mitokondria mengandung beberapa bahan genetik, membran terluar mengelilingi seluruh organel dan terdiri dari rasio yang sama dari protein dan fosfolipid yang mengelilingi ruang internal yang disebut matriks. Matriks mengandung mayoritas protein dari mitokondria.

d) Kloroplas

*C.vulgaris* memiliki kloroplas tunggal dengan pembungkus membran yang terdiri dari fosfolipid. Membran terluar merupakan membran permeabel untuk metabolisme ion, tetapi memiliki fungsi yang lebih spesifik pada transportasi protein. Kloroplas juga menyimpan sebuah kluster tilakoid yang menyatu dalam pigmen klorofil dimana didominasi oleh warna pigmen seperti lutein.

### 2.1.3 Biologi Dan Habitat

Pada umumnya *Chlorella* bersifat planktonis yang hidupnya melayang-layang di perairan. *C. vulgaris* termasuk golongan alga hijau (*chlorophyta*) yang sering dijumpai disemua habitat air tawar serta air laut (Harnadiemas, 2012).

Menurut Safi *et al.*, (2014) menyatakan bahwa *C. vulgaris* memiliki komposisi utama seperti protein, lemak, karbohidrat, pigmen, mineral dan vitamin.

a. Protein

Protein sangat penting dalam kimia mikroalga. Protein sangat penting bagi pertumbuhan, perbaikan, dan pemeliharaan sel. *C. vulgaris* memiliki kandungan protein sebesar 42-58%. Hampir 20% dari total protein terikat pada dinding sel, lebih dari 50% berada pada internal sel dan 30% bermigrasi keluar masuk sel. Dengan menggunakan SDS PAGE berat molekul *C. vulgaris* terdiri antara 12-120 kDa dengan mayoritas memiliki berat antara 39-75 kDa. Profil asam amino dari *C. vulgaris* dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 1.** Profil asam amino pada *C. vulgaris*

Asam Amino	<i>C. vulgaris</i>
Asam Aspartic	9.30
Theoronine	5.30
Serine	5.80
Asam Glutamic	13.70
Glycine	6.30
Alanine	9.40
Valine	7.00
Methionine	1.30
Isoleusine	3.20
Leusine	9.5
Tyrosine	2.80
Phenylalanine	5.50
Histidine	2.00
Lysine	6.40
Arginine	6.90
Proline	5.00

b. Lemak

Lemak merupakan salah satu komposisi dari *C. vulgaris* yang bersifat larut dalam pelarut non-polar dan relative larut dalam air. Dalam kondisi pertumbuhan yang optimal, kandungan lemak *C. vulgaris* dapat mencapai 5-40% berat kering

per biomasa. *C. vulgaris* terdiri dari glikolipid, lilin, hidrokarbon, fosfolipid dan asam lemak bebas dalam jumlah yang sedikit.

#### c. Karbohidrat

Karbohidrat merupakan sekelompok mengurangi gula dan polisakarida seperti pati dan selulosa. Polisakarida yang paling melimpah pada *C. vulgaris* adalah zat pati. *C. vulgaris* juga memiliki dinding sel yang sangat kuat yang tersusun atas kitosan seperti lapisan selulosa, hemiselulosa, lipid dan mineral. Kandungan karbohidrat dalam *C. vulgaris* dapat mencapai 12-55%. Komposisi gula dari dinding sel *C. vulgaris* terdiri atas campuran dari rhamnose, galaktosa, glukosa, xilosa, arabinosa dan manosa, dimana rhamnose merupakan komposisi gula yang paling dominan. Komposisi kadar gula pada dinding sel *C. vulgaris* dapat dilihat pada tabel 2 berikut.

**Tabel 2.** Komposisi gula sederhana pada dinding sel *C. vulgaris*

Gula Alami	Presentase
Rhamnose	45-54
Arabinose	2-9
Xylose	7-19
Manose	2-7
Glactose	14-26
Glucose	1-4

#### d. Pigmen

Pigmen yang paling melimpah pada *C. vulgaris* adalah klorofil yang mencapai 1-2%. Klorofil pada *C. vulgaris* terletak dalam tilakoid. *C. vulgaris* juga mengandung sejumlah karotenoid penting yang bertindak sebagai aksesoris pigmen yang berfungsi menangkap cahaya yang berfungsi dalam proses fotosintesis. Beberapa jenis pigmen yang terdapat dalam *C. vulgaris* antara lain

seperti  $\beta$ - karoten, astaxanthin, cantaxanthin, lutein, chlorophyll-  $\alpha$ , chlorophyll  $\beta$ , pheophytin -  $\alpha$  serta violaxantin. Kadar pigmen dalam *C. vulgaris* dapat dilihat pada tabel 3.

**Tabel 3.** Potensial Pigmen pada *C.vulgaris* dalam kondisi optimal

Pigmen	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (dw)
$\beta$ - karoten	7-12000
Astaxanthin	550000
Cantaxanthin	362000
Lutein	52-3830
Chlorophyll- $\alpha$	250-9630
Chlorophyll- $\beta$	72-5770
Pheophytin- $\alpha$	2310-5640
Pheophytin- $\beta$	N/A
Violaxanthin	10-37

e. Mineral dan vitamin

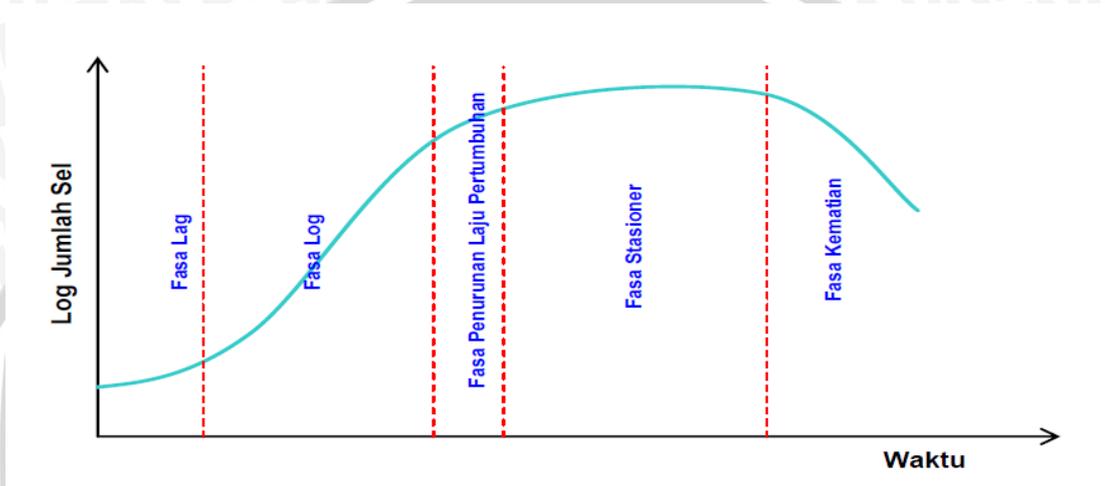
*C. vulgaris* memiliki kandungan mineral seperti K, Ca, Mg, dan Fe serta memiliki profil vitamin penting yang merupakan elemen kunci untuk pertumbuhan sel dan diferensiasi dan memiliki aktivitas antioksidan. Komposisi Mineral dan vitamin dalam *C. vulgaris* dapat dilihat pada tabel 4 berikut.

**Tabel 4.** Komposisi Mineral dan Vitamin *C. vulgaris*

Mineral	Kadar (mg/100 g)	Vitamin	Kadar (mg/100 g)
Kalsium	321-604	Betakaroten	3.3-11.2
Magnesium	273-325	Vitamin B1	0.5-1.0
Seng	4-6	Vitamin B2	3.2-3.8
Besi	40-70	Vitamin B6	0.3-3.7
Kalium	10002900	Vitamin B12	0.2-1.0
Iodium	< 0.0005	Vitamin E	3.6-10.0
Selenium	2-10		

### 2.1.4 Fase Pertumbuhan

*C. vulgaris* memiliki lima fase dalam pertumbuhannya, yaitu fase lag, fase eksponensial (logaritmik), fase penurunan laju pertumbuhan, fase stasioner, dan fase kematian. Kelima fase tersebut dapat ditunjukkan dengan kurva jumlah sel terhadap waktu seperti pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Kurva Pertumbuhan *C. vulgaris* (Sumber: Kusumawardani, 2013).

a) Fase tunda (Fase Lag)

Fase ini merupakan fase pertama pada pertumbuhan mikroalga saat kultivasi. Fase ini terjadi setelah pemberian inokulum ke dalam media kultur, dimana terjadi penundaan pertumbuhan karena sel *Chlorella* memerlukan penyesuaian dengan lingkungan atau medium yang baru sebelum memulai pembiakan (pembelahan). Penyesuaian dalam hal ini berarti suatu masa ketika sel-sel kekurangan metabolit dan enzim akibat keadaan yang tidak menguntungkan dalam pembiakan sebelumnya. Pada fase ini tidak terjadi penambahan jumlah sel.

b) Fase Eksponensial (Logaritmik)

Selama fase ini sel membelah dengan cepat, sel-sel berada dalam keadaan stabil, dan jumlah sel bertambah dengan kecepatan konstan. Bahan sel baru terbentuk dengan laju tetap, akan tetapi bahan-bahan tersebut bersifat katalitik

dan massa bertambah secara eksponensial. Hal ini bergantung pada satu dari dua hal terjadi, yaitu kalau tidak satu atau lebih zat makanan dalam pembenihan habis, maka tentu hasil metabolisme beracun akan tertimbun dan menghambat pertumbuhan.

c) Fase penurunan laju pertumbuhan

Pada fase ini, laju pertumbuhan sel menurun. Penurunan ini terjadi akibat adanya kompetisi yang tinggi dalam media hidup dan zat makanan yang tersedia dalam media tidak mencukupi kebutuhan populasi yang bertambah dengan cepat pada fase eksponensial. Akibatnya hanya sebagian dari populasi yang mendapatkan cukup nutrisi untuk tumbuh dan membelah diri. Nutrien, pH, karbondioksida atau komponen fisika ataupun kimia lainnya juga menjadi faktor yang membatasi pertumbuhan.

d) Fase Stasioner

Selama fase ini jumlah sel cenderung konstan. Hal ini disebabkan oleh habisnya nutrisi dalam medium atau karena menumpuknya hasil metabolisme yang beracun sehingga mengakibatkan pertumbuhan berhenti. Dalam kebanyakan kasus, pergantian sel terjadi dalam fase stasioner. Pada fase ini, adanya kehilangan sel yang lambat karena kematian yang diimbangi oleh pembentukan sel-sel yang baru melalui pembelahan. Bila hal ini terjadi, maka jumlah sel akan bertambah secara lambat, meskipun jumlah sel hidup tetap.

e) Fase Kematian

Pada fase ini jumlah populasi menurun. Jumlah sel yang mati per satuan waktu perlahan-lahan bertambah dan akhirnya kecepatan mati dari sel-sel menjadi konstan. Hal ini ditandai dengan perubahan kondisi operasi dimana kualitas air memburuk dan kandungan nutrien terus menurun sehingga tidak mampu melangsungkan pertumbuhan. Pada umumnya warna air ada media

kultivasi akan berubah, terjadi buih di permukaan media kultivasi dan warna yang pudar serta gumpalan mikrialga yang mengendap di dasar bioreaktor.

### 2.1.5 Faktor –faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan

Seperti halnya organismelainnya, pertumbuhan *C. vulgaris* sangat erat kaitannya dengan media hidup maupun ketersediaan unsur hara serta dipengaruhi oleh kondisi lingkungan sebagai faktor pembatas. Dibawah ini merupakan beberapa faktor yang mempengaruhi pertumbuhan miroalga *C. vulgaris* antara lain:

#### 1) Jenis medium

Medium pembiakan sangat berpengaruh dalam pertumbuhan *Chlorella*. Apabila nutrisi dan medium tidak mencukupi, maka akan berdampak pula pada laju pertumbuhan yang melambat. Sehingga, medium pembiakan seharusnya memiliki berbagai nutrisi yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan *Chlorella* agar komposisi dari medium yang diberikan harus sesuai (Najmuddin, 2011). Terdapat beberapa medium yang sering digunakan dalam pembiakan *C. vulgaris* yang ditampilkan pada tabel 5.

**Tabel 5.** Perbandingan Komposisi Nutrisi Medium Pembiakan *C. vulgaris* (Sumber: Wirosaputro, 2002 dalam Najmuddin, 2011)

Bahan	Benneck mg/L	Detmer mg/L	Komersial mg/L	Walne mg/L
MgSO <sub>4</sub>	100	550	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200	250	-	-
NaNO <sub>3</sub>	500	-	-	100
FeCl <sub>3</sub>	3-5	-	-	1,3
KCl	-	250	40	-
Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-	1000	-	-
CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	-	-	800	-
Na <sub>2</sub> EDTA	-	-	-	45
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	-	-	-	33,6
TSP	-	-	15	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	-	20
MnCl <sub>2</sub>	-	-	-	0,36

Dalam pembiakannya mikroalga mendapatkan nutrisi dari air laut yang telah mengandung nutrisi yang cukup kompleks. Namun dalam pengkulturan, pertumbuhan mikroalga dapat mencapai optimum dengan mencampur air laut dengan nutrisi yang belum terdapat dalam air laut tersebut. Nutrisi tersebut dapat dibagi menjadi 2 yaitu makronutrisi dan mikronutrisi. Makronutrisi meliputi nitrat dan fosfat yang merupakan pupuk dasar yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga. Sedangkan mikronutrisi merupakan kombinasi dari beberapa vitamin yang berbeda seperti B12, B1, dan Biotin (Claudia, 2012).

## 2) Suhu

Suhu merupakan salah satu faktor pembatas yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga. Perubahan suhu berpengaruh terhadap proses kimia, fisika dan biologi. Dimana suhu berpengaruh pada jumlah oksigen yang terdapat didalam air, menurunkan suatu kelarutan bahan serta mempengaruhi tingkat metabolisme mikroalga. Menurut Wijoseno (2011), kisaran suhu optimal bagi pertumbuhan *C. vulgaris* adalah 23-30°C.

Dalam kultur mikroalga, suhu diatur sedemikian rupa tergantung pada media yang digunakan. Suhu diatas 36°C dapat menyebabkan kematian saat pengkulturan, sedangkan suhu dibawah 16°C dapat menyebabkan penurunan kecepatan pertumbuhan.

## 3) Derajat Keasaman

Derajat keasaman atau yang sering disebut pH digambarkan sebagai keberadaan ion hidrogen. pH akan mempengaruhi toksisitas semua senyawa kimia. Variasi pH dalam media kultur dapat berpengaruh pada metabolisme serta pertumbuhan mikroalga dalam beberapa hal, yaitu antara lain mengubah keseimbangan dari karbon organik, mengubah ketersediaan nutrisi dan dapat mempengaruhi fisiologi sel (Rezka, 2011).

Kisaran pH untuk kultur alga biasanya antara 7-9, sedangkan kisaran suhu optimum untuk alga laut berkisar antara 8°C-8,5°C. Namun secara umum kisaran pH yang optimum untuk kultur mikroalga adalah antara 7-9 (Rezza, 2011). Sedangkan pH optimum untuk pertumbuhan dan perkembangan *C. vulgaris* adalah 7,0 -8,0. *Chlorella* sangat tahan terhadap lingkungan asam sampai pada pH 2 (Wijoseno, 2011). Menurut Hermanto *et al.*, (2011), nilai pH dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain aktivitas biologi seperti fotosintesis, respirasi dan keberadaan ion-ion dalam perairan tersebut.

#### 4) Intensitas Cahaya

Cahaya merupakan faktor utama yang memiliki peran yang penting dalam pertumbuhan mikroalga yaitu sebagai energi untuk pertumbuhan mikroalga dan fotosintesis. Mikroalga merupakan organisme autotrof yang mampu membentuk senyawa organik dan senyawa anorganik melalui proses fotosintesis. Intensitas cahaya yang terlalu tinggi dapat menyebabkan fotoinhibisi dan pemanasan. Intensitas cahaya 1000 lux cocok untuk kultur mikroalga dalam Erlenmeyer, sedangkan untuk kultur mikroalga dengan volume yang lebih besar menggunakan intensitas cahaya 5000-10.000 lux (Coutteau, 1996). Menurut Kawaroe (2010) dalam Harnadiemas (2012), cahaya yang dibutuhkan *C. vulgaris* sebagai energy untuk melakukan fotosintesis berkisar antara 2-3 klux.

Pemenuhan kebutuhan mikroalga akan penyinaran yang ideal, cahaya matahari dalam proses kultur mikroalga dapat diganti dengan menggunakan lampu TL, dimana spesifikasi lampu ini harus mendekati spesifikasi cahaya matahari. Biasanya kultur alga yang digunakan di laboratorium menggunakan lampu TL 40 watt. Cahaya pada lampu TL dapat diatur sesuai intensitas cahaya yang diperlukan. Selain itu, lampu TL mempunyai kestabilan intensitas cahaya dibandingkan dengan cahaya yang bersumber dari cahaya matahari (Puji *et al*, 2012).

## 2.2 Fragmen Pigmen Protein (FPP) *C. vulgaris*

Fragmen Pigmen Protein juga merupakan komponen penyusun *C. vulgaris*. FPP merupakan protein dan pigmen dalam bentuk RNA atau enzim. *C. Vulgaris* memiliki beberapa jenis pigmen seperti  $\beta$ - karoten, astaxanthin, cantaxanthin, lutein, chlorophyll-  $\alpha$ , chlorophyll  $\beta$ , pheophytin-  $\alpha$  serta violaxanthin (Safi *et al.*, 2014). Pigmen violaxanthin dan  $\beta$ -karoten termasuk jenis karotenoid, dimana secara umum karotenoid termasuk antioksidan yang kuat. Pemanfaatan karotenoid banyak dikaitkan dengan rendahnya insidensi terjadinya penyakit kronis seperti komplikasi kardiovaskular, kanker, dan degenerasi makula (Biehler *et al.*, 2012).

## 2.3 Ikan Kerapu Tikus ( *Cromileptes altivelis* )

Kerapu atau yang dikenal juga dengan grouper merupakan salah satu spesies ikan yang sangat penting baik dari segi komersil maupun segi ekologi. Kerapu termasuk golongan ikan predator dalam ekosistem terumbu karang. Ikan ini banyak dijumpai di perairan terumbu karang dan sekitarnya, ada pula yang hidup disekitar muara sungai namun ikan kerapu juga tidak dapat hidup pada air laut yang memiliki kisara salinitas yang rendah (Fajriani, 2011).

Ikan kerapu Tikus tergolong kedalam family Serranidae, yang dikenal sebagai ikan hias atau "Panther Fish". Setelah ikan ini dewasa, akan menjadi konsumsi yang bergengsi karena harganya yang mahal. Evalawati, *et al* (2001), menyatakan bahwa di Australia ikan ini dikenal dengan nama Barramndi Cod, di Jepang dikenal dengan nama Sarasaharta, di Singapura dikenal dengan Polka-Dotgrouper sedangkan di Indonesia dan Malaysia dikenal dengan nama Ikan Kerapu Tikus, Kerapu Belida, dan Kerapu Sonoh.

### 2.3.1 Klasifikasi *C. altivelis*

Taksonomi ikan Kerapu Tikus menurut Weber and Beofort (1940) dalam Evalawati *et al* (2001), dapat dilihat dibawah ini:

Phylum	: Chordata
Subphylum	: Vertebrata
Class	: Osteichtyes
Sub Class	: Actinopterigi
Ordo	: Percomorphi
Sub Ordo	: Percoidea
Family	: Serranidae
Genus	: <i>Cromileptes</i>
Species	: <i>Cromileptes altiveli</i>

### 2.3.2 Morfologi

Ikan kerapu Tikus mempunyai ciri-ciri morfologi sirip punggung dengan 10 duri keras dan 18 -19 duri lunak, sirip perut dengan 3 duri keras dan 10 duri lunak, sirip ekor dengan 1 duri keras dan 70 duri lunak. Panjang total 3,3 – 3,8 kali tingginya, panjang kepala seperempat panjang total, leher bagian atas cekung dan semakin tua semakin cekung, mata seperenam kepala, sirip punggung semakin kebelakang semakin melebar, warna putih kadang kecoklatan dengan totol hitam pada badan, kepala dan sirip (Amirudin *et al*, 2012).

Kerapu memiliki bentuk mulut yang lebar serong keatas dengan bibir bawah menonjol keatas. Rahang atas dan bawah dilengkapi dengan deretan gigi dua baris, lancip dan kuat serta terdapat gigi terbesar di ujung luar bagisn depan. Umumnya ikan ini memiliki sirip ekor yang bulat (rounded). Dengan warna dasar sawo matang, perut bagian bawah berwarna agak putih dan badannya memiliki binti berwarna merah kecoklatan. Tampak pula 4-6 baris warna gelap yang

repository.ub.ac.id

melintang hingga ekornya. Badannya ditutupi oleh sisik sisik kecil mengkilap yang memiliki cirri loreng (Fajriani, 2011).



**Gambar 4.** Morfologi Ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*)  
(Sumber : Google image, 2015)

### 2.3.3 Habitat dan Penyebaran

Daerah penyebaran kerapu Tikus (*C. altivelis*) dimulai dari Afrika Timur sampai Pasifik Barat Daya. Di Indonesia kerapu Tikus banyak ditemukan di perairan Pulau Sumatera, Jawa, Sulawesi, Buru dan Ambon. Salah satu indikator adanya kerapu Tikus adalah perairan karang yang terhampar hampir diseluruh perairan pantai di Indonesia.

Ikan kerapu tersebar luas di perairan panatai baik di daerah tropis maupun daeran sub tropis dan termasuk jenis ikan yang hidup diperairan karang sehingga ikan ini juga sering disebut ikan karang (*coral reef fish*) (Aslianti, 2012). Ikan ini merupakan organism nocturnal yang bergerak aktif dimalam hari untuk mencari makan dan akanlebih banyak bersembunyi di liang liang karang pada siang hari.

Siklus hidup kerapu Tikus muda hidup diperairan karang pantai dengan kedalaman 0,5-3 m. Kerapu Tikus muda dan larva banyak terdapat di perairan pantai dekat muara sungai dengan dasar perairan berupa pasir berkarang yang banyak ditumbuhi padang lamun. Pada kerapu dewasa 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 Tikus digolongkan sebagai ikan buas demersal atau ikan buas yang hidup di dasar laut. Dasar laut yang disukai adalah terdiri atas pasir karang yang terdapat di perairan dangkal dengan kedalaman berkisar antara 10- 40 meter dalam siklus hidupnya Kerapu Tikus muda hidup di perairan karang pantai dengan kedalaman 0,5 - 3,0 meter (Amirudin et al, 2012).

#### **2.3.4 Reproduksi**

Kerapu Tikus bersifat hermaprodit 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 di tangkap di alam berukuran kecil dan umumnya berjenis kelamin betina, induk akan mengalami kematangan kelamin sepanjang tahun. Berdasarkan pengamatan mikroskopis, telur kerapu Tikus berbentuk bulat tanpa kerutan, cenderung bergerombol pada kondisi tanpa aerasi, kuning telurnya tersebar merata, telur transparan dengan diameter sekitar 850 mikron dan tidak mempunyai rongga di dalam telur. Perkembangan embrional telur membutuhkan waktu setidaknya 19 jam sejak pembuahan hingga penetasan, sel pertama terjadi 40 menit setelah pembuahan berikutnya setiap 15 - 30 menit sampai mencapai tahap multisel selama 2 jam 25 menit, tahap berikutnya adalah brastula, gastula, neurula dan embrio (Amirudin *et al*, 2012).

#### **2.3.5 Kebiasaan Makan dan Makanannya**

Selama hidupnya, ikan mengalami lima periode yaitu: embrio, larva juvenil, dewasa dan tua. Pada umumnya larva ikan terbagi atas dua tahap yaitu prolarva dan pasca larva. Perkembangan prolarva dimulai dari larva baru menetas sampai kuning telur habis terserap, sedangkan pasca larva dimulai dari kuning telur habis terserap sampai terbentuk organ-organ tubuh atau larva telah menyerupai bentuk induknya (Bulanin, 2003).

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

Spesies Ikan Kerapu memiliki panjang usus yang lebih panjang dibandingkan dengan panjang tubuhnya, diduga memiliki pertumbuhan yang cepat. Hali ini disebabkan oleh aktivitas dan kebiasaan dalam tingkat pemilihan jenis makanan. Ikan kerapu memiliki panjang usus berkisar 0,26-1,54 meter, selain itu usus ikan ini memiliki lipatan-lipatan yang dapat menambah luas permukaan usus dan berfungsi sebagai penyerap makanan (Tampubolon dan mulyadi,1989).

### 2.3.6 Kualitas Air ikan Kerapu Tikus

Kualitas air merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi kehidupan ikan kerapu tikus. Kualitas air yang dapat ditoleransi oleh ikan kerapu tikus meliputi :

#### a. Suhu

Suhu merupakan salah satu parameter fisika yang berpengaruh dalam kehidupan dan pertumbuhan ikan. Secara umum kenaikan suhu sejalan dengan meningkatnya laju pertumbuhan. Pada batas tertentu, suhu dapat menekan kehidupan ikan bahkan dapat menyebabkan kematian apabila fluktuasi suhu sampai ekstrim (drastis) (Kordi, 2011). Hal ini disebabkan karena suhu memiliki pengaruh langsung terhadap kelarutan gas-gas dalam air termasuk oksigen.

Semakin tinggi suhu disuatu perairan, semakin kecil larutan oksigen dalam air. Padahal ikan membutuhkan oksigen yang cukup banyak untuk metabolisme (Fajriani, 2011). Menurut Sumaga *et al* (2001) suhu optimum untuk pertumbuhan ikan kerapu tikot berkisar antara 27-30°C.

#### b. Salinitas

Salinitas merupakan konsentrasi dari total ion yang terdapat dalam perairan. Salinitas sangat berpengaruh terhadap tekanan osmotik sel tubuh ikan. Dengan demikian, bila seekor ikan dipindahkan dari habitat aslinya, misalnya dari salinitas tinggi ke salinitas rendah, ikan tersebut dapat mengalami kematian, kecuali ikan tersebut mampu mentoleransi perubahan lingkungannya tersebut. Putra (2008) menyatakan bahwa salinitas yang ideal untuk pembesaran ikan kerapu tikot adalah antara 28-33 ppt.

#### c. Derajat Keasaman (pH)

Derajat keasaman (pH) air mempengaruhi tingkat kesuburan perairan karena dapat mempengaruhi kehidupan jasad renik. Nilai pH dapat digunakan sebagai indeks kualitas lingkungan atau tolak ukur untuk menunjukkan tinggi rendahnya konsumsi ion hidrogen dalam suatu perairan. Ghufran, *et al.* (2007), menyatakan bahwa pada pH rendah kondisi oksigen terlarut akan mengalami penurunan begitu sebaliknya.

Derajat keasaman air juga dapat mempengaruhi pertumbuhan ikan. pH perairan yang rendah atau sangat asam dapat menyebabkan kematian pada ikan dengan gejala gerakannya tidak teratur, tutup insang tidak bergerak aktif dan berenang sangat cepat dipermukaan air. Keadaan perairan yang memiliki tingkan keasaman yang tinggi (basa) juga dapat berdampak pada terhambatnya pertumbuhan ikan. Kisaran pH yang cocok untuk ikan kerapu tikot adalah 6,7-8,2 (Fajriani, 2001).

#### d. Oksigen Terlarut

Oksigen merupakan faktor penting bagi kehidupan makro dan mikro organisme perairan karena diperlukan untuk proses pernafasan. Sehingga apabila ketersediaannya dalam air tidak mencukupi, maka segala aktivitas biota akan terhambat. 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).

Ketersediaan oksigen bagi biota air menentukan lingkaran aktivitasnya, konversi pakan, demikian laju pertumbuhan bergantung pada oksigen dengan ketentuan faktor kondisi lainnya adalah optimum (Kordi *et al.*, 2005). Menurut Amiruddin *et al* (2012), kisaran oksigen terlarut optimal untuk pemeliharaan ikan kerapu tikus berkisar 4– 4,49 ppm.

#### 2.4 Sistem Pertahanan Tubuh Ikan

Sistem imun merupakan sistem koordinasi respons biologik yang bertujuan melindungi integritas dan identitas individu serta mencegah invasi organisme dan zat yang berbahaya di lingkungan yang dapat merusak dirinya. Sistem imun mempunyai sedikitnya 3 fungsi utama. Yang pertama adalah suatu fungsi yang sangat spesifik yaitu kesanggupan untuk mengenal dan membedakan berbagai molekul target sasaran dan juga mempunyai respons yang spesifik. Fungsi kedua adalah kesanggupan membedakan antara antigen diri dan antigen asing. Fungsi ketiga adalah fungsi memori yaitu kesanggupan melalui pengalaman kontak sebelumnya dengan zat asing patogen untuk bereaksi lebih cepat dan lebih kuat daripada kontak pertama (Munasir, 2001).

Apabila tubuh mendapatkan serangan dari benda asing maupun infeksi mikroorganisme (kuman, penyakit, bakteri, jamur, atau virus) maka sistem

kekebalan tubuh akan berperan dalam melindungi tubuh dari bahaya akibat serangan tersebut. 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 (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

#### 2.4.1 Sistem Imun Non Spesifik

Sistem kekebalan tubuh pada ikan secara fisiologis mirip dengan vertebrata yang lebih tinggi, meskipun terdapat perbedaan tertentu. Berbeda dengan vertebrata yang lebih tinggi, ikan adalah organisme yang hidup bebas dari tahap embrionik awal kehidupan dan tergantung pada sistem kekebalan tubuh bawaan mereka untuk bertahan hidup (Rombout *et al.*, 2005). Imunitas nonspesifik merupakan mekanisme pertahanan mendasar dalam ikan. Selain itu, memainkan peran kunci dalam respon kekebalan yang diperoleh dan homeostasis melalui sistem protein reseptor. Protein reseptor ini mengidentifikasi pola molekul yang khas dari mikroorganisme patogen, termasuk polisakarida, lipopolisakarida (LPS), DNA bakteri peptidoglikan, RNA virus dan molekul lain yang tidak biasanya pada permukaan organisme multisel (Uribe *et al.*, 2011).

Sistem imun non spesifik merupakan pertahanan tubuh terdepan dalam menghadapi serangan berbagai mikroorganisme, oleh karena dapat memberikan respons langsung. Disebut sistem non spesifik karena tidak ditujukan terhadap satu mikroorganisme tertentu, telah ada pada tubuh kita dan siap berfungsi sejak lahir. Dilihat dari caranya diperoleh, mekanisme pertahanan non spesifik disebut juga respons imun alamiah.

Pada ikan, sistem kekebalan non spesifik atau respon bawaan telah dianggap sebagai komponen penting dalam memerangi patogen karena memberikan respon langsung terhadap patogen. Sistem kekebalan tubuh non

spesifik terdiri dari tiga komponen yaitu 1) pertahanan fisik yang meliputi kulit, mukosa, membrane, selaput lendir, 2) pertahanan kimiawi yang meliputi lisozim, sekresi, laktoferin, peptide antimikroba dan sekresi sebaseus dan pertahanan humoral yang diperankan oleh komplemen, interferon dan CRP, serta 3) pertahanan seluler yang diperankan oleh sel sel imun yang terdiri dari fagosit, sel makrofag, trombosit, granulosit, sel dendrite, sel-sel non-spesifik sitotoksik atau sel NK (*Natural Killer*) (Tort *et al*, 2003)

#### 2.4.2 Sistem Imun Spesifik

Sistem imun spesifik mempunyai kemampuan untuk mengenali benda yang dianggap asing. Benda asing yang pertama kali muncul akan segera dikenali dan terjadi sensitisasi sel-sel sistem imun tersebut. Benda asing yang sama, bila terpajang ulang akan dikenal lebih cepat dan kemudian dihancurkan. Respon sistem imun spesifik lebih lambat karena dibutuhkan sensitisasi oleh antigen namun memiliki perlindungan lebih baik terhadap antigen yang sama.

Sistem imun spesifik terdiri atas sistem humoral dan sistem selular. 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 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 (Ariana, 2003). Agusjaya (2011) mengatakan bahwa sistem imun spesifik terdiri dari sistem humoral dan sistem selular.

##### 1) Sistem Humoral

Didalam sistem imun spesifik humoral, sel B memiliki peran utama. Sel B atau limfosit B berasal dari multipoten di sum sum tulang belakang. Sel B yang dirangsang oleh benda asing akan diproliferasi, berdiferensiasi dan berkembang

menjadi sel plasma yang memproduksi antibody. Fungsi utama sel B adalah mempertahankan tubuh terhadap infeksi bakteri, virus dan melakukan netralisasi toksin. (Baratawidjaja dan Renganis, 2010).

Sel limfosit B berasal dari sumsum tulang belakang dan mengalami pendewasaan pada jaringan ekivalen bursa. Jumlah sel limfosit B dalam keadaan normal berkisar antara 10 dan 15%. Setiap limfosit B memiliki 10<sup>5</sup> *B cell receptor* (BCR), dan setiap BCR memiliki dua tempat pengikatan yang identik. Antigen yang umum bagi sel B adalah protein yang memiliki struktur tiga dimensi (Rao, 2011).

Limfosit berperan dalam respons imun spesifik karena setiap individu limfosit dewasa memiliki sisi ikatan khusus sebagai varian dari prototipe reseptor antigen. Reseptor antigen pada limfosit B adalah bagian membran yang berikatan dengan antibody yang disekresikan setelah limfosit B yang mengalami diferensiasi menjadi sel fungsional, yaitu sel plasma yang disebut juga sebagai membran immunoglobulin (Kum and Sekkin, 2011)

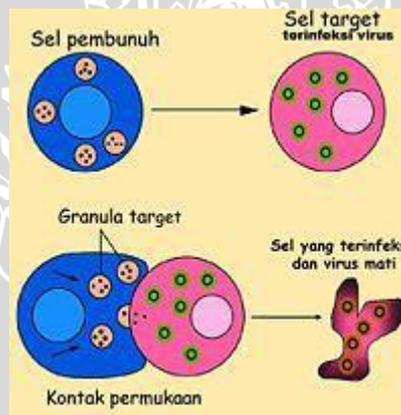
## 2) Sistem Selular

Sistem imun spesifik selular diperantarai oleh Sel T. Sel T juga berasal dari sum-sum tulang belakang. Fungsi utama sistem imun spesifik selular ialah sebagai pertahanan terhadap bakteri yang hidup intraselular, virus, jamur, parasit dan keganasan. Sel T terdiri sel CD4<sup>+</sup> terdiri atas Th1 dan Th2. Th1 diaktifkan oleh CD4<sup>+</sup> untuk mengaktifkan makrofag yang berfungsi dalam menghancurkan mikroba. Sel T juga terdiri atas sel CD8<sup>+</sup>/CTL/Tc/Ts/Th3 yang berfungsi untuk memusnahkan sel terinfeksi (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

Respon imun awal limfosit T melalui fase pengenalan antigen, APC akan mengaktifasi limfosit T *naïve*, yaitu proliferasi limfosit T yang spesifik terhadap antigen tersebut. Dan diferensiasi menjadi sel memori dan sel efektor. Limfosit T pada mulanya teraktivasi oleh interaksi dengan makrofag (salah satu APC) yang

menyajikan fragmen-fragmen antigen yang telah terproses pada permukaan selnya. Sel T mempunyai beberapa tipe salah satu diantaranya adalah sel T sitotoksik. Sel T sitotoksik merupakan sel penyerang langsung yang mampu membunuh mikroorganisme dan pada suatu saat bahkan membunuh sel-sel tubuh sendiri (Putu *et al*, 2014).

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 (Radji, 2009).



**Gambar 5.** Sel T pembunuh secara langsung menyerang sel lainnya yang membawa antigen asing atau abnormal di permukaan mereka (Sumber: Google image, 2015)

## 2.5 $\beta$ -Aktin

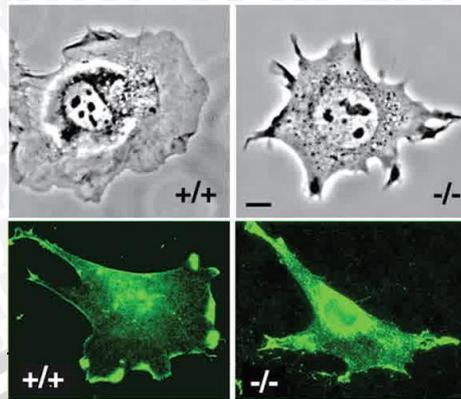
Aktin merupakan salah satu protein yang berlimpah dalam sel eukariotik, yang memiliki peran kunci dalam mempertahankan struktur sitoskeletal, motilitas sel, pembelahan sel, gerakan intraseluler dan proses kontraktif (Joseph *et al.*, 2012). Aktin memiliki dua bentuk yaitu globular aktin (G-aktin) dan filament aktin (F-aktin). Filamen aktin dibentuk oleh perakitan searah monomer Globular

subunit aktin yang terdiri dari ujung yang berduri runcing dan sebaliknya (Wickramarachchi *et al.*, 2010).

Sel eukariot memiliki enam isoform aktin yang masing-masingnya dikodekan oleh gen terpisah. Perbedaan keenam isoform aktin tersebut berbeda pada letaknya. Dua isoform yang berhubungan dengan otot lurik yaitu  $\gamma$  aktin pada otot jantung dan  $\alpha$  aktin yang terletak ada skeletal, dua isoform lain merupakan aktin yang berhubungan dengan otot polos yaitu  $\alpha$  dan  $\gamma$  aktin, serta dua aktin lainnya terdapat pada sitoplasma yaitu  $\beta$ - aktin dan  $\gamma$ -aktin (Joseph *et al.*, 2012).

Salah satu isoform aktin yang memiliki peranan penting dalam sel yaitu  $\beta$ -aktin.  $\beta$ - aktin merupakan komponen sitoskeleton yang memiliki peranan yang penting dalam imunitas dan beberapa proses seluler lainnya, seperti migrasi sel, pembelahan sel dan regulasi ekspresi gen. Dalam pembelahan sel,  $\beta$ - aktin berperan penting dalam perubahan bentuk sel yang tepat selama proses mitosis. (Joseph *et al.*, 2014). Ekspresi  $\beta$ - aktin juga berdampak pada peningkatan tonjolan dan peningkatan migrasi sel. Dalam proses migrasi sel, terjadi pemasangan aktin yang membuat tonjolan pada bagian depan yang mendorong membran sel (Pollard dan Boris, 2003).

Dalam respon imun, aktin memiliki fungsi sebagai regulator kunci yang berperan dalam mengatur keberhasilan respon imun (Jonsson *et al.*, 2012).  $\beta$  -aktin memiliki fungsi dalam sistem pertahanan tubuh terhadap infeksi patogen, seperti clustering reseptor, internalisasi antigen, dan mengatur keluar masuknya vesikel untuk pemerosesan antigen. Dalam sistem imun spesifik baik humoral maupun selular, aktin sitoskeleton juga memiliki peranan dalam aktivasi sel B maupun sel T. Aktin sitoskeleton mengatur proses penargetan dan pengambilan antigen dengan cara merubah morfologi membrane plasma.



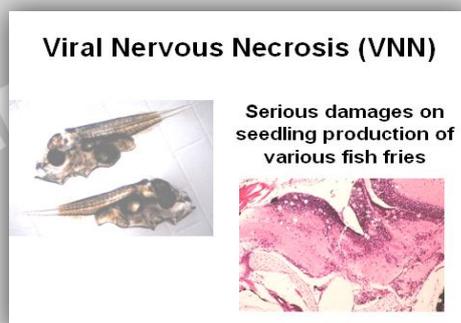
**Gambar 6.** Remodelling  $\beta$ -aktin (Buxbaum *et al.*, 2014)

Gambar diatas merupakan salah satu visualisasi remodeling aktin yang menunjukkan terjadinya perubahan bentuk. Pada sel B, *remodelling*  $\beta$ -aktin ini akan mengubah morfologi sel B, yang akan mempermudah sel dalam menangkap antigen. Pada sistem imun spesifik seluler, sel T memiliki peranan yang penting yaitu memusnahkan dan menghancurkan antigen yang masuk dalam sel. Salah satu komponen penting dalam aktivasi sel T adalah MHC.  $\beta$ -aktin berperan dalam pengaturan pengangkutan molekul MHC ke membran sel (Chow *et al.*, 2002). Kurangnya ekspresi  $\beta$ -aktin akan berdampak pada kurang efektifnya presentasi MHC dan akhirnya mengurangi presentasi antigen ke sel T (Vascotto 2007).

## 2.6 Viral Nervous Necrosis (VNN)

Dalam budidaya kerapu tikus, penyakit yang pada umumnya menyerang adalah *Viral Nervous Necrosis* (VNN). Penyakit ini merupakan jenis virus Nodaviridae yang dapat menyebabkan kematian massal hingga 100% dalam budidaya. Pada umumnya VNN menyerang ikan pada stadia larva dan juvenil. Koesharyani *et al.* (2001) menjelaskan bahwa kematian yang disebabkan infeksi VNN mencapai 100% pada stadia larva, tetapi tidak pada stadia juvenil dan *fingerling* (ikan muda).

VNN (*Viral Nervous Necrosis*) ini umumnya menyerang sistem organ syaraf mata dan otak yang dapat menyebabkan kelainan pada ikan yang diserang. Yuasa *et al.* (2001) dalam Rahmana *et al.*, (2013) menjelaskan bahwa VNN umumnya menginfeksi stadia larva sampai yuwana dan menyerang sistem organ syaraf mata dan otak dengan gejala yang cukup spesifik karena ikan menampakkan tingkah laku berenang yang tidak normal dan umumnya ikan berdiam di dasar.



**Gambar 7.** Viral Nervous Necrosis (Sumber: Google image, 2015)

### 2.6.1 Karakteristik Viral Nervous Virus (VNN)

*Viral Nervous Necrosis* (VNN) atau biasa disebut juga *Viral Encephalopathy and Retinopathy* (VER) adalah penyakit yang terdaftar oleh The Office International des Epizooties (OIE), menjadi masalah utama di dalam produksi perikanan laut di dunia. VNN termasuk dalam genus *Betanodavirus* yang berukuran kecil, virion berbentuk bulat, tidak memiliki amplop, genomnya terdiri dari dua molekul rangkaian positif ssRNA serta berdiameter 25-30 nm dan selalu menginfeksi sistem saraf. VNN dapat dibagi menjadi dua kelompok yaitu *Paramyxovirinae* dan *Rhabdoand pneumovirues* (Yukio, 2007).

### 2.6.2 Gejala Klinis dan Faktor Penyebab Viral Nervous Virus (VNN)

Gejala klinis yang ditunjukkan ikan kerapu setelah terinfeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN) yaitu nafsu makan menurun, menunjukkan tingkah laku berenang yang tidak beraturan atau berenang memutar (*whirling*), gerak renang

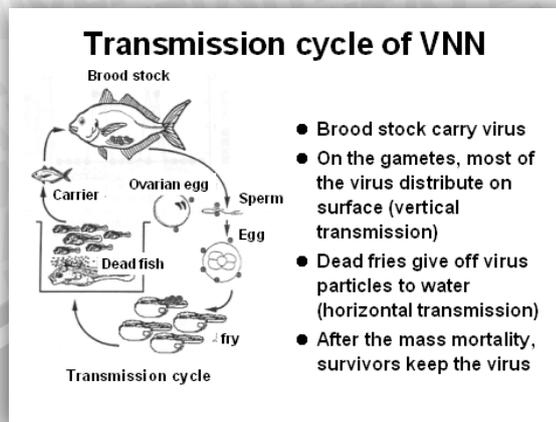
yang pasif, ikan mengapung dengan perut di atas karena pembengkakan gelembung renang, berada di dasar kolam terlihat seperti mati dan warna tubuh terlihat lebih gelap (Amelia *et al.*, 2012).

Gejala ikan yang terserang virus ini berbeda menurut umurnya, pada umur 45 hari sampai 4 bulan akan terlihat ikan berdiam di dasar, berenang terbalik, gerakannya lemah dan kadang-kadang menyentak seperti tanpa kontrol serta nafsu makan menurun drastis, biasanya 3-5 hari setelah adanya gejala klinis ikan akan mati (Johny *et al.*, 2007). Yuasa *et al.*, (2000) dalam Rahmana *et al.*, (2013) menjelaskan bahwa selain menunjukkan perilaku abnormal dalam berenang, ikan yang terinfeksi VNN melalui analisis histopatologi ditemukan adanya vakuola pada otak, sum-sum tulang belakang, dan mata.

### 2.6.3 Transmisi dan Mekanisme Infeksi VNN

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

Mekanisme infeksi VNN yaitu melalui ikatan antara VNN adhesin dan molekul reseptor dalam organ kerapu. Viral adhesin dapat terbentuk dari komponen dasar viral yaitu *coat protein* dan asam nukleat. *Coat protein* VNN merupakan faktor utama dalam mekanisme virus menginfeksi inang (ikan kerapu/*humbback grouper*) dimana protein memiliki peran dalam menempelnya virus pada reseptor inang (Yanuhar, 2011).



**Gambar 8.** Siklus transmisi VNN (Sumber: Google image, 2015)

VNN dapat menembus ephitellium nasal lewat sayaraf penciuman dan gelembung penciuman, dan menyerang kupin penciuman. Virus ini juga dapat melewati intramuscular, awalnya VNN melewati saraf peripheral dalam jaringan muscular tepi, lalu diangkut melalui axon ke jaringan spina pada tulang belakang. Dan VNN juga dapat menerang *Central Nerveus System* (CNS) lewat sirkulasi darah sebagai titik awal injeksinya (Dennis *et al.*, 2006).

### 3. MATERI DAN METODE

#### 3.1 Materi Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah FPP dari mikroalga laut *C. vulgaris* yang diujikan secara klinis pada ikan Kerapu Tikus. Hal ini dilakukan untuk mengetahui efek dari pemberian materi nabati untuk terhadap ekspresi  $\beta$ -aktin yang dilihat pada organ hati ikan Kerapu Tikus. FPP didapatkan dari isolasi protein mikroalga laut *C. vulgaris* dan dibuktikan dengan SDS-PAGE. Ikan Kerapu Tikus yang digunakan sebagai hewan uji adalah berukuran  $\pm$  13-15 cm yang berasal dari BBAP Situbondo.

#### 3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat dan bahan-bahan yang digunakan penelitian ini dapat dilihat pada lampiran 1.

#### 3.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental. Penelitian eksperimen adalah penelitian yang dilakukan untuk mengetahui akibat yang ditimbulkan dari suatu perlakuan yang diberikan secara sengaja oleh peneliti (Hadi, 1985). Metode tersebut digunakan untuk mengetahui pengaruh dari suatu perlakuan yang diberikan dengan sengaja oleh peneliti. Penelitian eksperimen pada prinsipnya dapat didefinisikan sebagai metode sistematis guna membangun hubungan yang mengandung fenomena sebab akibat (*causal- effect relationship*) (Sukardi, 2011)

##### 3.3.1 Teknik Pengambilan Data

Teknik pengambilan data yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan 2 macam data, yaitu data primer dan data sekunder.

### 3.3.1.1 Data Primer

Data primer adalah data yang langsung dan segera diperoleh dari sumber data oleh penyelidik untuk tujuan yang khusus (Surakhmad, 1998). Data primer diperoleh dari sumbernya, diamati dan dicatat untuk pertama kalinya. Data tersebut akan menjadi data sekunder kalau dipergunakan orang yang tidak berhubungan langsung dengan penelitian yang bersangkutan. Menurut Marzuki (1983), metode yang dapat digunakan dalam pengumpulan data primer yaitu metode eksperimen. Pada metode ini, peneliti dapat mengatur atau memberikan perlakuan tertentu pada suatu variabel. Pada Penelitian ini eksperimen yang dilakukan yaitu dengan pemberian tiga perlakuan yang berbeda yaitu :

- 1) Ikan kontrol yaitu ikan yang tidak diberikan perlakuan apapun baik peinduksian FPP maupun penginveksian VNN.
- 2) Ikan perlakuan 1 yaitu ikan yang diberi perlakuan penginduksian FPP. Penginduksian FPP dilakuakn sebanyak 6 kali dalam pemeliharaan yaitu (hari ke-0) sebesar 306  $\mu$ l, pada hari ke-6 sebesar 315  $\mu$ l, pada hari ke-9 sebesar 322  $\mu$ l, hari ke-12 sebesar 326  $\mu$ l, hari ke-19 sebesar 345  $\mu$ l dan pada hari ke-24 sebesar 351  $\mu$ l.
- 3) Ikan perlakuan 2 yaitu ikan yang diinveksikan VNN. Ikan Kerapu Tikus yang diberi perlakuan dengan penginfeksian *Viral Nervous Necrosis* (VNN) dengan dosis yang disesuaikan dengan berat badan, penginfeksian dilakukan dengan memberikan pakan yang dicampur dengan daging ikan positif VNN.
- 4) Ikan perlakuan 3 yaitu ikan Kerapu Tikus yang diberi perlakuan dengan FPP pada hari ke-0, ke-6, ke-9, ke-14, ke-19, dan ke-24. Selain itu, dilakukan juga penginfeksian VNN pada hari ke-14, ke-19, dan ke-24.

### 3.3.1.2 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 laporan skripsi ini.

### 3.4 Prosedur Penelitian

Sebelum Pelaksanaan Pengamatan Tentang Pemanfaatan *Fragment Pigmen Protein* Mikroalga *C. vulgaris* yang diuji secara *In vivo* Pada Ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*), langkah awal yang perlu dilakukan yaitu sebagai berikut :

#### 3.4.1 Sterilisasi Alat

Sterilisasi dilakukan tidak hanya pada alat tetapi dilakukan juga pada bahan, Alat yang digunakan adalah autoklaf.

Langkah-langkah yang dilakukan pada sterilisasi ini antara lain :

- Alat dan bahan yang akan disterilisasi dibungkus dengan menggunakan kertas perkamen atau kertas koran, kemudian diikat dengan menggunakan benang,
- Air secukupnya dituang ke dalam autoklaf, kemudian alat yang telah dibungkus kertas perkamen dimasukkan ke dalam autoklaf dan ditutup rapat dengan mengencangkan baut secara silang,
- Kompur pemanas dinyalakan, setelah beberapa saat manometer akan menunjukkan angka 1 atm, jika terjadi kelebihan tekanan buka kran udara hingga manometer menunjukkan angka 1 atm kembali,
- Keadaan tekanan uap jenuh dapat terjadi berulang kali sampai suhu 121°C dan manometer menunjukkan 1 atm, keadaan ini dipertahankan  $\pm$  15 menit,
- Kompur dimatikan dan ditunggu beberapa saat sampai termometer dan manometer menunjukkan angka 0 (nol), kemudian buka kran uap lalu buka penutup autoclave dengan cara zig-zag,
- Alat dan bahan yang sudah disterilkan diambil dan disimpan.

#### 3.4.2 Kultur Mikroalga *Chlorella vulgaris*

Sampel *C. vulgaris* merupakan hasil kultur yang diambil dari Balai Budidaya Air Payau (BBAP) Situbondo. Langkah pertama yang dilakukan BBAP Situbondo dalam mengkultur *C. vulgaris* yaitu :

##### 1) Kultur Skala Laboratorium

Terdapat beberapa tahapan dalam proses kultur skala laboratorium, antara lain :

- Kultur Agar atau kultur di petridish
  - Melakukan sterilisasi alat,
  - Membuat media agar dengan memberi pupuk PA (*Pro Analisis*),
  - Melakukan sterilisasi dengan menggunakan *Autoclave*,

- Menuang media agar ke dalam petridish steril hingga  $\frac{3}{4}$  bagian,
- Menunggu hingga media agarmembeku lalu dilakukan inokulasi menggunakan metode gores.

➤ **Kultur Murni 1 (toples 1 liter)**

- Melakukan sterilisasi media (air laut), lalu dinginkan,
- Memasukkan media kedalam toples kapasitas 1 liter, tambahkan aerasi,
- Menambahkan pupuk kedalam media kultur dengan dosis 1 ml/liter (PA),
- Menambahkan bibit kedalam media dengan perbandingan 3:7
- Melakukan inokulasi selama 5-7 hari

➤ **Kultur murni 2 (toples 10 liter)**

- Memasukkan media air laut kedalam toples kapasitas 10 liter, tambahkan aerasi,
- Melakukan sterilisasi media (air laut) dengan menambahkan kaporit 10 ppm,
- Menambahkan thiosulfat  $\geq 5$  ppm,
- Menambahkan bibit kedalam media dengan perbandingan 3:7
- Menambahkan pupuk dan vitamin dengan dosis 1 ml/liter (PA).

**2) Kultur Intermediet atau Semi Massal**

- Melakukan sterilisasi media air laut di dalam bak berukuran 500 liter
- Menambahkan kaporit 10 ppm dan thiosulfat 5 ppm
- Menambahkan pupuk walne dengan dosis 1 ml/liter
- Menambahkan bibit kedalam media dengan perbandingan 3:7

### 3) Pemanenan alga

- Memberikan NAOH 75 ppm ke dalam bak kultur setelah alga mengendap,
- Membuang air yang bening
- Mengambil endapan di bawah dan dimasukkan ke dalam plastik bersih serta
- Menyimpan alga di dalam *cool box* yang berisi es batu.

#### 3.4.3 Proses Isolasi Protein *Chlorella vulgaris*

Cara mendapatkan protein murni yaitu dengan mengeluarkan protein dari bahan alam *C. vulgaris*. Umumnya hal ini dilakukan dengan jalan memecahkan sel-sel jaringan secara mekanik. Isolasi protein dilakukan dalam keadaan dingin yaitu pada suhu 4°C, karena protein mudah terdenaturasi maka pemurnian protein sering dilakukan pada suhu rendah yaitu mendekati titik beku pelarut yang digunakan (Poedjiadi, 1994).

Prosedur isolasi protein *C. vulgaris* 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 FPP meliputi :

##### ➤ Penggerusan Sampel

Adapun proses penggerusan sampel, diantaranya :

- Menimbang *C. vulgaris* sebanyak 10 gr
- Menambah nitrogen cair  $\pm$  5 ml
- Menghaluskan sampel dengan menggunakan mortar dan alu selama 1 jam
- Menambahkan larutan glisyn 20 ml + KCl 15 ml secara bertahap
- Memasukkan glisyn 7 ml kemudian menghaluskan sampel menggunakan mortar dan alu selama 15 menit
- Hasil

### ➤ **Sentrifuge**

Adapun tahapan penggunaan sentrifuge, diantaranya :

- Menimbang hasil penggerusan sampel sebanyak 2 gr
- Memasukkan kedalam eppendoft 1,5 ml
- Mensentrifuge pada 12.000 rpm selama 10 menit
- Mengambil supernatan
- Memasukkan dalam falcon 50 ml
- Hasil

### **3.4.4 Elektroforesis Protein dengan Metode SDS-PAGE**

Fatchiyah (2011), menyatakan prosedur Elektroforesis protein dengan SDS-PAGE adalah sebagai berikut:

#### **3.4.4.1 Menyiapkan sampel**

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

#### **3.4.4.2 Pembuatan Media/Gel Elektroforesis SDS**

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

- Disusun plate pembentuk gel.
- Dibuat separating gel 12,5%. Dengan cara:
  - Disiapkan tabung polipropilen 50ml.
  - Dimasukkan 3,125 ml stok akrilamida dalam tabung.
  - Dimasukkan 2,75 ml 1M Tris pH 8,8. Tabung di tutup, lalu tabung digoyang secara perlahan.

- Dimasukkan aquabides 1,505 ml. Tabung ditutup, lalu tabung digoyang secara perlahan.
- Dimasukkan 75  $\mu$ l SDS 10%. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan.
- Dimasukkan 75  $\mu$ l APS 10%. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan.
- Dimasukkan 6,25  $\mu$ l TEMED. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan.
- Dituangkan larutan ke dalam 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.
- Lalu 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 siap untuk digunakan,
  - Menyiapkan stacking gel 3% dengan cara:
    - Disiapkan tabung polipropilen 50ml.
    - Dimasukkan 0,45 ml stok akrilamida dalam tabung.
    - Dimasukkan 0,38 ml 1M Tris pH 6,8. Tabung di tutup, lalu tabung digoyang secara perlahan.
    - Dimasukkan aquabides 2,11 ml. Tabung ditutup, lalu tabung digoyang secara perlahan.
    - Dimasukkan 30  $\mu$ l SDS 10%. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan.

- Dimasukkan 30  $\mu$ l APS 10%. Tabung ditutup, lalu digotang secara perlahan.
- Dimasukkan 5  $\mu$ l TEMED. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan.

#### 3.4.4.3 Running Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Tahapan proses SDS-PAGE ini, diantaranya:

- Dimasukkan plate yang sudah berisi gel ke dalam chamber elektroforesis.
- Dituang 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.
- Dimasukkan sampel sebanyak 10-20  $\mu$ l (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.

#### 3.4.4.4 Running sampel

Tahapan dalam proses running sampel ini, antara lain :

- 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.

### 3.4.4.5 Pewarnaan (*Staining*) Media/Gel Hasil *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE)

#### 1. Pewarnaan Commasie Brilliant Blue

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

Larutan staining 1 liter terdiri dari:

- Coomassie Blue R-250 : 1,0 g
- Metanol : 450 ml
- Aquades : 450 ml
- Asam asetat glasial : 100 ml

Larutan destaining 1 liter terdiri dari:

- Metanol : 100 ml
- Asam asetat glasial : 100 ml

- b. Rendam gel dalam 20 ml staining solution sambil digoyang selama kurang lebih 15 menit. Setelah itu, tuang kembali larutan staining pada wadahnya.
- c. 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 yang dilakukan ketika melakukan pewarnaan perak nitrat (*silver stain*) adalah :

- Rendam gel dalam larutan fiksasi selama 30 menit.
- Larutan fiksasi dituang 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.
- Gel siap diamati

#### 3.4.5 Pengukuran Berat Molekul Protein sampel

- Untuk setiap sampel protein, 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.

#### 3.4.6 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. Lalu ikan dipuasakan terlebih dahulu agar nafsu makannya terjaga. Pakan diberikan setelah ikan terlihat sehat dan agresif. Pakan yang digunakan berupa ikan kembung segar yang dicacah hingga ukurannya kecil disesuaikan dengan bukaan mulut ikan. Pemberian pakan dilakukan 2-3 hari setelah ikan pertama kali di masukkan di aquarium. Pakan diberikan secara *ad libitum* yaitu pemberian pakan sedikit demi sedikit sampai ikan kenyang.

Tujuan dari pemberian pakan secara *ad libitum* untuk menghindari adanya pengendapan sisa pakan yang tidak dimakan pada dasar aquarium sehingga mengakibatkan aquarium akan mengalami penurunan kualitas air utamanya oksigen terlarut. Pemberian pakan dilakukan pada jam 08.00 dan 15.00 WIB.

### **3.4.7 Parameter Kualitas Air**

#### **A. Parameter Fisika Air**

Parameter fisika yang diukur dalam penelitian ini terdiri dari :

##### **1. Suhu**

Alat yang digunakan dalam pengukuran suhu air adalah termometer standar. Menurut Rahayu (2009), 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.

#### **B. Parameter Kimia Air**

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

### 1. Derajat Keasaman (pH)

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan alat pH meter, adapun cara pengukuran pH menurut Jeffries dan Mills *dalam* Hartanti (2008) 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

Menurut 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.

### 3. Salinitas

Pengukuran salinitas dilakukan dengan menggunakan alat refraktometer, adapun cara pengukuran salinitas menurut Kordi (2005) 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.

#### 3.4.8 Uji In-vivo FPP Pada Ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*)

Dalam penelitian ini dilakukan perlakuan *In vivo* FPP dari mikroalga laut *C. vulgaris* pada ikan Kerapu Tikus. Proses pengujian dilakukan secara oral (metode sonde) mengacu pada Yanuhar (2009) sebanyak 6 kali yang berfungsi sebagai imunostimulator pada sistem imun ikan. Isolat FPP yang didapatkan melalui proses isolasi selanjutnya diujikan pada ikan Kerapu Tikus masing-masing pada hari pertama pemberian pakan (hari ke-0) sebesar 306  $\mu$ l/ikan, pada hari ke-6 sebesar 315  $\mu$ l/ikan, pada hari ke-9 sebesar 322  $\mu$ l/ikan, hari ke-12 sebesar 326  $\mu$ l/ikan, hari ke-19 sebesar 345  $\mu$ l/ikan dan pada hari ke-24 sebesar 351  $\mu$ l/ikan. Perhitungan dosis perlakuan penyondean selama masa pemeliharaan di BBAP Situbondo disajikan pada lampiran.

#### 3.4.9 Imunohistokimia (IHC)

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

- Melakukan preparasi jaringan organ yang dipapar imunogenik
- Melakukan deparafinasi preparat dengan xilol 20  $\mu$ m selama  $\pm$  5 menit
- Melakukan dehidrasi dengan alkohol absolut sebanyak 2 kali ulangan pada konsentrasi 90%, 80% dan 70% masing-masing selama 5 menit
- Membilas preparasi dengan dionize water 20  $\mu$ m 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% selama 10 menit
- Blocking unspezifik protein dan inkubasi dalam 5% PBS dengan 1-2% BSA
- Menyiapkan antibodi primer yang dilarutkan dalam larutan blotto dengan perbandingan 1:1000
- Mencuci dengan antibodi primer anti MHC fish (1:1000) overnight 4<sup>o</sup>C
- Menetesi preparat dengan antibodi primer dan diinkubasi overnight 4<sup>o</sup>C
- Preparat kemudian dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit
- Keringkan kembali sisa-sisa PBS yang masih menempel dan siapkan antibodi sekunder yang dilarutkan dalam larutan blotto dengan perbandingan 1:200
- Preparat kemudian ditetesi dengan larutan antibodi sekunder anti mouse conjugate pajotin dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang
- Preparat kembali dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit
- Keringkan kembali sisa-sisa PBS yang masih menempel
- Menginkubasi dalam SA-HRP dengan perbandingan 1:500 selama 40 menit
- Preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit
- Menggunakan kromagen DAB selama 20 menit
- Preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit
- Memberikan counterstain dengan majer *hemotoxilen* selama 10 menit
- Membilas preparat dengan DH<sub>2</sub>O 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 Analisa Data

Analisa data pada penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 3 kali pengulangan. Langkah awal adalah menghitung prosentase DAB  $\beta$ -aktin pada setiap perlakuan. Selanjutnya data dianalisa dengan menggunakan cara statistik yaitu analisa keragaman (ANOVA), dengan tujuan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan pemberian perlakuan. Apabila dari analisa keragaman (sidik ragam) diketahui bahwa perlakuan menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata atau sangat berbeda nyata, maka untuk membandingkan nilai dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT), untuk mengetahui perlakuan yang mana yang berbeda. Model persamaan RAL adalah sebagai berikut:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \epsilon_{(ij)k}$$

Keterangan :  $Y_{ijk}$  = respon perlakuan ke-I serta ulangan ke-j

I = perlakuan

J = Ulangan

$\mu$  = nilai rata-rata umum

$\tau_i$  = Pengaruh dari perlakuan ke-i

$\epsilon_{(ij)k}$  = galat atau kesalahan percobaan untuk perlakuan ke-i

Langkah selanjutnya, data yang diperoleh dari penelitian diuji menggunakan analisa sidik ragam. Tabel analisa sidik ragam untuk desain eksperimen tersarang disajikan pada tabel 6 sebagai berikut :

**Tabel 6. Analisa sidik ragam**

Perlakuan	Ulangan			total	Rata-rata
	1	2	3		
Penambahan FPP	F1	F2	F3	TF	TF/3
Penambahan VNN	V1	V2	V3	TV	TV/3
Penambahan FPP+VNN	FV1	FV2	FV3	TFV	TFV/3
kontrol	K1	K2	K3	TK	TK/3
Total				T	

Keterangan = 1,2,dan 3 adalah ulangan (r)  
 K, F, V, dan FV adalah perlakuan (t)  
 K : kontrol  
 F : perlakuan FPP  
 V : perlakuan VNN  
 FV : perlakuan FPP+VNN

Dari data diatas maka dapat dihitung nilai dari :

$$\text{Faktor Koreksi} = \frac{Y_{ij}^2}{r.t}$$

$$\text{Jk Total} = \sum (y_{ij})^2 - \text{FK}$$

$$\text{JK Perlakuan} = \left( \frac{\sum (\sum y_{ij})^2}{r} \right) - \text{FK}$$

$$\text{JK Galat} = \text{JK Total} - \text{JK Perlakuan}$$

Berdasarkan perhitungan diatas, selanjutnya dapat dilakukan analisa keragaman untuk mengetahui pengaruh perlakuan. Adapun uraian analisa keragaman dapat dilihat pada tabel 7 sebagai berikut:

**Tabel 7. Analysis of varian (ANOVA)**

SK	DB	JK	KT	Fhit	Ftabel
					5%
Perlakuan	t-1	JKP	JKP/DBP	KTP/KTG	tabel
Galat	t (r-1)	JKG	JKG/DBG		
Total	Σn-1	JKT			

- Jika F hit > F tabel 5% maka perlakuan berbeda nyata
- Jika F hit < F tabel 5% maka tidak berbeda nyata

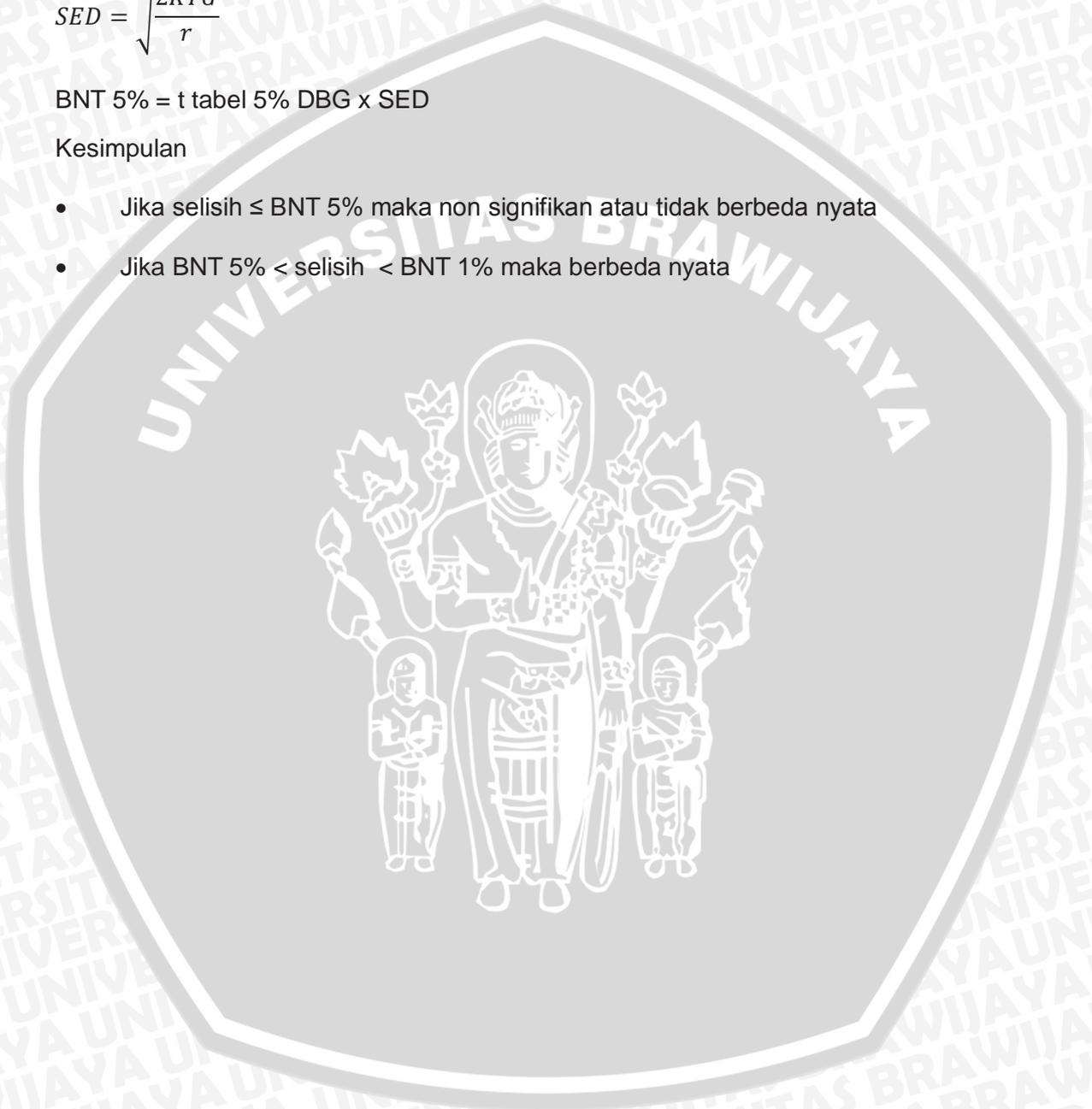
Apabila sidik ragam diperoleh hasil berbeda nyata atau berbeda sangat nyata, maka harus dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dari masing-masing perlakuan. Rumus perhitungan uji BNT sebagai berikut :

$$SED = \sqrt{\frac{2KTG}{r}}$$

BNT 5% = t tabel 5% DBG x SED

Kesimpulan

- Jika selisih  $\leq$  BNT 5% maka non signifikan atau tidak berbeda nyata
- Jika BNT 5% < selisih < BNT 1% maka berbeda nyata



## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Kultur Mikroalga *C. vulgaris*

Kultur *C. vulgaris* dilakukan di Balai Budidaya Air Payau Situbondo. Dalam proses pengkulturan mikroalga di BBAP Situbondo terdapat beberapa tahapan, diantaranya yaitu 1) tahap kultur laboratorium yang meliputi kultur agar (kultur petridish), kultur murni 1 (kultur toples 1 liter), kultur murni 2 (kultur toples 10 liter), dan 2) kultur intermediet atau semi massal

#### 1) Kultur Laboratorium

Pada kultur skala laboratorium terdapat beberapa tahapan yaitu antara lain adalah:

##### a. Inokulasi dalam petridish

Kultur agar diawali dengan sterilisasi alat dan pembuatan media agar yang telah diberi pupuk PA (*Pro Analisis*). Setelah itu dilakukan sterilisasi menggunakan *Autoclave*. Lalu media agar tadi dituang ke dalam petridish steril hingga  $\frac{3}{4}$  bagian. Setelah media agar membeku dilakukan inokulasi menggunakan metode gores. Mikroalga yang ditanam biasanya akan tumbuh setelah 2 minggu.



**Gambar 9.** Inokulasi (dokumentasi pribadi, 2015)

b. Kultur Murni 1 (toples 1liter)

Pada tahap ini, sterilisasi media (air laut) dilakukan dengan cara merebus hingga mendidih kemudian dituang kedalam wadah dan ditutup rapat. Setelah media dingin lalu diberikan aerasi dan dipupuk dengan dosis 1 ml/liter (PA). Perbandingan bibit dan media tumbuh yaitu 3 : 7, dipertahankan pada suhu 25°C dan penyinaran menggunakan lampu TL 40 watt 2 buah dan diinkubasi selama 5-7 hari.



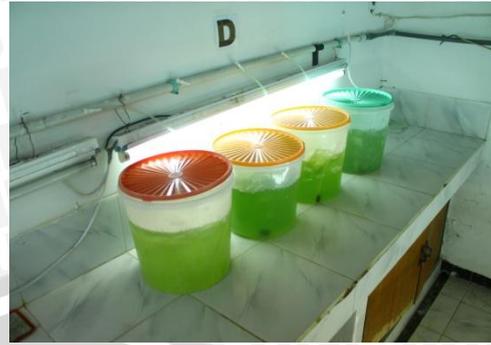
**Gambar 10.** Kultur Murni 1 dengan menggunakan toples berkapsitas 1liter (dokumentasi pribadi, 2015)

c. Kultur Murni 2 (Kultur toples 10 liter)

Pada tahap kultur murni 2, pengkulturan dilakukan menggunakan toples berkapsitas 10 liter. Dalam tahap ini sterilisasi media dilakukan dengan penambahan kaporit 10 ppm lalu dilakukan pengukuran pH media. Pengukuran pH media dilakukan dengan tujuan untuk memastikan bahwa kondisi pH media dalam keadaan netral. Apabila pH media belum dalam keadaan netral, dilakukan penambahan thiosulfat  $\geq 5$  ppm. Setelah pH media netral dilakukan pemindahan bibit kedalam media dengan perbandingan antara bibit dan media sebesar 3 :7. Setelah itu, ditambahkan pupuk dan vitamin dengan dosis 1 ml/liter. Suhu dikondisikan sebesar 25°C dengan penyinaran menggunakan lampu TL 40 watt.



(A)



(B)

**Gambar 11.** (A) Pemindahan bibit ke dalam toples berukuran 10 liter serta pemberian pupuk dan vitamin (B) Kultur murni 2 (dokumentasi pribadi, 2015)

## 2) Kultur Intermediet atau Semi Massal

Pada tahap kultur intermediet atau semi massal digunakan bak berkapasitas 500 liter sampai 1 ton. Tahap pertama pada kultur intermediet ini yaitu sterilisasi media air laut. Sterilisasi media air laut dilakukan dengan penambahan kaporit 10 ppm dan penetralan dengan menggunakan thiosulfat 5 ppm, dimana lama sterilisasi ini minimal dilakukan selama 24 jam. Sebelum dilakukan penambahan bibit kedalam media steril, dilakukan penambahan pupuk walne dengan dosis 1 ml/liter. Perbandingan penggunaan bibit dan media sebesar 3 : 7. Kultur dilakukan pada ruangan semi outdoor dengan atap fiber tembus cahaya matahari. Pada kultur tahap intermediet, proses inkubasi dilakukan selama 5-7 hari.



**Gambar 12.** Tahap kultur intermediet atau semi massal (dokumentasi pribadi, 2015)

#### 4.2 Isolasi Fragmen Pigmen Protein *Chlorella vulgaris*

FPP didapatkan dari proses isolasi mikroalga laut *C. vulgaris*. Hasil kultur yang dilakukan sebanyak  $\frac{1}{2}$  ton menghasilkan endapan atau disebut dengan bubuk *C. vulgaris* sebanyak  $\pm$  830 ml basah. Selanjutnya bubuk *C. vulgaris* dipindahkan kedalam falcon steril, yang masing-masing falcon memiliki volume 50 ml. Bubur yang telah dimasukkan kedalam falcon lalu disimpan kedalam deep freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  agar kualitas dari bubuk *C. vulgaris* tetap terjaga.

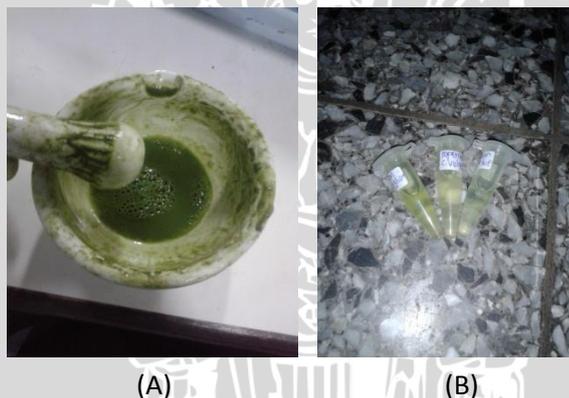


(A) (B)

**Gambar 13.** (A) Bubur *C. vulgaris* yang disimpan dalam falcon 50 ml (b) pemberian nitrogen cair (dokumentasi pribadi, 2015)

Mengacu pada Yanuhar (2015), untuk menghasilkan FPP dilakukan isolasi protein mikroalga laut *C. vulgaris*. Bubur yang telah disimpan ada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  diambil dan disesuaikan dengan suhu kamar  $20^{\circ}\text{C}$  (*thawing*). Isolasi FPP dimulai dengan penimbangan sampel *C. vulgaris* sebanyak 10 gram basah. Sampel diletakkan dalam mortar lalu ditambahkan nitrogen cair sebanyak kurang lebih 5 ml. Penambahan nitrogen cair ini berfungsi untuk memberikan kejutan karena nitrogen cair memiliki sifat yang dingin sehingga dapat membekukan sampel. Pemberian nitrogen cair diharapkan ketika sampel digerus menggunakan alu, dinding sel akan dapat pecah dan protein dalam mikroalga dapat keluar. Setelah pemberian nitrogen cair, sampel digerus selama 15 menit, lalu ditambahkan gysin dan KCl 7 ml secara bertahap. Pemberian gysin dan KCl

7 ml berfungsi sebagai pelarut. Penggerusan dilanjutkan selama 2 jam hingga sampel berubah warna menjadi hijau kekuningan dan mengeluarkan buih. Setelah itu, hasil penggerusan sampel dimasukkan ke dalam eppendorf steril berukuran 2 ml yang selanjutnya akan dilakukan proses sentrifuge. Banyaknya sampel yang dimasukkan ke dalam eppendorf harus seragam yaitu sebanyak 1,5 ml sampel yang dimasukkan ke dalam setiap eppendorf. Setelah itu dilakukan proses sentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm, selama 10 menit dengan suhu 4°C. Setelah proses sentrifuge selesai, dilakukan proses pemisahan hasil supernatan yaitu larutan yang berwarna kuning bening pada bagian atas dalam eppendorf dengan hasil pellet yaitu bagian yang menggumpal dan mengendap dibagian bawah eppendorf.

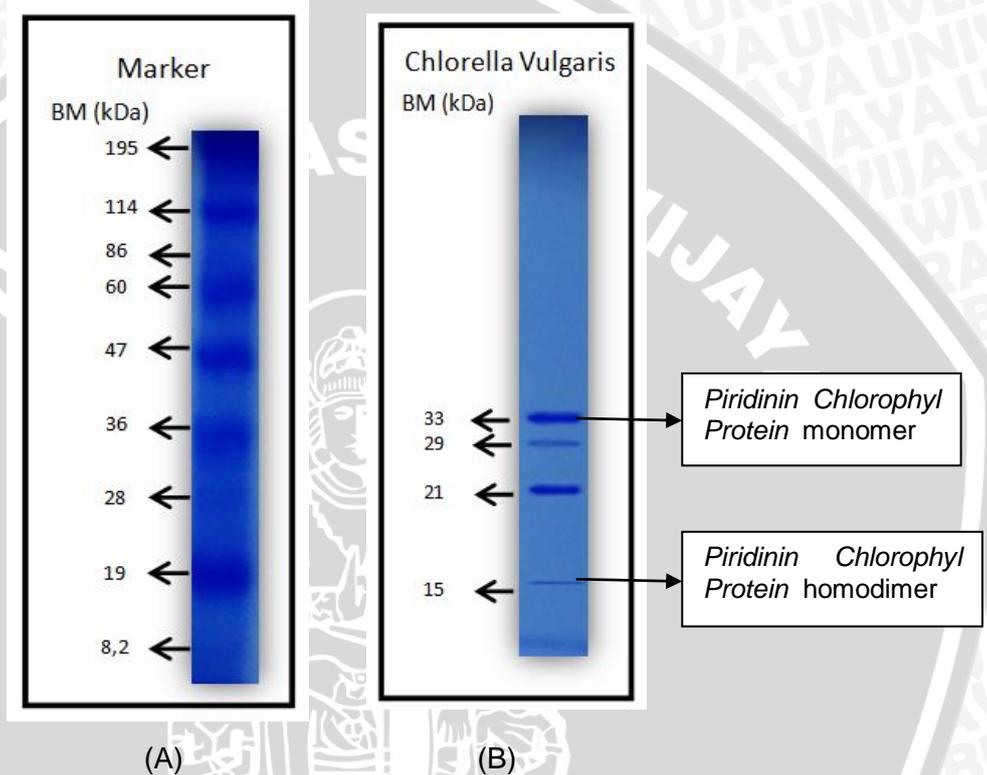


**Gambar 14.** Proses (A) Penggerusan sampel (B) Hasil supernatan proses sentrifuge (dokumen pribadi, 2015)

Setelah melakukan proses sentrifuge, hasil supernatan yang didapat lalu dilakukan proses pengukuran konsentrasi protein menggunakan nanodrop-spectrophotometry UV-VIS. Pengukuran konsentrasi protein dengan nanodrop-spectrophotometry menggunakan 3 panjang gelombang yaitu 260, 280 dan 320. Dan didapatkan hasil konsentrasi protein *C. vulgaris* sebesar 0,067 mg/l.

#### 4.3 Profil fragmen pigmen protein *C. vulgaris*

Untuk melihat profil FPP *C. vulgaris* digunakan metode SDS-PAGE. Metode ini merupakan salah satu metode yang banyak digunakan dalam mendeteksi protein. Hasil SDS-PAGE profil FPP *C. vulgaris* dapat dilihat pada gambar 15.



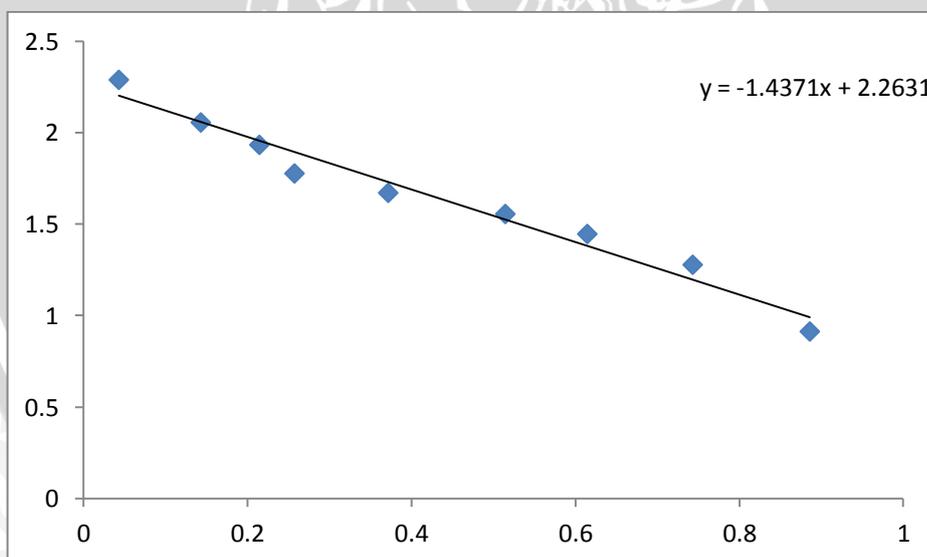
**Gambar 15.** (A) Marker (B) Hasil SDS-PAGE Protein *C. vulgaris*

Hasil analisa pada gambar 15 diatas menunjukkan terdapat band protein yang terlihat. Untuk mengetahui berat molekul band protein perlu dilakukan perhitungan. Pertama dilakukan perhitungan untuk mencari rumus linear band protein marker yang digunakan. Data hasil perhitungan padat dilihat pada tabel 6 dibawah ini.

**Tabel 8.** Perhitungan Berat Molekul Band Pita Marker

BM(kDa)	Log BM (y)	A (mm)	B (mm)	Rf (x)
195	2.30	3	70	0.04
114	2.06	10	70	0.14
86	1.93	15	70	0.21
60	1.78	18	70	0.25
47	1.67	26	70	0.37
36	1.56	36	70	0.51
28	1.45	43	70	0.61
19	1.28	52	70	0.74
8.2	0.91	62	70	0.88

Setelah didapat hasil perhitungan berat molekul pada pita band protein marker, selanjutnya adalah menghitung persamaan linear dari hasil diatas dengan menggunakan Microsoft excel. Hasil perhitungan grafik linear dapat dilihat pada gambar 16 dibawah ini:

**Gambar 16.** Grafik linear pita protein marker *C. vulgaris*  
(Sumber: dokumentasi pribadi)

Dari grafik diatas didapatkan hasil persamaan linear pada pita protein marker yaitu  $y = -1,4371x + 2,2631$ . Setelah didapatkan rumus linear tersebut, dilakukan perhitungan berat molekul band protein *C.vulgaris*. Hasil perhitungan tersebut dapat dilihat pada tabel 7 dibawah ini.

**Tabel 9.** Perhitungan Berat Molekul Band Protein *C. vulgaris*

A(mm)	B(mm)	Rf (x)	$y = -1,4371x + 2,2631$	BM Sampel
36	70	0.51	1.52402	<b>33.42</b>
39	70	0.56	1.46243	29.00
45	70	0.64	1.33925	21.83
52	70	0.74	1.19554	<b>15.69</b>

Setelah hasil penghitungan berat molekul band protein, ditemukan bahwa FPP pada *C. vulgaris* terdapat 4 band protein yaitu dengan berat molekul 33 kDa, 29 kDa, 21 kDa, dan 15 kDa. Berdasarkan hasil berat molekul yang tampak, dapat diindikasikan bahwa FPP dari mikroalga *C. vulgaris* merupakan *Peridinin Chlorophyl Protein (PCP)* yang memiliki dua *peridinin* yaitu bentuk monomer (bentuk panjang) dengan berat molekul 33 kDa dan bentuk homodimer (bentuk pendek) dengan berat molekul 15 kDa. Indikasi ini didasarkan pada beberapa penelitian dan literatur salah satunya yaitu Weis *et al*, (2002) yang menyebutkan bahwa *Peridinin* memiliki dua bentuk yaitu satu sebagai homodimer (bentuk pendek) dengan berat molekul berkisar 14-16 kDa dan yang lain sebagai monomer (bentuk panjang) dengan berat molekul berkisar antara 30-35 kDa.

#### 4.4 Uji In-vivo FPP Pada Ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*)

Pengujian in-vivo FPP pada ikan kerapu tikus dilakukan selama 27 hari. Ikan uji menggunakan ikan kerapu tikus berukuran 13-15 cm dan berat tubuh yang digunakan  $\pm 46$  gr. Pemberian FPP pada ikan kerapu tikus dilakukan dengan menggunakan metode sonde. Menurut Yanuhar (2009), metode sonde

merupakan pemberian makanan kedalam tubuh ikan dengan cara memasukkan makanan tersebut langsung kedalam mulut ikan. Dosis yang digunakan disesuaikan dengan berat badan ikan. Pemberian FPP dilakukan sebanyak 6 kali yaitu pada hari ke-0 dengan dosis hari ke-0 (306  $\mu\text{l}/\text{ikan}$ ), hari ke-6 (315  $\mu\text{l}/\text{ikan}$ ), hari ke-9 (322  $\mu\text{l}/\text{ikan}$ ), hari ke-14 (326  $\mu\text{l}/\text{ikan}$ ), hari ke-19 (345  $\mu\text{l}/\text{ikan}$ ) dan hari ke-24 (351  $\mu\text{l}/\text{ikan}$ ).



**Gambar 17.** Teknik penyondean FPP pada ikan kerapu tikus (*C. altivelis*)

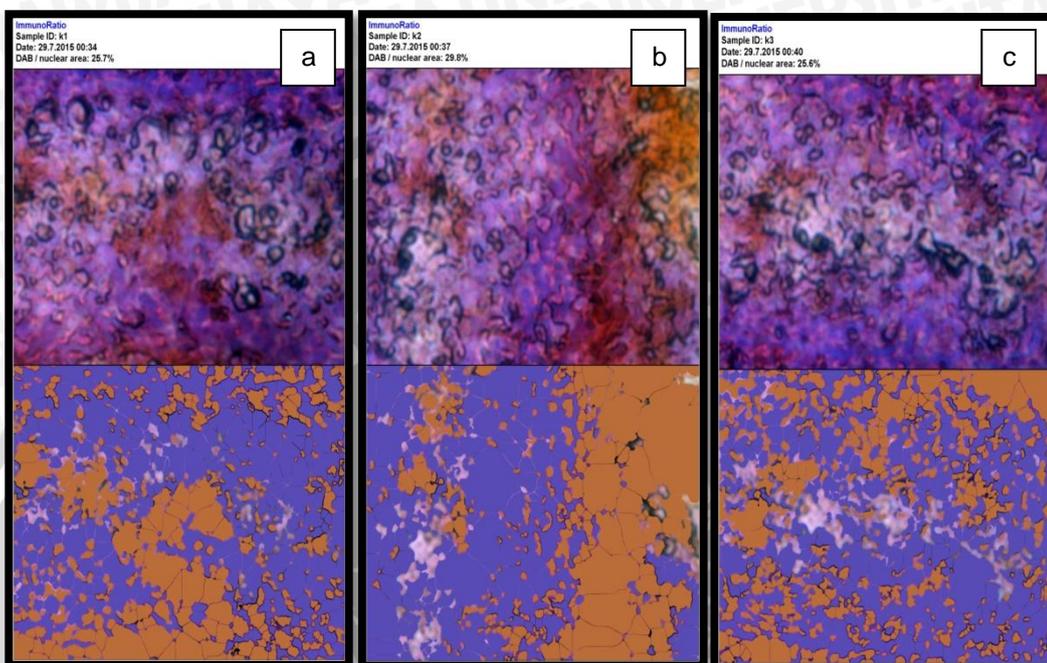
#### 4.5 Profil $\beta$ -aktin Pada Organ Hati *C. altivelis*

Visualisasi profil  $\beta$ -aktin dapat menggunakan metode imunohistokimia (IHK). IHK mampu memvisualisasikan komponen sel, seperti protein atau makromolekul lainnya pada sampel jaringan.

##### 4.5.1 Organ Hati Ikan Kontrol

Ikan kontrol merupakan ikan yang tanpa diberikan perlakuan FPP maupun VNN. Pengamatan ini dilakukan dengan tujuan untuk melihat profil  $\beta$ -aktin pada ikan normal. Metode IHK yang digunakan pada penelitian ini adalah *indirect methode* yang menggunakan dua antibodi yaitu primer dan sekunder. Menurut Hasdianah *et al.*, (2014), IHK digunakan untuk mendeteksi keberadaan antigen spesifik didalam suatu sel jaringan dengan menggunakan prinsip pengikatan antara antibodi dengan antigen pada jaringan hidup. Antibodi primer yang digunakan adalah antibody monoklonal  $\beta$ -actin (AC-15), sedangkan antibody sekunder yang digunakan adalah anti mouse conjugate pajotin. Antibodi primer (tidak berlabel) berfungsi untuk mengenali antigen yang

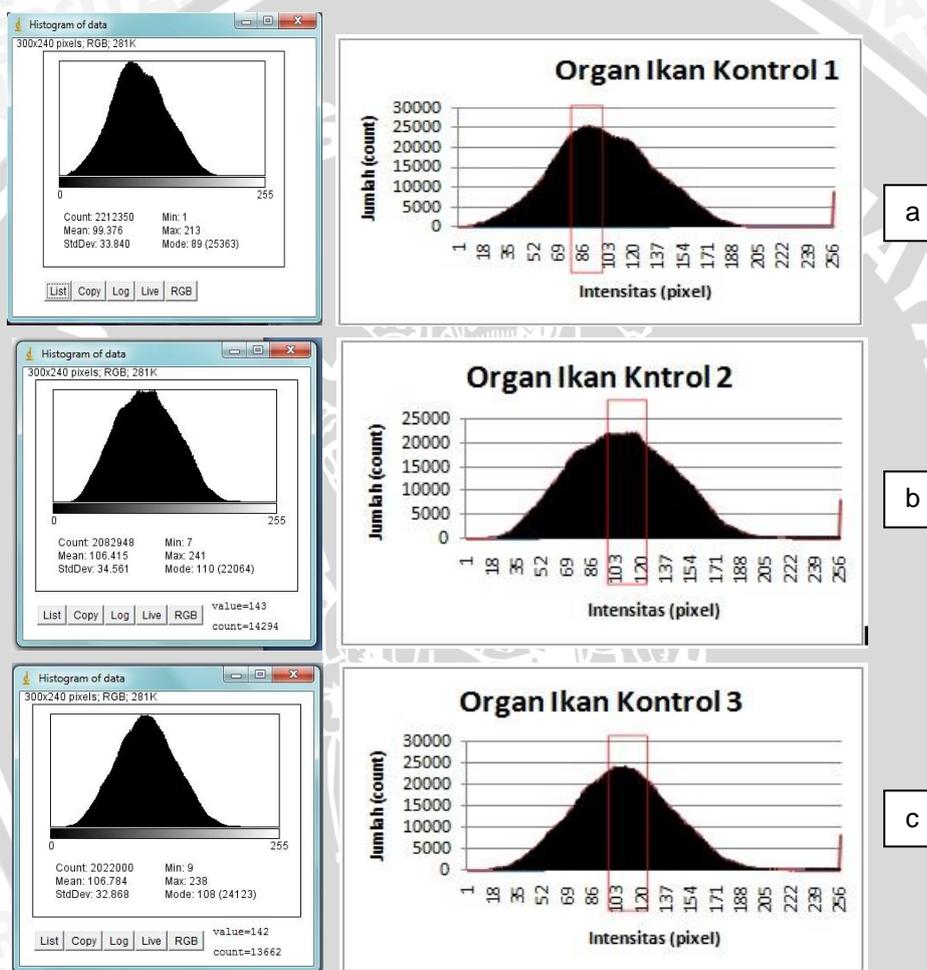
diidentifikasi pada jaringan, sedangkan antibodi sekunder berfungsi untuk berikatan dengan antibodi primer. Hasil IHK organ ikan kontrol dapat dilihat pada gambar 18 dibawah ini.



**Gambar 18.** Hasil Pengamatan Profil organ hati ikan kontrol dengan pembesaran 40x

Jika dilihat dari gambar diatas, organ hati ikan kontrol masih dalam kondisi yang normal, dapat dilihat dari penampakan sel-sel jaringan dalam kondisi normal. Salah satu teknik analisa yang bisa digunakan dalam IHK adalah menggunakan software *Immunoratio* (IR) (Tuominen *et al.*, 2010). Hasil analisa *Immunoratio* pada ikan kontrol didapatkan rata-rata prosentase nilai DAB pada ketiga gambar diatas sebesar 27,03% yang didapatkan dari prosentase gambar 18a sebesar 25,7 %, prosentase gambar 18b sebesar 29,8% dan prosentase gambar 18c sebesar 25,6%. Nilai rata-rata DAB menunjukkan bahwa keberadaan gen target  $\beta$ -aktin pada ikan kontrol sebesar 27,03 % ditunjukkan dengan adanya warna orange yang berarti bahwa adanya ikatan antara antigen dengan antibodi yang diberikan. Menurut Varghese *et al.*, (2014) analisa IHK juga bisa dilakukan dengan pencitraan gambar ImageJ untuk melihat kerapatan

pixelnya, semakin kecil angka semakin pekat. Penilaian histogram didasarkan pada intensitas pixel, angka 0 mewakili angka paling gelap/pekat, sedangkan 255 menunjukkan angka rendah. Dari angka 0 sampai 255 terbagi dalam 4 zona, yaitu 0-60 positif kuat, 61-120 positif, 121-180 positif lemah, dan 181-255 negatif. Grafik histogram organ hati ikan kontrol dapat dilihat pada gambar 19 dibawah ini.



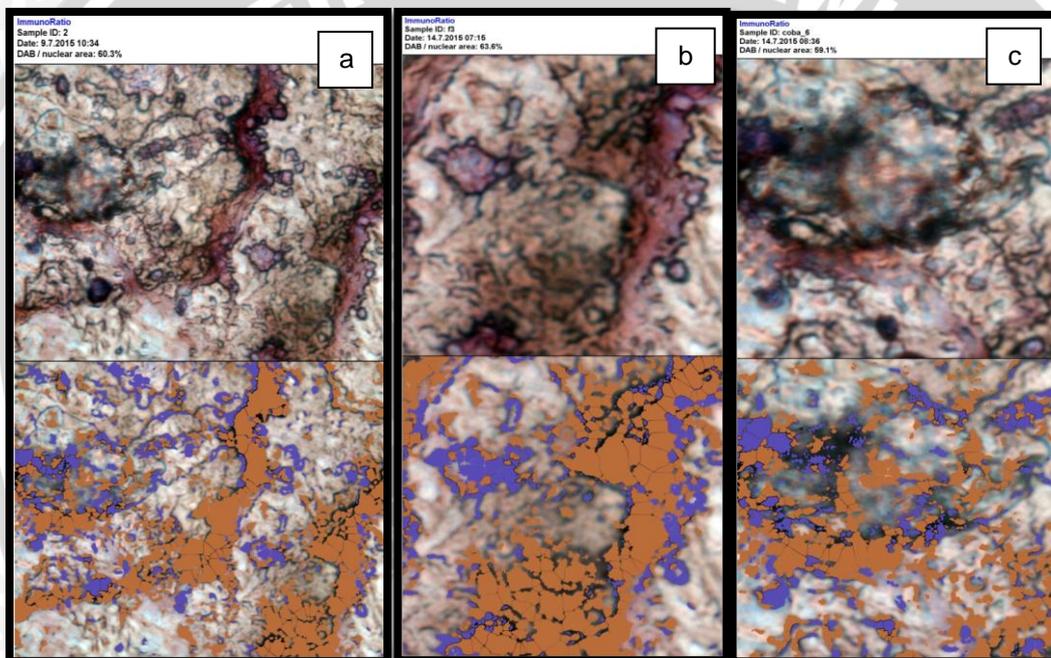
**Gambar 19.** Grafik dan Histogram dengan menggunakan software *imageJ* pada organ hati ikan kontrol

Pada gambar organ ikan control 1 (gambar 19a) diatas menunjukkan bahwa keberadaan gen target  $\beta$ -aktin dalam kategori positif karena berdatap pada kisaran 86-103. Pada ikan kontrol 2 (gambar 19b) menunjukkan keberadaan gen target  $\beta$ -aktin berada pada kisaran 103-120, hal ini

menunjukkan bahwa ikatan  $\beta$ -aktin pada organ ikan kontrol 2 berada pada kategori positif. Dan pada organ ikan kontrol 3 (gambar 19c) keberadaan gen target  $\beta$ -aktin juga dalam kategori positif karena berada ada kisaran 103-120.

#### 4.5.2 Organ Hati Ikan Perlakuan FPP

Pada organ hati ikan perlakuan pemberia FPP, dapat dilihat bahwa tampak terdapat perbedaan jika dibandingkan dengan hasil profil organ ikan kontrol. Gambar IHK organ hati yang diberikan perlakuan penginduksian FPP dapat dilihat dibawah ini.

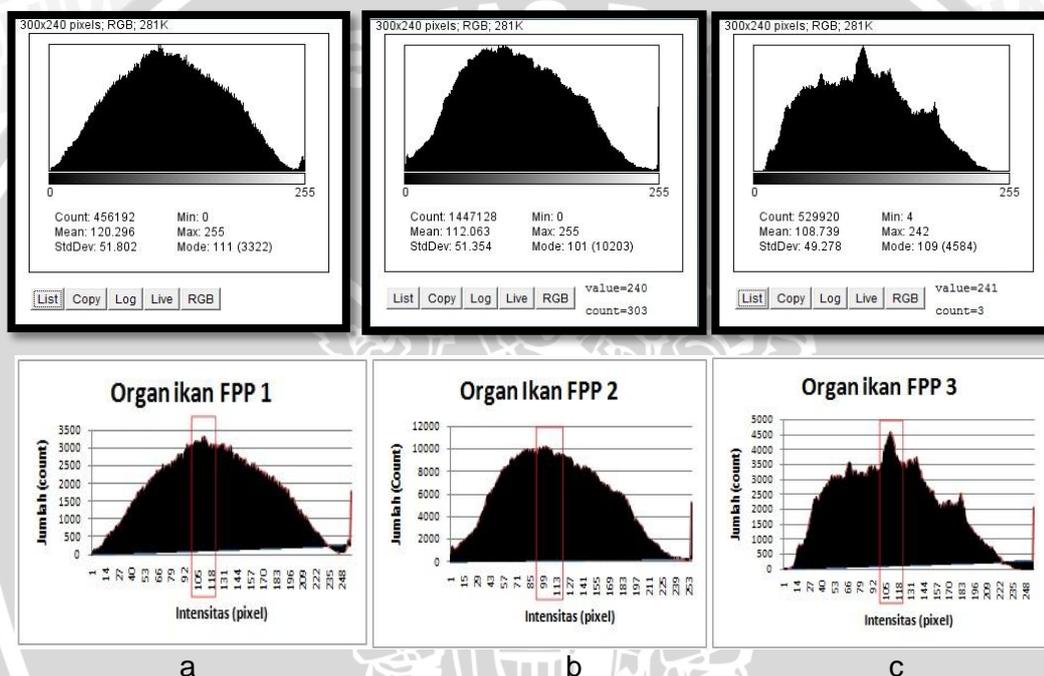


**Gambar 20.** Hasil Pengamatan Profil organ hati ikan perlakuan FPP dengan pembesaran 40x

Pada gambar 20 diatas terlihat jelas adanya warna kuning kecoklatan atau warna orange yang cukup banyak, yang menandakan adanya ikatan antara antigen dengan antibodi yang diberikan. Hasil analisa melalui IR menunjukkan nilai rata-rata DAB organ ikan perlakuan FPP sebesar 61,0%. Rata-rata DAB didapatkan dari prosentase gambar 20a sebesar 60,3%, presentase gambar 20b sebesar 63,6% dan prosentase gambar 20c sebesar 59,1%. Hal tersebut

menyatakan bahwa pada organ hati perlakuan pemberian FPP terdapat rata-rata ekspresi  $\beta$ -aktin sebesar 60,3%. Berarti FPP mampu menjadi *inducer* dalam meningkatkan ekspresi  $\beta$ -aktin yang dibuktikan dengan meningkatnya nilai prosentase DAB pada organ ikan perlakuan pemberian FPP jika dibandingkan dengan nilai DAB pada organ hati ikan kontrol.

Grafik histogram organ hati ikan perlakuan FPP dapat dilihat pada gambar dibawah ini.



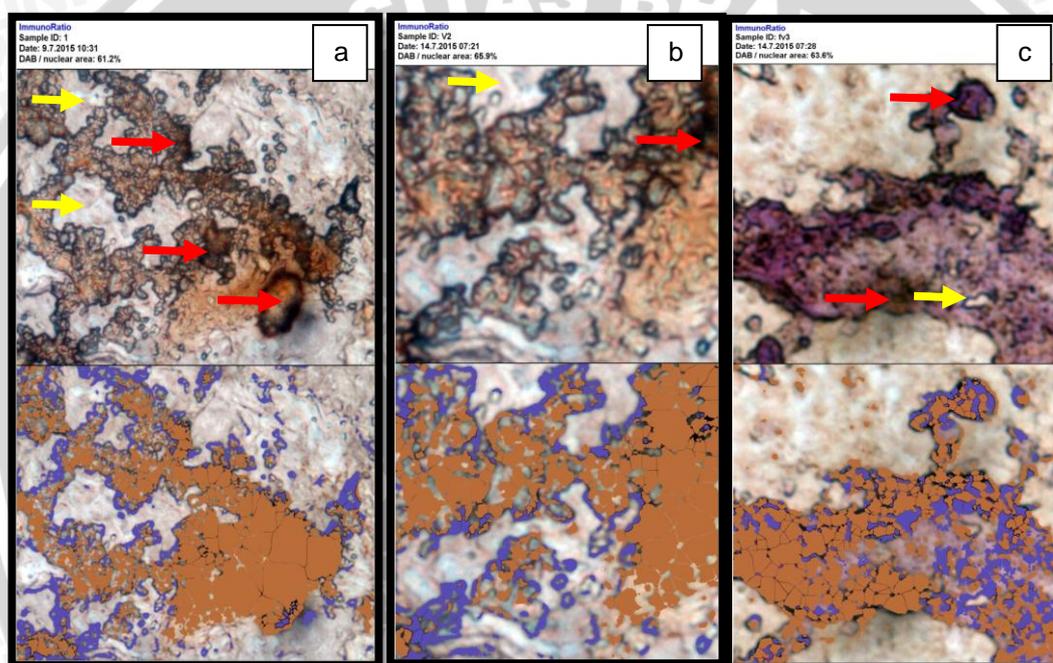
**Gambar 21.** Grafik dan Histogram dengan menggunakan software *imageJ* pada organ hati ikan perlakuan FPP

Pada gambar organ ikan Perlakuan FPP diatas, dapat dilihat bahwa Organ ikan perlakuan FPP 1 (gambar 21a) menunjukkan bahwa keberadaan gen target  $\beta$ -aktin dalam kategori positif karena berdatap pada kisaran 106-118. Pada ikan perlakuan FPP 2 (gambar 21b) menunjukkan keberadaan gen target  $\beta$ -aktin berada pada kisaran 99-113, hal ini menunjukkan bahwa ikatan  $\beta$ -aktin pada organ ikan perlakuan FPP 2 berada pada kategori positif. Dan pada organ ikan

perlakuan FPP 3 (gambar 21c) keberadaan gen target  $\beta$ -aktin juga dalam kategori positif karena berada ada kisaran 105-118.

#### 4.5.3 Organ Hati Ikan Perlakuan VNN

Sedangkan pada organ hati ikan perlakuan yang diinfeksi VNN dapat dilihat bahwa tampak terdapat perbedaan jika dibandingkan dengan hasil profil organ ikan kontrol maupun profil organ ikan pemberian FPP. Gambar Hasil IHK organ hati ikan perlakuan VNN dapat dilihat pada gambar dibawah ini.

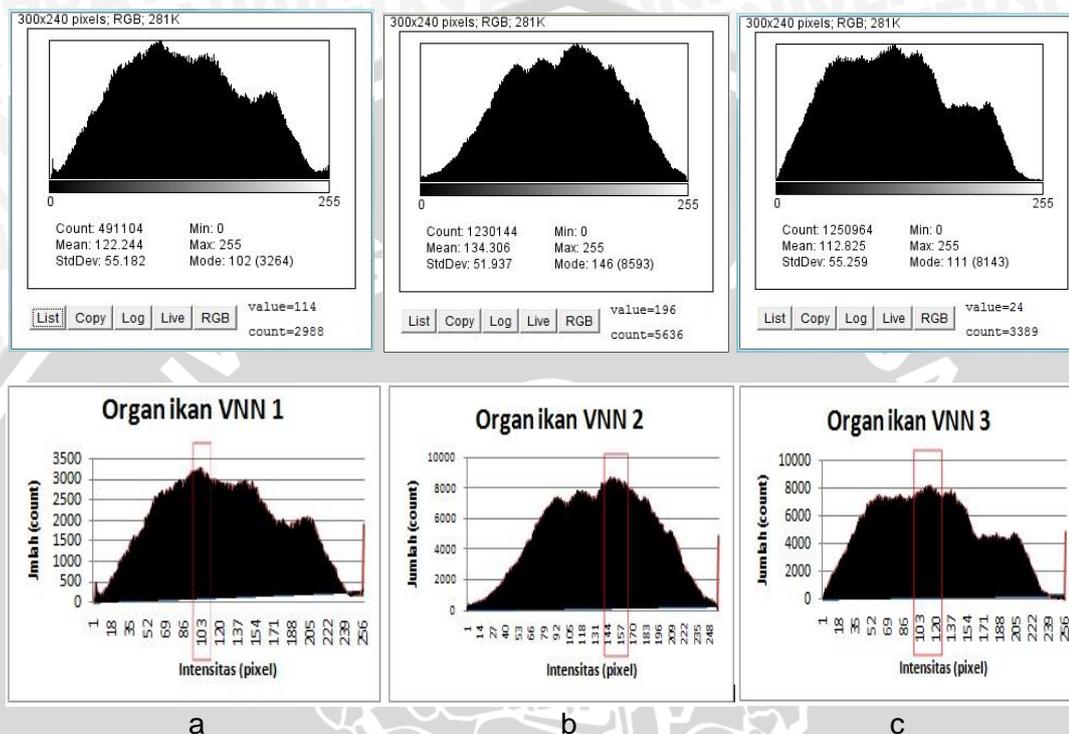


**Gambar 22.** Hasil Pengamatan Profil organ hati ikan perlakuan VNN dengan Pembesaran 40x

Dari gambar diatas, dapat dilihat bahwa nilai rata-rata DAB organ hati ikan perlakuan VNN sebesar 63,57%. Nilai ini didapat dari prosentase gambar 22a sebesar 61,2 %, presentase gambar 22b sebesar 65,9% dan prosentase gambar 22c sebesar 63,6%. Nilai analisa IR menunjukkan nilai rata-rata BAD sebesar 63,57 %, hal itu menunjukkan pada organ hati yang diinfeksi VNN prosentase ekspresi  $\beta$ -aktin sebesar 63,57%. Dari analisa DAB diatas

menunjukkan bahwa tubuh ikan dapat merespon kehadiran VNN dengan memberikan respon berupa peningkatan ekspresi  $\beta$ -aktin.

Grafik histogram organ hati ikan perlakuan VNN dapat dilihat pada gambar dibawah ini.



**Gambar 23.** Grafik dan Histogram dengan menggunakan software *imageJ* pada organ hati ikan perlakuan VNN

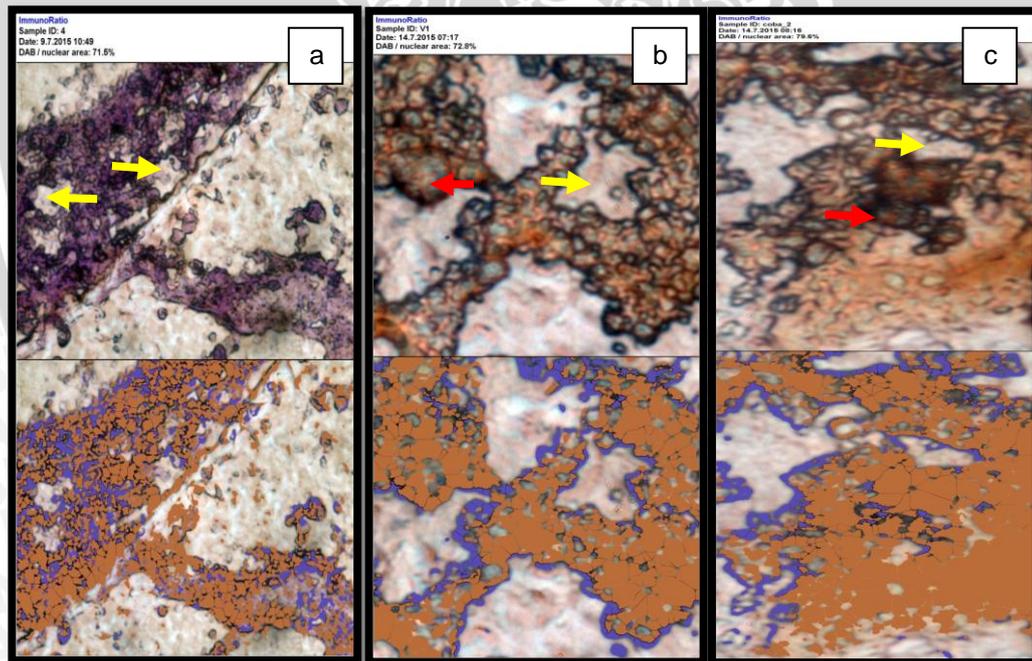
Pada gambar organ ikan Perlakuan VNN diatas, dapat dilihat bahwa Organ ikan perlakuan VNN 1 (gambar 23a) menunjukkan bahwa keberadaan gen target  $\beta$ -aktin dalam kategori positif karena berdatap pada titik 103. Pada ikan perlakuan VNN 2 (gambar 23b) menunjukkan keberadaan gen target  $\beta$ -aktin berada pada kisaran 144-157, hal ini menunjukkan bahwa ikatan  $\beta$ -aktin pada organ ikan perlakuan VNN 2 berada pada kategori positif lemah. Sedangkan pada organ ikan perlakuan VNN 3 (gambar 23c) keberadaan gen target  $\beta$ -aktin dalam kategori positif karena berada pada kisaran 103-120.

Pada hasil analisa imunohistokimia juga tampak terjadi kerusakan jaringan akibat memberikan infeksi VNN. Beberapa kerusakan yang terjadi seperti

kerusakan vakuolis (ruang kosong) yang ditunjukkan oleh panah kuning pada gambar 20a dan necrosis (peradangan) yang ditunjukkan oleh panah merah. Nekrosis (peradangan) biasanya ditandai dengan adanya warna merah disekitar jaringan (Sukarni *et al.*,2012). Hal ini mengindikasikan bahwa serangn VNN yang menyerang ikan kerapu tikus menyebabkan kerusakan sel dan jaringan pada inang.

#### 4.5.4 Organ Hati Ikan Perlakuan FPP dan VNN

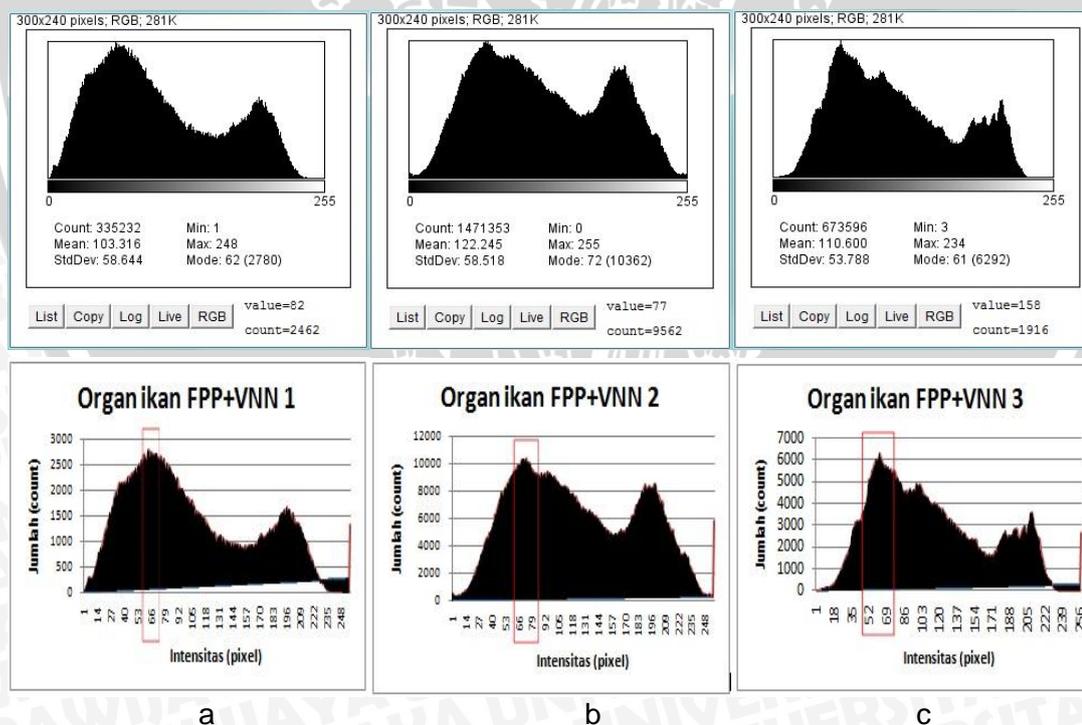
Pada organ hati ikan yang diinduksi FPP dan diinfeksi VNN terjadi peningkatan jumlah gen  $\beta$ -aktin yang ditunjukkan dengan banyaknya warna orange (gambar 24b). Berikut adalah gambar hasil IHK dari organ ikan perlakuan yang diinduksi FPP dan infeksi VNN.



**Gambar 24.** Hasil Pengamatan Profil organ hati ikan perlakuan FPP dan VNN dengan pembesaran 40x

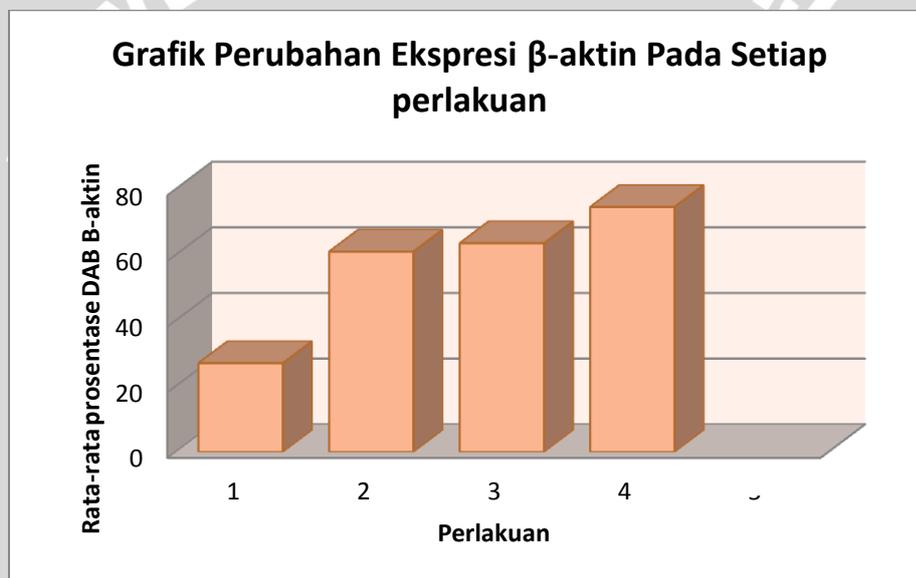
Pada gambar diatas, didapatkan hasil rata-rata DAB sebesar 74,63 %. Nilai ini didapat dari prosentase gambar 24a sebesar 71,5 %, presentase gambar 24b sebesar 72,8% dan prosentase gambar 24c sebesar 79,6%. Nilai analisa IR menunjukkan nilai rata-rata BAD sebesar 74,63 % menunjukkan pada organ hati yang diinduksi FPP dan diinfeksi VNN prosentase ekspresi  $\beta$ -aktin sebesar 74,63 %, yang berarti bahwa ekspresi  $\beta$ -aktin pada organ hati perlakuan induksi FPP dan pemberian infeksi VNN sebesar 74,63%. Jumlah ini merupakan jumlah DAB yang paling besar jika dibandingkan dengan nilai DAB pada perlakuan yang lainnya. Meskipun masih tampak beberapa kerusakan yang terlihat, seperti terdapat beberapa kerusakan vakuolis (panah kuning) dan necrosis (panah merah).

Grafik histogram organ hati ikan perlakuan FPP dan VNN dapat dilihat pada gambar dibawah ini.



**Gambar 25.** Grafik dan Histogram dengan menggunakan software *imageJ* pada organ hati ikan perlakuan FPP dan VNN

Pada gambar organ ikan Perlakuan FPP dan VNN diatas, dapat dilihat bahwa Organ ikan perlakuan FPP dan VNN 1 (gambar 25a) menunjukkan bahwa keberadaan gen target  $\beta$ -aktin dalam kategori positif karena berdatap pada titik 66. Pada ikan perlakuan FPP dan VNN 2 (gambar 25b) menunjukkan keberadaan gen target  $\beta$ -aktin berada pada kisaran 66-79, hal ini menunjukkan bahwa ikatan  $\beta$ -aktin pada organ ikan perlakuan FPP dan VNN 2 berada pada kategori positif. Dan pada organ ikan perlakuan FPP dan VNN 3 (gambar 25c) keberadaan gen target  $\beta$ -aktin dalam kategori positif karena berada pada kisaran 52-69. Dibawah ini merupakan grafik perubahan prosentase DAB tiap perlakuan.



**Gambar 26.** Grafik Perubahan Ekspresi  $\beta$ -aktin Pada Setiap Perlakuan (Ket : 1.Kontrol, 2. FPP, 3. VNN, 4. FPP+VNN)

Pada gambar diatas terlihat bahwa prosentase rata-rata DAB tertinggi terdapat pada perlakuan 4 yaitu penginduksian FPP dan infeksi VNN dengan rata-rata DAB sebesar 74,63%. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian FPP dapat meningkatkan respon imun pada ikan yang dapat dilihat dari meningkatnya ekspresi  $\beta$ -aktin ketika VNN menyerang tubuh ikan kerapu tikus. Disini juga dapat dikatakan bahwa pembentukan sistem imun dengan pemberian FPP berhasil.

FPP dari mikroalga *C. vulgaris* yang diinduksikan pada ikan kerapu tikus mampu memberikan dampak yang cukup signifikan terhadap peningkatan ekspresi  $\beta$ -aktin. Terjadinya peningkatan tersebut tidak terlepas dari kandungan yang dimiliki mikroalga *C. vulgaris* yaitu FPP yang berupa PCP yang mampu menjadi biokatalisator dalam pembentukan ekspresi  $\beta$ -aktin. Peningkatan dan perubahan profil  $\beta$ -aktin akan berdampak terhadap perubahan fungsi seluler pada tubuh organisme.

Menurut Chow *et al.*, (2002),  $\beta$ -aktin berperan dalam mengatur pengangkutan molekul MHC ke membran sel. Dimana molekul MHC ini merupakan komponen penting dalam aktivasi sel T. Kurangnya ekspresi  $\beta$ -aktin akan mengakibatkan berkurangnya ekektifitas presentasi MHC (*Major Histocompatibility Complex*) yang akhirnya akan berdampak pada berkurangnya presentasi antigen ke sel T yang dilakukan oleh APC (*Antigen Presenting Cell*).

#### 4.6 Analisa Data

Analisa data pada penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan yaitu pertama merupakan ikan kontrol, ikan kedua merupakan ikan perlakuan penginduksian FPP, ketiga merupakan ikan perlakuan penginfeksi VNN dan keempat merupakan ikan perlakuan penginduksian FPP dan penginveksian VNN, dengan 3 kali pengulangan setiap perlakuannya. Data yang digunakan dalam penelitian ini adalah data prosentasi DAB  $\beta$ aktin pada setiap perlakuan. Setelah didapatkan data tersebut, selanjutnya data dianalisa dengan menggunakan cara statistik yaitu analisa keragaman (ANOVA), dengan tujuan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan pemberian perlakuan. Setelah didapatkan data hasil penelitian, selanjutnya dilakukan analisa sidik ragam prosentase DAB  $\beta$ -aktin pada setiap perlakuan. Tabel analisa sidik ragam dapat dilihat dibawah ini. Sedangkan perhitungan analisa sidik ragam (ANOVA) dapat dilihat pada lampiran 5.

Berdasarkan analisa sidik ragam, diperoleh hasil  $F_{hitung} > F_{tabel}$ . Ini menunjukkan bahwa hasil pemberian perlakuan yang berbeda yaitu pemberian FPP, pemberian VNN serta pemberian FPP dan VNN berpengaruh berbeda nyata dengan tingkat ekspresi  $\beta$ -aktin. Hal ini menandakan adanya pengaruh pemberian perlakuan berbeda terhadap jumlah ekspresi gen  $\beta$ -aktin yang ditunjukkan oleh besarnya prosentase DAB. Hal ini karena pemberian perlakuan yang berbeda sehingga jumlah ekspresi gen  $\beta$ -aktin juga berbeda.

Setelah didapatkan hasil analisa sidik ragam bahwa pemberian perlakuan berbeda nyata dengan hasil prosentase  $\beta$ -aktin, selanjutnya dilakukan uji BNT (Beda Myata Terkecil). Uji BNT perlu dilakukan untuk mengetahui bagaimana pengaruh dari pemberian perlakuan yang berbeda terhadap penambahan  $\beta$ -aktin. Perhitungan uji BNT dapat dilihat pada lampiran 6.

Dari hasil pengujian BNT diperoleh bahwa pemberian perlakuan yang berbeda pada ikan uji yaitu pemberian FPP, pemberian VNN dan pemberian FPP+VNN berbeda nyata terhadap jumlah prosentase DAB ekspresi  $\beta$ -aktin. Hal ini ditunjukkan oleh nilai selisih prosentase DAB  $>$  BNT 5%. Dengan perlakuan yang memberikan pengaruh paling besar yaitu pada perlakuan ke-3 yaitu perlakuan ikan yang diberikan FPP dan diinfeksi VNN dengan notasi d. Jika diurutkan dari notasi yang paling kecil hingga besar didapatkan hasil yaitu notasi a (pengaruh paling kecil) adalah perlakuan kontrol, selanjutnya perlakuan FPP dengan notasi b, perlakuan VNN dengan notasi c dan terakhir perlakuan FPP+VNN dengan notasi d yang memiliki pengaruh paling besar.

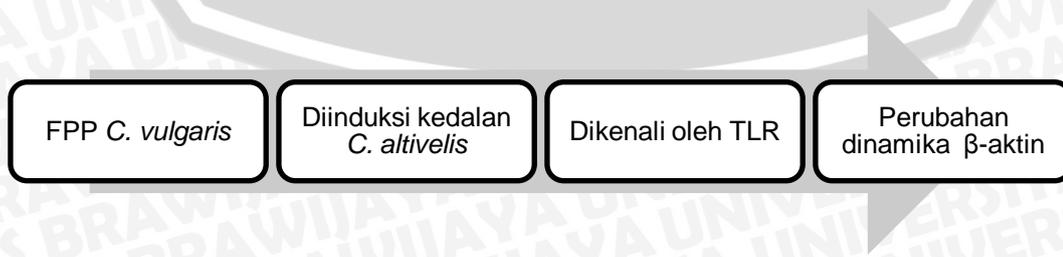
#### **4.7 Mekanisme $\beta$ -aktin Pada Sel Ikan Kerapu Tikus**

Pada dasarnya gen  $\beta$ -aktin telah ada dalam sel meskipun tidak adanya infeksi virus.  $\beta$ -aktin memiliki fungsi penting dalam sistem pertahanan tubuh terhadap infeksi patogen, seperti clustering reseptor, internalisasi antigen serta

mengatur keluar masuknya vesikel untuk pemrosesan antigen (Jonsson *et al*, 2012).

Mikroalga *C. vulgaris* merupakan salah satu alga yang memiliki potensi penting untuk dikembangkan. Salah satu komponen protein pigmen dalam *C. vulgaris* yang dapat dikembangkan adalah Fragmen pigmen protein yang dalam penelitian ini didapatkan berupa *Peridinin chlorophyll perotein* (PCP) dengan berat molekul 33 kDa (monomer) dan 15 kDa (homodimer). FPP merupakan protein pigmen dalam bentuk RNA atau enzim. Menurut Impru (2009), menyatakan bahwa protein dalam bentuk enzim dapat berfungsi sebagai katalis dalam berbagai proses biokimia dalam tubuh organisme, seperti pembentukan antibodi ketika tubuh kemasukan benda asing atau antigen.

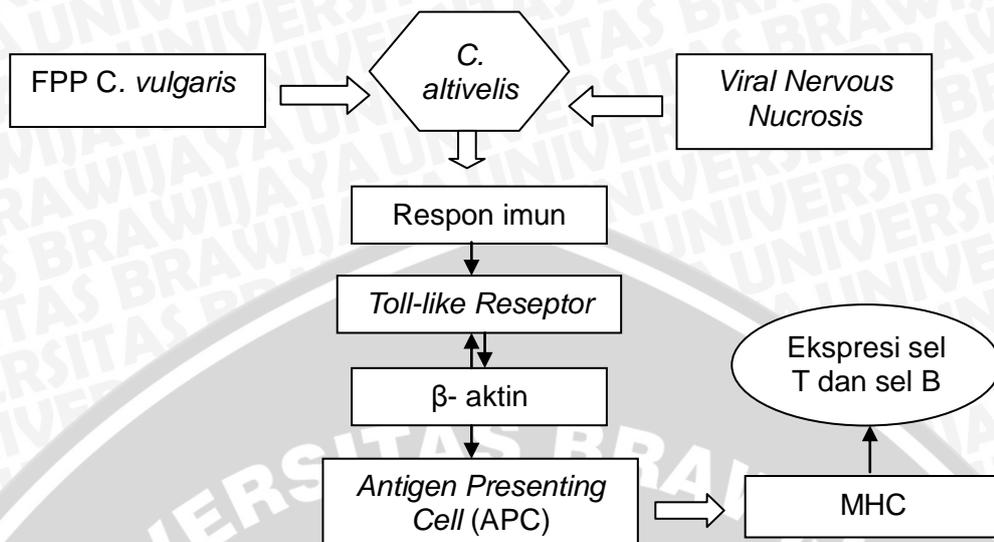
Dalam penelitian ini fragmen pigmen protein dari mikroalga *C. vulgaris* dijadikan sebagai inducer untuk meningkatkan ekspresi  $\beta$ -aktin. Fragmen Pigmen Protein (FPP) dari *C. vulgaris* yang diinduksikan pada *C. altivelis* mampu memberikan dampak yang cukup signifikan terhadap ekspresi  $\beta$ -aktin. Peningkatan dan perubahan profil  $\beta$ -aktin akan berdampak terhadap perubahan fungsi seluler pada tubuh organisme. Saat FPP diinduksikan kedalam tubuh ikan kerapu tikus, FPP kan dikenali oleh *Toll-like Receptor* (TLR). TLR merupakan reseptor yang mampu mengenali berbagai macam ligan salah satunya adalah protein (Ehrentraut, 2011). Sinyal dari TLR tadi akan merangsang transkripsi gen dan akan merubah dinamika aktin sitoskeleton.



**Gambar 27.** Mekanisme Perubahan Dinamika  $\beta$ -aktin Akibat Penginduksian FPP

VNN yang menyerang tubuh ikan akan masuk kedalam sel. Didalam sel keberadaan VNN akan dikenali oleh TLR. Seperti yang dijelaskan sebelumnya, TLR memiliki fungsi dalam mengenali antigen dalam sistem imun (Ehrentraut, 2011). Setelah itu VNN akan masuk kedalam sel makrofag dan diikat oleh molekul MHC. Molekul MHC memiliki rantai yang menjadi tempat penempelnya MHC dengan antigen (VNN). Antigen (VNN) yang telah berikatan dengan molekul MHC akan dipresentasikan oleh sel penampil antigen yang sering disebut *Antigen Presenting Cell* (APC). APC akan menangkap sebagian kecil antigen yang dapat dikenali oleh sel limfosit T penolong (Th) yang akan mengaktifasi limfosit lain seperti limfosit B atau limfosit T sitotoksik (Munasir, 2001). Menurut Baratawidjaja dan Iris (2010), sel T sitotoksik sering disebut sebagai sel pembunuh (*killer T cell*) berfungsi mengeliminasi dan memusnahkan sel yang terinfeksi atau sel-sel abnormal dengan cara melepaskan zat-zat yang bersifat toksik atau memicu sel agar melakukan distruksi sel. Sel T hanya mengenali imunogen yang terikat pada protein MHC pada permukaan sel. Dalam hal ini  $\beta$ -aktin berperan dalam pengaturan pengangkutan molekul MHC ke sel. Menurut Vascotto (2007), kurangnya ekspresi  $\beta$ -aktin akan menimbulkan kurang efektifnya presentasi MHC dan akhirnya mengurangi presentasi antigen ke sel T.

Konsep teori penelitian ini dapat dilihat pada gambar 24 dibawah ini.



Gambar 28. Konsep Taeori Penelitian

#### 4.8 Analisis Kualitas Perairan Pemeliharaan *C. altivelis*

Kualitas air dalam budidaya ikan adalah setiap peubah yang mempengaruhi pengelolaan dan sintasan, perkembangbiakan, pertumbuhan, atau produksi ikan. Air yang baik adalah yang mampu menunjang kehidupan ikan dengan baik. Dalam penelitian ini, analisa kualitas perairan yang diukur adalah sebagai berikut :

##### 4.8.1 Suhu

Suhu merupakan salah satu parameter fisika yang mempengaruhi pertumbuhan organisme dan kualitas perairan dalam budidaya. Kordi (2011), menyebtukan bahwa suhu mempengaruhi aktivitas biota, secara umum laju pertumbuhan meningkat seiring dengan kenaikan suhu namun dapat menekan kehidupan biota bahkan menyebabkan kematian apabila fluktuasi suhu sampai ekstrim (drastis). Hasil pengukuran suhu pada aquarium ikan Kerapu Tikus dapat dilihat pada Tabel 10.

**Tabel 10.** Hasil pengukuran suhu ( $^{\circ}\text{C}$ ) pada kolam ikan Kerapu Tikus).

Hari penyondean	Aquarium			
	1	2	3	4
0	30	30	30	29
6	31	30	31	29
9	30	29	30	30
14	30	30	29	31
19	29	29	29	28
24	29	30	29	30

\*Keterangan: 1 = aquarium ikan control  
 2= aquarium ikan FPP  
 3= aquarium ikan VNN  
 4= aquarium ikan FPP+VNN

Hasil pengukuran suhu yang diperoleh dari hasil penelitian pada aquarium ikan Kerapu Tikus pada tabel 10 berkisar  $28^{\circ}\text{C}$  sampai  $31^{\circ}\text{C}$ . Nilai suhu ini tidak terjadi perubahan yang signifikan per waktu penyondean pada setiap aquarium. Angka ini termasuk dalam kisaran suhu yang normal untuk lingkungan hidup ikan kerapu tikus. Kordi (2009), menyebutkan pertumbuhan ikan pada wilayah tropis akan berlangsung optimal pada kisaran suhu  $28^{\circ}\text{C}$  -  $32^{\circ}\text{C}$ . 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.

#### 4.8.2 Salinitas

Salinitas adalah konsentrasi dari total ion yang terdapat dalam perairan (Boyd, 1988 dalam Effendi, 2000). Salinitas menggambarkan kepadatan total didalam air setelah semua karbonat dikonversi menjadi oksida, semua promida dan iodida telah digantikan oleh klorida, dan semua bahan organik telah dioksidasi. Nilai salinitas perairan tambak akan mempengaruhi kondisi kesuburan perairan dan akan berpengaruh terhadap pertumbuhan ikan Kerapu Tikus. Hasil

pengukuran salinitas pada aquarium Ikan kerapu Tikus dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 11.

**Tabel 11.** Hasil pengukuran rata-rata salinitas (%) pada kolam ikan Kerapu Tikus

Hari penyondean	Aquarium			
	1	2	3	4
0	30	30	30	29
6	30	29	30	30
9	30	29	30	30
14	29	30	30	29
19	30	30	29	29
24	30	30	29	30

\*Keterangan: 1 = aquarium ikan control  
2= aquarium ikan FPP  
3= aquarium ikan VNN  
4= aquarium ikan FPP+VNN

Pada tabel 11 terlihat bahwa nilai salinitas air aquarium pemeliharaan ikan kerapu tikus berkisar antara 29%-30%. Nilai salinitas ini termasuk normal untuk lingkungan hidup ikan kerapu tikus. Menurut Putra (2008), salinitas yang ideal untuk pembesaran ikan Kerapu tikus adalah 28 ppt -33 ppt.

#### 4.8.3 Derajat Keasaman

Derajat Keasaman (pH) air mempengaruhi tingkat kesuburan perairan karena dapat mempengaruhi kehidupan jasad renik. Nilai pH dapat digunakan sebagai indeks kualitas lingkungan atau tolak ukur untuk menunjukkan tinggi rendahnya konsumsi ion hydrogen dalam suatu perairan. Pengukuran pH dilakukan pada pagi dan sore hari dengan pengamatan rutin setiap hari selama perlakuan. Menurut Ghufran, *et al.* (2007), pada pH rendah kondisi oksigen terlarut akan mengalami penurunan begitu sebaliknya. Hasil pengukuran rata-rata pH pada aquarium Kerapu Tikus (*C.altivelis*) dapat dilihat pada Tabel 12.

**Tabel 12.** Hasil pengukuran rata-rata pH pada kolam ikan Kerapu Tikus

Hari penyondean	Aquarium			
	1	2	3	4
0	7,9	7,7	7,9	7,9
6	7,6	7,9	7,6	7,7
9	7,9	7,8	7,7	7,6
14	7,9	7,9	7,8	7,9
19	7,7	7,8	7,9	7,8
24	7,9	7,7	7,8	7,7

\*Keterangan: 1 = aquarium ikan control  
 2= aquarium ikan FPP  
 3= aquarium ikan VNN  
 4= aquarium ikan FPP+VNN

Hasil pengukuran pH pada aquarium ikan Kerapu Tikus berkisar antara 7,6-7,9. Menurut 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.

#### 4.8.4 Oksigen Terlarut

Oksigen merupakan faktor penting bagi kehidupan makro dan mikro organisme perairan karena diperlukan untuk proses pernafasan. Sehingga apabila ketersediaannya dalam air tidak mencukupi, maka segala aktivitas biota akan terhambat. 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). Menurut Kordi *et al.*( 2007), ketersediaan oksigen bagi biota air menentukan lingkaran aktivitasnya, konversi pakan, demikian laju pertumbuhan bergantung pada oksigen dengan ketentuan faktor kondisi lainnya

adalah optimum. Hasil pengamatan oksigen terlarut pada aquarium ikan Kerapu Tikus dapat dilihat pada Tabel 13.

**Tabel 13.** Hasil pengukuran oksigen terlarut (mg/l) pada kolam ikan Kerapu Tikus

Hari penyondean	Aquarium			
	1	2	3	4
0	6,2	6,2	5,7	5,9
6	6,1	6	5,8	5,8
9	5,8	5,7	5,6	5,8
14	6	5,9	5,8	5,9
19	5,9	5,8	5,3	5,9
24	5,8	5,9	5,6	5,8

\*Keterangan: 1 = aquarium ikan control  
2= aquarium ikan FPP  
3= aquarium ikan VNN  
4= aquarium ikan FPP+VNN

Pada Tabel 13 menunjukkan hasil pengukuran oksigen terlarut yang didapatkan berkisar antara 5,3 mg/l-6,2 mg/l. Affan (2012), suhu berperan penting bagi kehidupan dan perkembangan biota laut, peningkatan suhu dapat menurunkan kadar oksigen terlarut sehingga mempengaruhi metabolisme seperti laju pernafasan dan konsumsi oksigen serta meningkatnya konsentrasi karbon dioksida.

Menurut Ahmad *et al.*, (1991) dalam Affan (2012), kisaran oksigen terlarut optimal untuk pemeliharaan ikan kerapu tikus berkisar 5 mg/l – 8 mg/l. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian ini yang menunjukkan nilai DO berkisar antara 5,3 mg/l-6,2 mg/l sehingga sesuai untuk pertumbuhan dan keberlangsungan hidup ikan Kerapu Tikus.

## 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa FPP yang ditemukan dalam *C. vulgaris* berupa PCP, yang memiliki dua *piridinin* yaitu bentuk monomer (bentuk panjang) dengan berat molekul 33 kDa dan bentuk homodimer (bentuk pendek) dengan massa molekul (berat molekul) 15 kDa. Pemberian Fragmen pigmen protein (FPP) mikroalga *C. vulgaris* mampu meningkatkan ekspresi  $\beta$ -aktin. Pada ikan kontrol DAB rata-rata ekspresi  $\beta$ -aktin sebesar 27,03%, pada ikan dengan pemberian FPP nilai rata-rata DAB sebesar 61%, ikan dengan penginfeksian VNN nilai DAB rata-ratanya sebesar 63,57%, dan ikan dengan penginduksian FPP dan penginfeksian VNN nilai DAB rata-ratanya sebesar 74,63%. Sehingga perlakuan yang paling berpengaruh yaitu ikan perlakuan dengan penginduksian FPP dan penginfeksian VNN. *Peridinin chlorophyll protein* (PCP) yang terkandung dalam *C. vulgaris* mampu menjadi biokatalisator terekpresinya  $\beta$ -aktin. Peningkatan ekspresi  $\beta$ -aktin dalam penelitian ini menjadi indikator peningkatan respon imun pada ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*).

### 5.2 Saran

Perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mengeksplorasi pemanfaatan sumberdaya hayati laut dalam menanggulangi serangan penyakit dan virus yang menyerang ikan kerapu tikus. Dalam penelitian dan pengkajian secara biologi molekuler tentang fungsi genomik dan proteomik dalam pembentukan gen-gen antivirus.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amelia, N. dan B. Salmat R. 2012. *Pengaruh Ekstrak Daun Jambu Biji (Psidium guajava) Untuk Menginaktifkan Viral Nervous Necrosis (VNN) Pada Ikan Kerapu Bebek (Epinephelus fuscoguttatus)*. Journal Of Aquaculture Management and Technology **1**(1): 264-278.
- Amini, S. dan Syamdini. 2006. *Konsentrasi Unsur hara Pada Media dan Pertumbuhan Chlorella vulgaris dengan Pupuk anorganik Teknik dan Analisis*. Jurnal Perikanan **VIII** (2): 201-206.
- Amiruddin H., K. Ridhlo.D. N. Robianta.2012. *Manajemen Induk Ikan Kerapu Tikus (Cromileptes altivelis) Sebagai Upaya Optimalisasi Produksi Telur Berkualitas*. Balai Budidaya Laut Ambon.
- Antoro, S., E. Widiastuti dan P. Hartono. 1998. *Biologi Kerapu Macan. Dalam: Balai Budidaya Laut Kampung (Eds). Pembenihan Kerapu Macan ( Epinephelus fuscoguttatus)*. Departemen Pertanian. Direktorat Jendral Perikanan. Balai Budidaya Laut Lampung. Lamoung. Hal 4-18.
- Apridayanti, E. 2005. *Evaluasi Pengelolaan Lingkungan Perairan Waduk Lahor Kabupaten Malang, Jawa Timur*. Tesis. Universitas Diponegoro. Semarang
- Ariana, Y. 2003. *Pengaruh Aging Terhadap Sistem imun*. Fakultas Kedokteran gigi, Universitas Jember
- Aslianti, T., Bedjo. S. Gagar. 2012. *Aplikasi Budidaya Kerapu Bebek, Cromileptes altivelis di Teluk ekas Kabupaten Lombok Timur. Bali*.
- Baratawidjaja, K. Garna dan I. Rengganis. 2010. *Imunologi Dasar*. Edisi ke-10. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Budiman (2011). *Penentuan Intensitas Cahaya Optimum Pada Pertumbuhan Dan Kadar Lipid Mikroalga Nannochloropsis oculata*. Departemen Kimia.Surabaya, Institut Teknologi Surabaya.
- Bulanin, U. 2003. *Perkembangan Larva Ikan Kerapu Bebek, Cromileptes altivelis, Sampai Umur 50 Hari*. Fakultas Perikanan Universitas Bung Hatta Padang.
- Chow, A., D. Toomre, W. Garrett, and I. Mellman. 2002. *Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane*. Nature 418: 988–994
- Claudia, I.E.I. 2012. *Efek Pencahayaan Terhadap Produksi Biomassa Nannochloropsis sp. Pada Reaktor Pelat Datar*. Fakultas Teknik Universitas Indonesia. Depok.

Coutteau, P. 1996. *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture*. FAO Fisheries Technical Paper. ISSN 0429-9345.

Dahoklory, N., U Yanuhar., S. Permana. 2014. *The Profil of Gill Protein Expression of Humpback Grouper (Cromileptes altivelis) Injected with Per-CP of Halimeda opuntia and Viral Nervous Necrosis*. Australian Journal of Applied Sciences Page: 145-150.

Darmono dan Hasan. 2002. *Menyelesaikan Skripsi dalam Satu Semester*. PT Grasindo. Jakarta.

De Fretes H., AB. Susanto, B. Prasetyo, L. Limantara. 2012. *Karotenoid dari Makroalgae dan Mikroalgae: Potensi Kesehatan Aplikasi dan Bioteknologi*. J.Teknol. dan Industri Pangan Vol XXIII No 2 Th 2012.

Dennis. K., Dong J.L., Gun W.B., Hee J.Y., Nam S.S, Hwa Y.Y, Cheol Y.H., Jun H.P., Se C.P. 206. *Detection of Betanodaviruses in Apparently Healthy Aquarium Fishes and Invertebrates*. Zoonotic Disease Priority Research Institute, and College of Veterinary Medicine. Seoul National University. Seoul 151-742. Korea.

Ehrentraut H, R . Meyer, M. Schwederski, S. Ehrentraut, M.Velten, C. Grohe. 2011. *Systemically administered ligands of Toll-like receptor 2, -4, and -9 induce distinct inflammatory responses in the Murine Lung*. Mediators of inflammation :1-11.

Evalawati., M. Meiyana dan Aditya. 2001. *Biologi Kerapu, Pembesaran Kerapu bebek dan Kerapu Macan di Keramba Jaring Apung*. Ditjenkan. Jakarta.

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

Fatchiyah. 2011. *Biologi Molekular*. Erlangga: Jakarta.

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

Harnadiemas R.F. 2012. *Evaluasi Pertumbuhan dan Kandungan Esensial Chlorella vulgaris pada Kultivasi Fotobioreaktor Outdoor Skala Pilot Dengan Pencahayaan Terang Gelap Alami*. Fakultas Teknik Universitas Indonesia. Dpok.

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

Hasdianah; P. Dewi; Y. Peristiwaati dan Sentot Iman. 2014. *Imunologi, Diagnosa dan Teknik Biologi Molekuler*. Muha Medika. Yogyakarta

Impra. 2009. *Protein*. Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya Malang.

Johny, F. K. Mahardika, I.N.A. Giri Dan D. Roza. 2007. *Penambahan Vitamin C Dalam Pakan Untuk Meningkatkan Imunitas Benih Ikan Kerapu Macan, Epinephelus fuscoguttatus Terhadap Infeksi Viral Nervous Necrosis*. Jurnal Akuakultur Indonesia, **6**(1): 43-53.

Jönsson, F., C. Gurniak B., B. Fleischer., G. Kirfel,, W. Witke. 2012. *Immunological Responses and Actin Dynamics in Macrophages Are Controlled by N-Cofilin but Are Independent from ADF*. PLoS ONE **7**(4): e36034. doi:10.1371/journal.pone.0036034

Joseph, R., srivastana, O.P., Pfisterl, R.R. 2012. *Downregulation of b-Actin Gene and Human Antigen R in Human Keratoconus*. IOVS vol. 53, No.7)

Kawaroe, M.T.P. 2008. *Mikroalga: Potensi dan Pemanfaatannya untuk Produksi Bio Bahan Bakar*. Bogor, IPB Press.

Koesharyani, I., D. Roza., K. Mahardika, F. Jhonny, Zafran, dan K. Yuasa. 2001. *Penuntun Diagnosa Penyakit Ikan II. Penyakit Ikan Laut dan Krustacea di Indonesia*. Balai Penelitian Perikanan Laut Gondol-Singaraja. 49 pp.

Kordi K., M.G.H. 2001. *Usaha Pembesaran Kerapu di Tambak*. Kanisius. Yogyakarta. 111 hal.

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

Kordi dan Andi. 2005. *Pengelolaan Kualitas Air dalam Budidaya Perairan*. Rineka Cipta. Jogjakarta.

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

Marzuki. 1983. *Metodologi Riset*. Fakultas Ekonomi. Ull Yogyakarta.

Meritasari, D., R. Jannah, D. Irsalina, Inayah, S. 2010. *Eksplorasi Bahan Aktif Mikroalga Laut Nannochloropsis oculata Sebagai Antibakteri (Penghambat) Vibrio alginolyticus*. Universitas Airlangga. Surabaya.

Munasir, Zakiudin. 2001. *Respon Imun Terhadap Infeksi Bakteri*. Sari Pediatri, Vol.2, No.4 193-197.

Najmuddin, F.Z. 2011. *Peningkatan Produksi Biomassa Chlorella vulgaris dengan perlakuan mikrofiltrasi pada Sirkulasi Aliran Medium Kultur Sebagai Bahan Baku Biodiesel*. Fakultas Teknik Kimia Universitas Indonesia. Depok.

Parna, A.Y. 2008. *Senyawa Antibakteri Dari Mikroalga Dunaliella sp pada Umur Panen Yang Berbeda*. Institut Pertanian Bogor : Bogor.

Poedjiadi, A. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. Ghalia Indonesia. Jakarta. 212 hal

Pollard, T. D., G. Borisy. 2003. *Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments*. Cell **112**:453-465.

- Puji N.U., Yuniarti, H. Kiki. 2012. *Pertumbuhan Chlorella sp. Yang Dikultur Pada Perioditas Cahaya yang Berbeda*. Jurnal Perikanan dan Kelautan Vol.3 No.3 237-24.
- Putra, S. E. 2008. Alga Laut sebagai Biotarget Industri. [www.chem-is-try.org](http://www.chem-is-try.org).
- Putu, N.M.N., Merry, D.C.R., Syafriadi, M. 2014. *Respon Limfosit T sitotoksik Pada Gingivitis setelah Pemberian Kurkumin*. Universitas Jember: Jember.
- Rahayu. 2009. Monitoring Air di Daerah Aliran Sungai. World Agroforestry Centre. Hlm 38.
- Rahmana, R.P. U. Yanuhar., A. Maizar.S.H. 2013. *Perubahan Struktur Jaringan Mata Dan Otak Pada Larva Ikan Kerapu Tikus (Cromileptes altivelis) Yang Terinfeksi Viral Nervous Necrosis (VNN) Dengan Pemeriksaan Scanning Electron Microscope (SEM)*. MSPi Student Journal 1(1): 1-10 Universitas Brawijaya.
- Radji, M. 2009. *Vaksin DNA: Vaksin Generasi Keempat*. Departemen Farmasi FMIPA-UI-Depok, 16424. Majalah ilmu kefarmasian Vol. VI No. 1- ISSN 1693-9883.
- Rao, S.P.N. 2011. *B cell activation and Humoral Immunity*. JJMMC, Davangere.
- Rezza, M.F. 2011. *Laju Pertumbuhan Mikroalga Penghasil Biofuel Jenis Chlorella sp. Dan Nannochloropsis sp. Yang Dikultivasi Menggunakan Air Limbah Hasil Penambangan Timah Di Pulau Bangka*. IPB : Bogor.
- Rombout JH, H. Huttenhuis BT, S. Picchiatti, S . Scapigliati. 2005. *Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes*. Fish and Shellfish Immunology 19, 441–455.
- Safi, C., B. Zeib, O Merah., P. Pontalier. 2014. *Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris : A review*. Journal Elsevier 265-278.
- Salmin. 2005. *Oksigen Terlarut (DO) dan Kebutuhan Oksigen Biologi (BOD) Sebagai Salah Satu Indikator untuk Menentukan Kualitas Perairan*. ISSN 30 (30).
- Sudarsono, A. 2013. *Studi In Vivo Treatment Crude Pyrenoid Mikroalga Laut Nannochloropsis oculata Terhadap Ekspresi Tnf-A pada Ikan Kerapu Tikus (Cromileptes altivelis)*. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.
- Sugama K. 2001. *Petunjuk Teknis Produksi Benih Ikan Kerapu Bebek, Cromileptes altivelis*. Balai Riset Budidaya Laut Gondol, Pusat Riset dan Pengembangan Laut dan Perikanan Departemen Perikanan dan Kelautan. Bali.
- Sukarni, Maftuch, dan H. Nursyam. 2012. *Kajian Penggunaan Ciprofloxacin terhadap Histologi Insang dan Hati Ikan Botia (Botia macracanthus, Bleeker) yang Diinfeksi Bakteri Aeromonas hydrophila*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya. Malang.

- Surakhmad, W. 1998. Pengantar Penelitian Ilmiah (Dasar, Metode dan Teknik). Tarsito. Bandung.
- Tampubolon, G.H. dan E. Mulyadi. 1989. Sinopsis Ikan Kerapu di Perairan Balit Bangka. Semarang. Hlmn 2.
- Tort, L., J.C. Balasch, S. Mackenzie. 2003. *Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses*. **22** :277-286. Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Aut3noma de Barcelona, Bellaterra, Spain.
- Tuominen, VJ., Ruotoistenmaki, S., Viitanen, A., Jumppanen, M., Isola, J. 2010. ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67. *Breast Cancer Res* 12: R56. doi: 10.1186/bcr2615
- Uribe, C., H. Folch, R. Enriquez, G. Moran. 2011. *Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review*. *Veterinari Medicina*, 56: 486–503. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile
- Varghese, F., Bukhari, A. B., Malhotra, R., De, A. 2014. IHC profiler: An open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PLoS ONE*, 9 (5) , art. no. e96801
- Vascotto, F., D. Lankar. 2007. *The actin-based motor protein myosin II regulates MHC class II trafficking and BCR-driven antigen presentation*. *J Cell Biol* **176**(7): 1007-1019.
- Visa N. dan P. Percipalle. 2015. *Nuclear Functions of Actin*. Department of Molecular Biology & Functional Genomics, Stockholm University, SE-106 91, Stockholm, Sweden
- Weis, V.M., Verde, E.A., & Reynold, W.S. 2002. *Characterization of a Short Form Peridinin-Chlorophyll-Protein (PCP) cDNA and Protein From the Symbiotic Dinoflagellate Symbiodinium muscatinei (Dinophyceae) From the Sea Anemone Anthopleura elegantissima (Cnidaria)*. *J. Phycol.* 38, 157 – 163
- Wickramarachchi, D., N. Argyrios T., H. Dwight K. 2010. Immune Pathology Associated with Altered Actin Cytoskeleton Regulation. Department of Immunology & Microbial Science, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA.
- Wijoseno, T. 2011. *Uji Pengaruh Variasi Media Kultur Terhadap Tingkat Pertumbuhan dan Kandungan Protein, Lipid, Klorofil, dan Karotenoid pada Mikroalga Chlorella vulgaris buitenzorg*. Fakultas Teknik Universita Indonesia. Depok.
- Wirosaputro, S. 2001. *Chlorella Untuk Kesehatan Global*. Gadjahmada University Press.

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

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

\_\_\_\_\_. 2013. 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.

\_\_\_\_\_. 2015. *Effects of Pigment-Protein Fraction from Nannochloropsis oculata on TNF $\alpha$  and IL-6 which Act as an Anti-Inflammatory Against Viral Nervous Necrosis (VNN) Infection.* Procedia Chemistry 14: 437-443.

Yuasa, K., D. Roza, I. Koesharyani, F. Johnny, and Mahardika K. 2000. *General Remarks on Fish Disease Diagnosis. Pp. 5-18. Textbook for the Training Course on Fish Disease Diagnosis.* Lolitkanta-JICA Booklet No.12.

Yukio, M., D. Leobert. De L. and R. Erlinda C. 2007. *Susceptibility of Fish Species Cultured in Mangrove.* Southeast Asian Fisheries Development Center (SEAFDEC).



## 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 $\mu$ 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
<i>Sentriuge</i> 4°C	Untuk memisahkan supernatan dan pelet dalam sampel mikroalga
<i>Refrigerator</i> 4°C	Untuk menyimpan bahan
<i>Sprit</i> 1 cc ½"X26G	Untuk mengambil bahan dalam skala kecil
Timbangan analitik	Untuk menimbang sampel dengan ketelitian 10 <sup>-2</sup>
Nanodrop spektrofometer	Untuk mengukur kadar protein
<i>Magnetik stirrer</i>	Untuk membantu menghomogenkan larutan
Sendok erlenmeyer	Untuk megambil bahan
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 <i>elektroforesis</i> (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>Chlorella vulgaris</i>	Sebagai sampel yan diambil FPP nya
<i>Buffer ekstrak</i>	sebagai penyeimbang pH

<i>Phospat Buffer Saline (PBS)</i>	Untuk menjaga integritas sel atau tidak merusak sel
Masker	Untuk melindungi bahan dari kontaminasi
Sarung tangan	Untuk melindungi bahan dari kontaminasi
<i>Alkaline Phospatase Subtrat (chromogen NBT)</i>	Untuk membentuk senyawa berwarna
Aquadest	Untuk mengkalibrasi alat dan bahan
<i>Stacking gel 5%</i> , terdiri dari : <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Akrilamid 30%,</li> <li>2. Tris HCL 1.5 M pH 6.8,</li> <li>3. dH<sub>2</sub>O,</li> <li>4. <i>Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)</i> 10%,</li> <li>5. <i>Ammonium Persulfat (APS)</i> 10%,</li> <li>6. <i>Tetra ethylene diamine (TEMED)</i></li> </ol>	Sebagai bahan membuat gel pada proses SDS-PAGE
<i>separating gel 12,5%</i> , terdiri dari : <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Acrilamid 30%,</li> <li>2. Tris HCL 1.5 M pH 8.8,</li> <li>3. dH<sub>2</sub>O,</li> <li>4. SDS 10%,</li> <li>5. 10%,</li> <li>6. TEMED</li> <li>7. <i>Reducing Sampel Buffer (RBS)</i> dengan perbandingan 1:1 (RSB : sampel)</li> </ol>	Sebagai bahan membuat gel pada proses SDS-PAGE
Marker PRO-STAIN™	Sebagai acuan untuk mengetahui ukuran BM hasil ampifikasi
<i>Staining solution (commasie blue)</i>	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 IHK
<i>Xylol</i>	Sebagai pelarut dalam proses IHK
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>
Aluminium foil	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
Antibody monoclonal $\beta$ - aktin	Sebagai antibodi primer pada saat melakukan IHK
anti mouse conjugate pajotin	Sebagai antibodi sekunder pada saat melakukan IHK
Plastik klip	Untuk menyimpan organ setelah dihaluskan
Isolasi kertas	Untuk memberi label pada alat dan bahan

## Lampiran 2. Data Berat Badan Ikan Uji

Perlakuan	Hari Ke- (gr)						
	0	4	8	12	16	20	24
Ikan Kontrol	46,0	48,6	50,2	52	56,7	66,8	69,2
Ikan + FPP	46,0	48,9	50	51,8	52,5	54,6	58
Ikan + VNN	46,0	48,2	49	49,7	-	-	-
Ikan + FPP + VNN	46,0	47,3	48,4	49	51,8	52,7	54,8

## Lampiran 3. Penentuan dosis FPP untuk perlakuan pada ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*)

- Konsentrasi FPP hasil isolasi dari mikroalga *C. vulgaris* adalah 0,067 mg/ml (67µg/ml)
- Dosis pemberian pada perlakuan 33,3 µg/ml per 150 g ikan
- Pengenceran FPP untuk mendapatkan konsentrasi 33,3 µg/ml dalam 1 ml, dilakukan pengenceran dengan Tris HCL 0,5 N dengan pH 8,6

$$\begin{aligned}
 V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\
 10 \text{ ml} \times 67 \text{ µg/ml} &= V_2 \times 33,3 \text{ µg/ml} \\
 670 &= V_2 \times 33,3 \text{ µg/ml} \\
 670 / 33,3 &= V_2 \\
 20,12 &= V_2
 \end{aligned}$$

Untuk mendapatkan konsentrasi 33,3 µg/ml, dilakukan dengan penambahan Tris HCL 0,5 N dengan pH 8,6 sebanyak 20,12 ml.

- Dosis yang diberikan pada setiap penyondean :

<b>Penyondean ke-1</b>	1000 µl / 150 gr	= V2 / 46
(hari ke-0)	6,66666667	= V2 / 46
	6,66 X 46	= V2
	306	= V2

<b>Penyondean ke-2</b>	1000 µl / 150 gr	= V2 / 47,3
(Hari ke-6)	6,66666667	= V2 / 47,3
	6,66 X 47,3	= V2
	315	= V2

**Penyondean ke-3** 1000  $\mu$ l / 150 gr = V2 / 48,4  
 (Hari ke-9) 6,666666667 = V2 / 48,4  
 6,66 X 48,4 = V2  
 322 = V2

**Penyondean ke-4** 1000  $\mu$ l / 150 gr = V2 / 49  
 (Hari ke-14) 6,666666667 = V2 / 49  
 6,66 X 49 = V2  
 326 = V2

**Penyondean ke-5** 1000  $\mu$ l / 150 gr = V2 / 51,8  
 (Hari ke-19) 6,666666667 = V2 / 51,8  
 6,66 X 51,8 = V2  
 345 = V2

**Penyondean ke-6** 1000  $\mu$ l / 150 gr = V2 / 52,7  
 (Hari ke-24) 6,666666667 = V2 / 52,7  
 6,66 X 52,7 = V2  
 351 = V2



**Lampiran 4.** Penentuan Dosis pakan dengan daging positif *Viral Nervous Necrosis* (VNN) untuk uji klinis pada ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*)

- Konsentrasi protein VNN adalah  $0,320 \text{ mg/ml} = 320 \text{ } \mu\text{g/ml}$
- Tiap 1 gram daging ikan mengandung protein VNN =  $320 / 2 (1 \text{ ml}/500 \text{ } \mu\text{l}) = 160 \text{ } \mu\text{g/ml}$
- Dosis uji klinis pada ikan adalah  $0,51 \text{ mg/ml}$  ( $510 \text{ } \mu\text{g/ml}$  tiap 150 g ikan) (Yanuhar, 2012)
- Dosis pemberian pakan uji dengan VNN adalah sebagai berikut:

**Hari ke-14** Berat badan ikan 49 g.

$$= 510 / (150 / 49)$$
$$= 166,6$$
$$= 166,6 / \text{konsentrasi protein dalam 1 g (160 } \mu\text{g/ml)}$$
$$= 1,04 \text{ g.}$$

Jadi, pada hari ke-14 pemberian pakannya sebanyak **1,04 g.**

**Hari ke-19** Berat badan ikan 51,8 g.

$$= 510 / (150 / 51,8)$$
$$= 176,12$$
$$= 176 / 160 \text{ } \mu\text{g/ml}$$
$$= 1,1 \text{ g.}$$

Pada hari ke-19 pemberian pakannya sebanyak **1,10**

**Hari ke-24** Berat badan ikan 51,8 g.

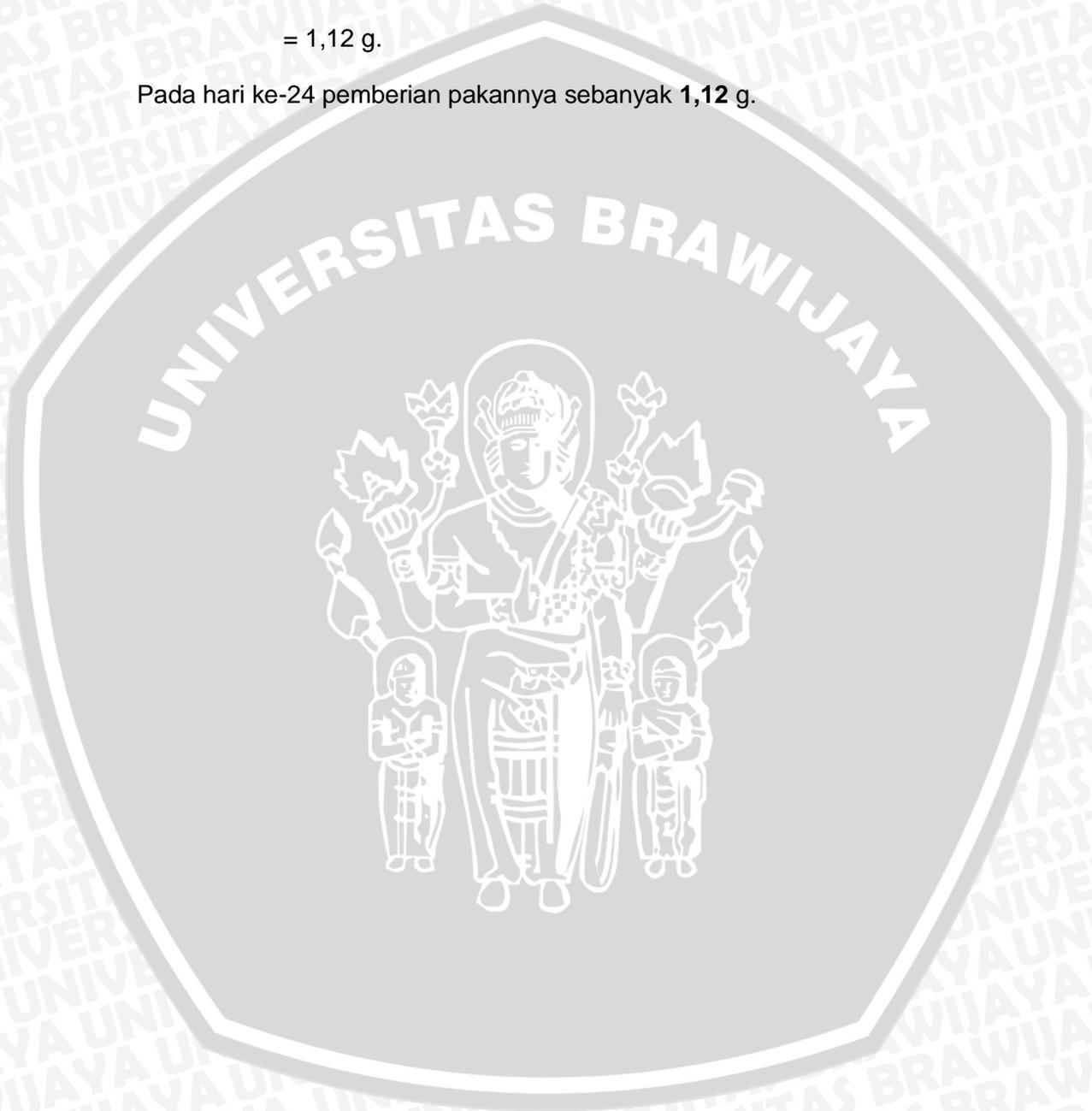
$$= 510 / (150 / 52,7)$$

$$= 179,18$$

$$= 179,18 / 160 \mu\text{g/ml}$$

$$= 1,12 \text{ g.}$$

Pada hari ke-24 pemberian pakannya sebanyak **1,12 g**.



Lampiran 5. Dokumentasi selama proses penelitian

GAMBAR

KETERANGAN



Proses Pemanenan *C. vulgaris*



Proses Penyaringan *C. vulgaris*



Proses sentrifuge untuk menghilangkan kadar air *C. vulgaris*



Proses Penimbangan bubuk *C. vulgaris*



Proses penggerusan *C. vulgaris* dan pemberian nitrogen cair



Proses sentrifuge untuk memisahkan pellet dan supernatan



Proses spektrofotometri



Penginduksia FPP dengan metode sonde

## Lampiran 6. Analisa Data

Tabel analisa sidik ragam

Ulangan	Perlakuan				TOTAL
	Kontrol	FPP	VNN	FPP+VNN	
1	25,7	60,3	61,2	71,5	218,7
2	29,8	63,6	65,9	72,8	232,1
3	25,6	59,1	63,6	79,6	227,9
Total	81,1	183	190,7	223,9	678,7
Rata-rata	27,03	61	63,57	74,63	

$$a = 4$$

$$n = 3$$

$$an = 12$$

$$\text{kuadrat} = 2$$

$$*db$$

$$dbt = \Sigma n - 1$$

$$= 12 - 1$$

$$= 11$$

$$dbp = t - 1$$

$$= 4 - 1$$

$$= 3$$

$$dbg = t (r - 1)$$

$$= 4(3 - 1)$$

$$= 8$$

a)  $FK = \frac{Y_{ij}^2}{r \cdot t}$

$$= (678,7)^2 / 3 \cdot 4$$

$$= 460633,69 / 12$$

$$= 38386,14$$

d)  $JKG = JKT - JKP$

$$= 3873,07 - 3801,83$$

$$= 71,24$$

b)  $JKT = \Sigma (y_{ij})^2 - FK$

$$= 42259,21 - 38386,14$$

$$= 3873,07$$

e)  $KT$  (Kuadrat Tengah)

$$KTP = JKP / dbp = 3801,83 / 3$$

$$= 1267,27$$

$$KTG = JKG / dbg = 71,24 / 8$$

$$= 8,905$$

c)  $JKP = \left( \frac{\Sigma (\Sigma y_{ij})^2}{r} \right) - FK$

$$= (126563,91 / 3) - 38386,14$$

$$= 42187,97 - 38386,14$$

$$= 3801,83$$

f)  $F \text{ hit} = KTP / KTG$

$$= 1267,27 / 8,905$$

$$= 142,31$$

Tabel anova

SK	DB	JK	KT	FHIT	F tabel 5%
A	3	3801.83	1267.27	142.31*	4.07
Galat	8	71.24	8.905		
Total	11	3873.07			

Perhitungan Nilai BNT Perlakuan :

$$\begin{aligned} \text{SED} &= \frac{\sqrt{2 \text{ KTG}}}{n \text{ (perlakuan)}} \\ &= \frac{\sqrt{2 \times 8,905}}{4} \\ &= 1,055 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{BNT 5\%} &= T \text{ Tabel 5\%} \cdot \text{SED} \\ &= 2,31 \cdot 1,055 \\ &= 2,43 \end{aligned}$$

Tabel BNT

Rata-rata $\beta$ -aktin	27.03	61.00	63.57	74.63	notasi	BNT 5%
27.03					a	2.43
61.00	33.97*				b	
63.57	36.53*	2.57*			c	
74.63	47.60*	13.63*	11.07*		d	