PEMANFAATAN KLOROFIL MIKROALGA LAUT Nannochloropsis occulata SECARA INVIVO PADA IKAN KERAPU TIKUS (Cromileptes altivelis)

SKRIPSI PROGRAM STUDI MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN

Oleh : DIAN NOVALISA NIM. 115080107111008



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG 2015

PEMANFAATAN KLOROFIL MIKROALGA LAUT Nannochloropsis occulata SECARA INVIVO PADA IKAN KERAPU TIKUS (Cromileptes 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:

DIAN NOVALISA NIM. 115080107111008



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG 2015

LEMBAR PENGESAHAN

SKRIPSI

PEMANFAATAN KLOROFIL MIKROALGA LAUT Nannochloropsis oculata SECARA IN VIVO PADA IKAN KERAPU TIKUS ((Cromileptes altivelis))

Oleh:

DIAN NOVALISA

NIM. 115080107111008

telah dipertahankan didepan penguji pada tanggal 12 Agustus 2015 dan dinyatakan telah memenuhi syarat SK Dekan No. : Tanggal :

Penguji I

Menyetujui, Dosen Pembimbing I

Andi Kurniawan, S.Pi M.Eng D.Sc NIP. 197903312005011003

Tanggal:

Penguji II

<u>Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, MSi</u> NIP. 19730404 200212 2 001 Tanggal :

Dosen Pembimbing II

<u>Ir. Kusriani, MP</u> NIP. 19560417 198403 2 001 Tanggal : <u>Dr.Asus Maizar SH, S.Pi. MP</u> NIP. 19720529 20003121001 Tanggal :

Mengetahui, Ketua Jurusan MSP

Dr. Ir. Arning Wilujeng Ekawati, MS NIP. 19620805 198603 2 001 Tanggal : Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benarbenar 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,

<u>DIAN NOVALISA</u> NIM. 115080107111008

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis menyadari banyaknya kekurangan dari penulisan laporan Skripsi ini melalui lembar ini penulis juga ingin menyampaikan rasa syukur dan berterima kasih yang tiada terhingga kepada semua pihak yang telah membantu tersusunnya laporan ini yaitu kepada:

- Allah SWT yang telah memeberikan segala kemudahan dan kelancaran pada pengerjaaan Skripsi hingga saat penyusunan Laporan ini.
- 2. Kedua orang tua yang tersayang ibu Ita Dwitanti dan bapak Heksa Widagdo beliau selalu memberikan dukungan moril dan materi serta semangat dan doa kepada saya, Karena rasa terimakasih saja tidaklah cukup untuk membalas segala pengorbanan dan perjuangan beliau. Hanya doa yang mampu saya sampaikan semoga Allah selalu mencurahkan nikmat dan kesehatan kepada kedua orang tua saya yang paling saya cintai karena tanpa beliau saya bukan siapa-siapa, .
- My twin sister Dian Novalita yang selalu setia memberikan bantuan pemikiran, tindakan serta semua waktu untuk menyelesaikan skripsi ini, tidak lupa kepada my little sister Frizy Novalia yang memberikan dukungan dan semngat walaupun dari jauh.
- 4. Ibu Dr.Uun Yanuhar, S.Pi, MSi selaku pembimbing dan layaknya ibu kedua saya selama saya kuliah yang sangat membantu dengan masukan serta nasehat pada saat pengerjaan Skripsi dan pembuatan laporan ini untuk beliau rasa terimakasi yang tek terhingga.
- 5. Bapak Dr. Asus Maizar SH, S.Pi. MP selaku pembimbing kedua yang mensupport saya dan rela untuk memahami banyaknya kekurangan saya.
- 6. Bapak Andi Kurniawan S.Pi. M.Eng dan ibu Ir. Kusriani, MP selaku penguji laporan Skripsi yang membantu dalam memberikan kritik dan saran serta masukan untuk memperbaiki laporan ini.
- 7. Tim Alga yaitu Yovan Endik I, Fariq Maghfiroh W.H., Nur Rohimah F., Ainul Yaqin, Ocha Waromi yang selalu membantu dan menolong saya dalam suka dan duka. Serta kawan

- alga lainnya Nanuk, Novia, Arif, luffi, Azzimar, Fahmi, mbak Gita, mas Catur, Mbak Lenni, mas Lukman dan the last is Mas kumaidi the best mentor ever yang selalu sabar mengajari saya dan Amira teman senasib seperjuangan.
- 8. Sahabat Ciliped Amira, Erlita, Fitri, Vina, Novia Adi, Elsa, Bunga, Shinta, Ima yang sudah selalu memberikan semangat dan dukungan disaat saya membutuhkan kekuatan dan dorongan semangat.
- 9. Hendra Saputra thank's for being the part of me.
- 10. Semua kawan-kawan jurusan MSP 2011 yang tak henti memberikan saran atas penyusunan Laporan ini.



RINGKASAN

DIAN NOVALISA. Skripsi mengenai PEMANFAATAN KLOROFIL MIKROALGA LAUT Nannochloropsis oculata SECARA IN VIVO PADA IKAN KERAPU TIKUS ((Cromileptes altivelis)) (dibawah bimbingan Dr. UUN YANUHAR, S.Pi, M.Si dan Dr. AZUS MAIZAR S.H., S.Pi. MP.

N. oculata merupakan mikroalga dari salah satu jenis genus gangga hijau bersel tunggal yang hidup di laut. Banyak nutrisi yang terkandung didalam N. oculata, seperti klorofil dan Fragmen Pigmen Protein (FPP). Cara untuk memperoleh klorofil itu sendiri dengan mengekstrak mikroalga N. oculata yang dilarutkan kedalam aseton 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 memiliki respon imun yang baik saat adanya pathogen yang masuk..

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui manfaat klorofil mikroalga laut *N. oculata* dalam meningkatkan sistem imun terhadap ekspresi β aktin pada ikan Kerapu Tikus. Metode yang digunakan dalam penelitian adalah deskriptif dengan teknik pengambilan data meliputi data primer dan data sekunder. Pengumpulan data dilakukan dengan cara observasi lapangan dan studi pustaka. Teknik pengambilan sampel dilakukan melalui beberapa tahapan, yaitu dimulai dengan melakukan kultur *N. oculata* yang dilanjutkan pada tahapan ekstraksi klorofil pada mikroalga, isolasi FPP *N. oculata*, uji klorofil pada *N. oculata*, uji profil FPP *N. oculata*, uji in vivo FPP pada ikan Kerapu Tikus, pengamatan ekspresi β-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 salinitas dan parameter kimia yang terdiri dari pH dan oksigen terlarut.

Hasil yang didapatkan dari uji kandungan essential pada mikroalga ini didapatkan kandungan β -karoten 0,7102 mg/L, klorofil a 2,230 mg/L, klorofil b 1,7749 mg/L, dan klorofil a + b 4,0720 mg/L. Hasil SDS-PAGE FPP *N. oculata* terdapat 3 band protein yaitu dengan berat molekul 14 kDa, 22 kDa, dan 33 kDa. Berdasarkan hasil berat molekul yang tampak, dapat diindikasikan bahwa FPP dari mikroalga *N. oculata* merupakan *Piridinin Chlorophyl Protein* (PCP) dan *Violaxanthin Chlorophyl protein* (VCP). 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 μl), hari ke-6 (315 μl),hari ke-9 (322 μl), hari ke-14 (326 μl), hari ke-19 (345 μl) dan hari ke-24 (351 μl).

Pengamatan ekspresi β -aktin pada organ hati ikan Kerapu Tikus dilakukan dengnan menggunakan *immunoratio*. Pada organ hati ikan kontrol tempak warna kecoklatan yang menandakan adanya ekspresi β -aktin . Nilai DAB yang muncul pada organ hati ikan kontrol sebesar 27,8%. Pada organ hati ikan perlakuan pemberian FPP didapatkan nilai DAB sebesar 31,1%, ini menunjukkan adanya peningkatan ekspresi β -aktin setelah dilakukan penginduksian FPP kedalam ikan. Pada organ hati ikan perlakuan pemberian VNN terdapat peningkatan ekspresi β -aktin yang ditunjukkan oleh prosentase DAB sebesar 41,1% dan 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 β -aktin yang cukup tinggi yaitu sebesar 46,4 %.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 5,3 mg/l - 6,2 mg/l .

Kesimpulan dari penelitian ini adalah Kandungan essential yang didapat pada mikroalga ini adalah klorofil a sebesar 2,230 mg/L, klorofil b sebesar 1,7749 mg/L dan klorofil total sebesar 4,0720 mg/L. sedangkan pada pengukuran kualitatif FPP yang ditemukan dalam N. oculata berupa PCP pada berat molekul 14 kDa dan VCP pada berat molekul 14 kDa. Pemberian Fragmen pigmen protein (FPP) mikroalga N. oculata mampu meningkatkan ekpresi β -aktin. Pada ikan kontrol ekpresi β -aktin 27,8%, ikan dengan pemberian FPP 31,1%, ikan dengan penginfeksian VNN 41,0%, dan ikan dengan penginduksian FPP dan penginfeksian VNN sebesar 46,4%. Peridinin chlorophyll protein (PCP) yang terkandung dalam N. oculata mampu menjadi biokatalisator terekpresinya β -aktin. Peningkatan ekpresi β -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 semberdaya 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.

BRAWIJAYA

KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan syukur kehadirat Allah SWT karena atas berkat limpahan rahmat, taufik dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan laporan skripsi yang berjudul PEMANFAATAN KLOROFIL MIKROALGA LAUT *Nannochloropsis oculata* 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

LEMBAR PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN ORISINALITAS	
UCAPAN TERIMAKASIH	
RINGKASAN	
KATA PENGANTAR	ix
DAFTAR TABEL	×
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	
DAFTAR LAMPIRAN	xi\
DAFTAR ISTILAH	xvi
1. PENDAHULUAN 1.1 Latar Belakang 1.2 Rumusan Masalah 1.3 Tujuan 1.4 Manfaat	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan	6
1.4 Manfaat	6
1.4.1 Manfaat Teoritis	6
1.4.2 Manfaat Praktis	6
1.4.2 Manfaat Praktis1.5 Tempat Dan Waktu	7
2. TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Mikroalga Nannochloropsis Oculata	8
2.1.1 Klasifikasi	8
2.1.2 Morfologi	<u>C</u>
2.1.3 Habitat Dan Biologi	10
2.1 Mikroalga Nannochloropsis Oculata 2.1.1 Klasifikasi 2.1.2 Morfologi 2.1.3 Habitat Dan Biologi 2.1.4 Fase Pertumbuhan 2.2 Fragmen Pigmen Protein	11
2.2 Fragmen Pigmen Protein	15
2.2.1 Pendiriir Chlorophyli Protein (PCP)	17
2.2.2 Karetenoid	18
2.3 Klorofil	
2.3.1 Manfaat Klorofil	
2.3.2 Analisis FPP Mikroalga <i>N. oculata</i>	23
2.4 Ikan Kerapu Tikus	
2.4.1 Klasifikasi	
2.4.2 Morfologi	
2.4.3 Habitat	
2.4.4 Kebiasaan Pakan	
2.5 Sistem Pertahanan Tubuh Ikan	
2.5.1 Sistem Pertahanan alamiah (innate immunity) / Non- Spesifik	
2.5.2 Sistem Pertahanan Adaptif (Spesifik)	
2.5.3 Sel B (BCR/ B-Cell Receptor)	33

2.5.4	Sel I (TCR. 1-cell Receptor)	3 4
2.5.5	β-Aktin	34
3. METODI	E PENELITIAN	36
3.1 Mater	i Penelitian	37
3.2 Alat d	an Bahan	37
3.3 Metod	de Penelitian	38
	k Pengambilan Sampel	
	Data Primer	
3.4.2	Data Sekunder	
	dur Penelitian	
3.5.1	Kultur Mikroalga	
3.5.2	Proses Ekstraksi Klorofil Mikroalga	
3.5.3	Pengukuran Klorofil	44
3.5.4	Elektroforesis Protein SDS-PAGE (Sodium deodecyl poliakrila	
	horesis)	45
3.5.5	Pengukuran Berat Molekul Protein Sampel	
3.5.6	Uji Invivo Pada Ikan	
357	Isolasi Protein Organ Ikan	51
3.5.8	Imunohistokimia (IHC)	52
4. HASIL D	Imunohistokimia (IHC)	54
	Mikroalga <i>N. occulata</i>	
	ii Crude Protein	
4.2.1		
4.2.2	Klorofil dan KarotenoidFragmen Pigment Protein (FPP)	61
	sis Mikroalga <i>N. oculata</i> FPP	63
4.3.1	Analisis Kuantitatif	63
4.3.2	Analisis Kuantitatif	65
4.4 Uii In	vivo pada Ikan Kerapu Tikus	67
4.5 Hasil	Uji Imunohistokimia (IHC) PCP N. oculata Terhadap Or	gan Ikan
	us ((Cromileptes altivelis))	
4.6 Analis	sis Data	82
	as Air Pemeliharan Ikan Kerapu Tikus	
4.7.1	Suhu	84
4.7.2	SuhuSalinitas	85
4.7.3	Derajat Keasaman (pH)	86
4.7.4	Oksigen Terlarut	87
	JP	
	pulan	
)	
SIZ Garair		
DAFTAR PU	STAKA	90
V. Oil		
DAFTARIA	MPIRAN	96

DAFTAR TABEL

Tabel	1. Klasifikasi Nannochloropsis oculata	9	
Tabel	2. Panjang Gelombang Warna-Warna	26	
Tabel	el 3. Kandungan Essential Mikroalga <i>N. oculata</i>		
Tabel	4. Data Hasil Penelitian	82	
Tabel	5. Analisa Keragaman (ANOVA) DAB β-aktin setiap perlakuan	82	
Tabel	6.Hasil Uji BNT pengaruh pemberian perlakuan yang berbeda te	rhadap	
	ekspresi β-aktin	83	
Tabel	7. Hasil pengukuran suhu (°C) pada kolam ikan Kerapu Tikus	84	
Tabel	8. Hasil pengukuran salinitas (‰) pada kolam ikan Kerapu Tikus	86	
Tabel	9. Hasil pengukuran pH pada kolam ikan Kerapu Tikus	86	
Tabel	10. Hasil pengukuran oksigen terlarut pada kolam ikan Kerapu Tikus	88	



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Morfologi N. oculata
Gambar 2. Morfologi Sel N. oculata
Gambar 3. Grafik pertumbuhan mikroalga
Gambar 4. Letak pigmen di sel mikroalga N. oculta
Gambar 5.(A) Struktur Klorofil (B) Struktur Klorofil a dan klorofil b
Gambar 6. Morfologi Ikan Kerapu Tikus (C. altivelis)
Gambar 7. Gambaran umum sistem imun vertebrata
Gambar 8. Pembuatan media agar pada kultur awal 55
Gambar 9. Pengkulturan pada toples 1-2 liter
Gambar 10. Pemberian pupuk dan vitamin mikroalga 56
Gambar 11. N. oculata pada saat media kultur intermediet
Gambar 12. (a) Penyaringan mikroalga (b) sentrifuse 4000 rpm 58
Gambar 13. Padatan mikroalga disimpan pada falcon 50 ml
Gambar 14. (a) Penggerusan mikroalga N. oculata (b) Pemberian nitrogen cair 60
Gambar 15. (a) pendiaman dengan alumunium foil (b) Filtrat mikroalga N. oculata 61
Gambar 16. Penggerusan dan pemberian Glysin + KCL ke mortar mikroalga 62
Gambar 17. (a) Proses sentrifuse dingin (b) Hasil supernatan sentrifuse dingin 62
Gambar 18. (A) Marker (PRO-STAIN™), (B) Hasil Elektroforesis Pita <i>Crude</i> Protein
N. oculata dengan SDS-PAGE66

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	1. Data Pertumbuhan Berat Badan Ikan Uji	. 96
Lampiran	2. Perhitungan analisa kandungan klorofil dan β -karoten mikroalga	. 98
Lampiran	3. Cara Perhitungan Berat Molekul	. 99
Lampiran	4. Tahapan menggunakan aplikasi IR pada software	101
Lampiran	5. Tahapan menggunakan software "imageJ"	107
Lampiran	6. Perhitungan Analisa Sidik Ragam dan Uji BNT	111



DAFTAR ISTILAH

β- aktin	Gen Houskeeping dan merupakan bagian penting dari
p- aktin	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.
Adhesin	Satu dari kelompok protein seperti <i>fibronectin, kollagen</i> ,
HERSLY	dan fibrinogen yang berada di extraselluler matrik
Aktin	Protein globular dengan masssa sekitar 42-kDa yang
	memiliki berbagai fungsi dasar mikgrasi sel hingga
	transpor membran.
Antibodi	Molekul yang terbentuk dalam tubuh hewan dan manusia sebagai tanggapan terhadap adanya antigen.
Antigen	Substansi yang biasanya berupa protein yang mampu
	menstimulasi organisme untuk memproduksi antibodi
	dan mampu berkombinasi sehingga diproduksinya
	antibodi.
Antiviral	Suatu agen yang secara eksperimental menghambat
	proliferasi dan kelangsungan hidup virus menular
Histopatologi	Gambaran keadaan jaringan organisme yang terpapar
	patogen
Infeksi	Pengenalan agen infeksi seperti virus atau bakteri ke
	dalam host sel atau organisme.
Isolasi	Memisahkan dan memurnikan suatu substansi
Jaringan	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
MULHI	seluler dan sebagai regulator yang akan mengatur kedua
	respons imun
Necrosis	Sekelompok sel yang mengalami perubahan atau
	kematian tanpa terprogram
Vacuolis	Adanya ruang kosong pada jaringan
Organ	Sekumpulan sel atau sekumpulan jaringan dapat
Organ	Sekumpulan sel alau sekumpulan jaringan dapat

YAUAUNIY	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 <u>protein</u> yang menyusun <u>sitoplasma</u> dalam <u>sel</u> 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 <u>tulang</u> <u>belakang</u> yang tersusun dari <u>vertebra</u> , vertebrata memiliki <u>sistem otot</u> yang banyak terdiri dari pasangan massa, dan juga <u>sistem saraf pusat</u> 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

DAFTAR SINGKATAN

μl	mikro liter
μm	Mikro meter
APC	Antigen Presenting Cell
BM	Berat Molekul
BBAP	Balai Budidaya Air Laut
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Etilen Diamin Tetra Acetat
lg	Imunoglobulin
IHK	Immunohisto Kimia
kDa	kilo Dalton
MHC	Major Histocompatibility
	Complex
TLR	Toll Like Receptor
ml	mili liter
Mm	Mili meter
NK	Natural Killer
nm	Nano meter
PBS	Phospat Buffer Saline
PCP ()	Peridinin Cell Pigment
FPP	Fragmen Pigmen Protein
RNA	Ribonucleic acid
RSB	Reducing Sampel Buffer
SDS-	Sodium Dodecyl Sulfate
PAGE	Polyacrylamid Gel
لي ال	Elektrophoresis
Tc	Sel T cytotoxic
APC	Antigen Presenting Cell

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) merupakan salah satu ikan yang memiliki nilai ekonomi tinggi. Namun, dalam proses budidaya ikan tersebut terdapat kendala, yaitu adanya serangan penyakit. *viral nervous necrosis* (VNN) merupakan salah satu agen penyakit berbahaya bagi keberhasilan buidaya Kerapu Tikus. VNN dapat menyebabkan kematian massal pada ikan kerapu, terutama pada stadia larva dan juvenile (Amelia & Prayitno, 2012).

Di Indonesia kejadian penyakit yang disebabkan VNN ditemukan pertama kali di daerah Banyuwangi pada budidaya kakap putih dan ikan kakap tersebut tampak lesu, berenang berputar dengan perut di permukaan dan sering muncul ke permukaan dengan berenang secara vertikal (Sudaryatma, 2012). Berbagai penelitian seperti dengan memicu respon imun ikan kerapu terhadap infeksi VNN antara lain vaksin protein yang mirip VNN (*VNN-like protein*) (Thiery *et al.*, 2006) dan induksi peptida reseptor imunogenik terhadap VNN (Setyawan *et al.*, 2010) sebagai upaya pananggulangan serangan VNN telah banyak dilakukan guna meminimalisir tingkat kerugian para pembudidaya Kerapu Tikus.

Saat ini penanggulangan penyakit atau virus yang menyerang budidaya ikan kerapu tikus masih terbatas pada penggunaan bahan-bahan kimia seperti berbagai vaksin dan antibiotik. Pada umunya bahan-bahan kimia tersebut tidak selektif sehingga dikawatirkan akan berdampak pada menurunnya mutu lingkungan dan bersifat resisten pada patogen (Yanuhar, 2009). Oleh karena itu perlu penanganan yang lebih ramah lingkungan dengan menggunakan sumberdaya hayati terhadap

VNN ini, salah satunya pemanfaatan mikroalga laut sebagai imunnostimulan bagi Ikan Kerapu Tikus. Karena menurut (Tarsim *et al.,* 2013), *imunostimulan* bersifat universal, mampu mencegah infeksi tidak hanya satu jenis virus tapi oleh agen infeksi lainnya seperti bakteri, parasit, dan jamur.

Mikroalga mempunyai tingkat pertumbuhan lebih cepat dibandingkan dengan tanaman terestrial (Sari *et al.*, 2012). Menurut Norbawa, (2013) menyebutkan bahwa mikroalga mengandung bahan-bahan organik seperti polisakarida, hormon, vitamin, mineral dan juga senyawa metabolit sekunder (Richmond, 2003). Mikroalga sudah lama dikenal sebagai sumber protein dalam budidaya larva udang ataupun ikan (Ikhsan *et al.*, 2006) dan sebagai suplemen makanan bagi manusia (Andersen, 1995). Sedangkan, Pemanfaatan mikroalga dalam bidang farmakologi meliputi antibakteri, antioksidan, antijamur, dan antivirus (Chang *et al.*, 1993).

Menurut Yanuhar (2009), *N. oculata* memiliki senyawa bahan aktif yang dapat digunakan sebagai antioksidan. Salah satu senyawa aktif yang terdapat dalam *N. oculata* adalah karatenoid, senyawa aktif tersebut menunjukkan aktivitas biologis sebagai antioksidan, mempengaruhi regulasi pertumbuhan sel, dan memodulasi ekspresi gen serta respon kekebalan tubuh. *N. oculata*. memiliki sejumlah kandungan pigmen dan nutrisi seperti protein (52,11%), karbohidrat (16%), lemak (27,64%), vitamin C (0,85%), dan klorofil A (0,89%). Selain kandungan tersebut mikroalga ini juga memiliki kandungan yang cukup penting yaitu Fragmen pigmen Protein (FPP). Menurut Yanuhar (2015), FPP pada *N. oculata* memiliki fungsi sebagai inducer dari antivirus yang akan dibuktikan dengan munculnya ekspresi TNF dan IL-6. Tanggapan ini terjadi pada tubuh ikan yang diberi hasil isolasi FPP mikroalga *N. oculata* karena ada reaksi dari sel imun yang akan mengaktifkan molekul adaptor di sitokin.

Mikroalga laut tropis ini merupakan subjek menarik untuk diteliti karena memiliki potensi sebagai penghasil berbagai jenis lipid alami (seperti trigliserida, asam lemak bebas baik yang jenuh, tak jenuh, maupun tak jenuh banyak) untuk biodiesel. Selain itu, *N. oculata* merupakan sumber penghasil senyawa karoten dan klorofil yang dapat dikembangkan untuk pewarna makanan alami, provitamin A, bahan campuran kosmetik dan bahan pengobatan kanker. Klorofil sendiri merupakan senyawa bercincin pirol dengan ion Mg²+ di dalamnya dan berperan penting dalam proses fotosintesis sebagai pigmen penangkap cahaya pada tanaman. Sedangkan, senyawa karoten merupakan pigmen alami dari senyawa turunan terpenoid yang berfungsi sebagai antene klorofil (Nurbaiti, 2012)

Karotenoid dan terpenoid yang ada didalam alga merupakan bagian dari Fragmen Pigment Protein (FPP). Pada mikroalga N. oculata dapat berfotosintesis karena memiliki klorofil. N. oculata memerlukan cahaya untuk proses fotosintesis sehingga distribusinya tergantung pada tersedianya cahaya. Pada suatu perairan, dengan bertambahnya kedalaman cahaya berkurang secara kuantitatif dan kualitatif (Izzati dan Veronika, 2012). Ciri khas dari mikroalga ini adalah memiliki dinding sel yang terbuat dari komponen selulosa. Salah satu bagian dari FPP adalah Peridinin Chlorophyl Protein (PCP) yang merupakan salah satu komponen penyusun nutrisi pada N. oculata yang terkait dengan klorofil. PCP adalah protein yang larut dalam air, merupakan pigmen protein kompleks yang berperan sebagai pemanen cahaya dalam proses fotosintesis (Ogata et.al., 1994).

Klorofil sendiri merupakan pigmen utama dalam fotosintesis, lebih banyak menyerap cahaya biru dan merah, dimana pigmen seperti karotenoid dan fikobilin dapat meningkatkan penyerapan spektrum hijau-biru dan kuning (Kumara dan Gontjang, 2012). Klorofil merupakan senyawa ester dan larut di dalam solvent

organik. Semakin banyak klorofil dalam daun maka fotosintesis berlangsung cepat (Wasis dan Sugeng, 2008). Klorofil berperan menangkap energi cahaya dan mengubahnya menjadi energi kimia (Wahono *et al.*, 2010).

PCP merupakan komponen penyusun nutrisi pada *N. oculata* yang terkait dengan klorofil. PCP memiliki berat molekul 55 kDa, yang dapat digunakan sebagai anti bakteri dan virus (Impra, 2009). Selain itu, protein dalam bentuk enzim berperan sebagai katalis dalam bermacam-macam proses biokimia dan juga sebagai alat pelindung seperti antibodi yang terbentuk jika tubuh kemasukan zat asing melalui pertahanan sistem imun.

Sistem imunitas alami dapat mengenali pathogen melalui pathogen-associated molecular atterns (PAMPs). Molekul yang dikenali berupa molekul bakteri positif-Gram dan negatif-Gram, DNA dan RNA virus, jamur dan protozoa. Setiap molekul tersebut memiliki target yang spesifik. Salah satu reseptor pengenal utama pola molekul sistem imunitas alami adalah *Toll-like receptors* (TLRs). TLR termasuk kelompok glikoprotein yang berfungsi sebagai reseptor permukaan transmembran dan terlibat dalam respons imun alami terhadap mikroorganisme patogen. Selanjutnya TLR memulai jalur yang memberi sinyal untuk mengaktifkan sitokin, kemokin, dan peptida antimikroba. TLR dapat meningkatkan perlekatan dan pengaturan kostimulasi molekul yang terlibat dalam respons imun alami dan bawaan dari dalam tubuh makhluk hidup sendiri (Anum, 2012).

TLR terutama ditemukan pada sel yang memulai respons imun primer, yaitu di permukaan sel, membran plasma sel, serta kompartemen intrasel, berupa retikulum endoplasmik dan endosom. Tiga populasi sel utama yaitu keratinosit, antigen presenting cells (APC), dan melanosit berperan dalam mengenali mikroba di epidermis. Ekspresinya TLR berkaitan dengan mekanisme APC, Antigen Presenting

Cells (APC) adalah sel yang menampilkan antigen komplek TLR pada semua permukaanya. Sel APC dengan molekul TLR yang sudah teraktifasi oleh antigen berperan penting dalam memulai respon sel T CD8 terhadap antigen mikroba intreseluler.

Setalah adanya pengenalan peptida tertentu yang disajikan oleh molekul MHC pada APC, limfosit melaksanakan fungsinya seperti membunuh, dan membantu regulasi. Sel-sel ini berjalan melalui organisme pada serangkaian langkah, termasuk masuk ke jaringan, migrasi interstitial, APC scanning, pembentukan sinaps dan keluar ke jaringan.

Sitoskeleton dan Rho GTPases memiliki peran penting dalam fungsi sel B sebagai APC. Dengan adanya antigen *imobilisasi* secara khusus menargetkan BCR, sel B diperlukan untuk mensekresikan protease dan mengasamkan lingkungan ekstraselular dari sinaps untuk antigen *proteolisis* dan kemudian *internalisasi*.

Sitoskeleton memiliki peran yang sangat penting dalam menghadapi serangan virus. Pada dasarnya sitoskeleton terdiri dari tiga komponen, yaitu mikrotubul, aktin filamen, dan intermediet filamen. Secara umum aktin sitoskeleton pada organisme terdapat tiga macam yaitu α-aktin (terdapat di otot halus), y-aktin (sebagai serat dalam sel), danβ-aktin (terletak di bawah membran sel) (Gerdelmann dan Pawlizak, 2009). β-aktin memiliki beberapa mekanisme penting dalam regulasi sel, seperti morfologi sel, *clustering reseptor*, internalisasi antigen, dan mengatur keluar masuknya vesikel untuk pemrosesan antigen (Yuseff dan Reversat, 2011).

Dari uraian diatas maka penelitian ini mengambil fokus ke pemanfaatan klorofil mikrolaga *N. oculata* untuk meningkatkan system imun dalam meningkatkan ekspresi beta aktin pada ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas apakah klorofil mikroalga laut N. oculata mampu meningkatkan sistem imun dalam meningkatkan ekspresi β aktin pada ikan Kerapu Tikus (Cromileptes altivelis).

1.3 Tujuan

Tujuan dari penulisan penelitian ini adalah untuk mengetahui manfaat klorofil mikroalga laut *N. oculata* dalam meningkatkan sistem imun terhadap ekspresi β aktin pada ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*).

1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat Teoritis

Memberikan informasi mengenai klorofil yang diekstraksi dari mikroalga laut N. oculata dari segi profil proteinnya hingga dapat diketahui manfaat dari klorofil yang terkandung didalam mikroalga tersebut sehingga bisa dilakukan eksplorasi lebih mendalam agar mampu meningkatkan kemampuan system imun bagi ikan kerapu tikus.

1.4.2 Manfaat Praktis

Untuk mengetahui pengujian in-vivo klorofil terhadap ikan Kerapu Tikus sehingga mampu memberikan gambaran terhadap reaksi yang ditimbulkan akibat pemberian klorofil bagi system imun ikan tersebut sehingga selanjutnya mampu dijadikan sebuah alternatife imunostimulan bagi ikan Kerapu tikus yang terserang penyakit atau virus.

1.5 Tempat Dan Waktu

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Lingkungan dan Bioteknologi Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Balai Budidaya Air Payau (BBAP) Situbondo, Laboratorium UV-VIS Fakultas Kimia Universitas Islam Negri. Lab. FAAL RSSA pada tanggal 6 April- 10 Juli 2015.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mikroalga Nannochloropsis Oculata

N. oculata atau yang lebih dikenal dengan nama chlorella Jepang (Maruyama et al., 1986), merupakan sel berwarna kehijauan, tidak motil, dan tidak berflagel. Selnya berbentuk bola berukuran sedang dengan diameter 2-4 μm, tergantung spesiesnya, dengan chloroplast berbentuk cangkir. Organisme ini merupakan divisi yang terpisah dari Nannochloris karena tidak adanya chlorophyl b. Selnya bereproduksi dengan membentuk dua sampai delapan sel anak didalam sel induk yang akan dilepaskan pada lingkungan. Penggunaan mikroalga N. oculata secara komersial antara lain sebagai bahan makanan, energi biomass, pupuk pertanian, dan industry farmasi karena mikroalga ini mengandung protein, karbohidrat, lipid,dan berbagai macam mineral (Cresswell, 1989). Selain itu Nannochloropsis oculata merupakan pakan yang populer untuk rotifer, artemia, dan pada umumnya merupakan organisme penyaring (Renaud, 1991 dalam Harsanto, 2009)

2.1.1 Klasifikasi

N. occulata merupakan spesies mikroalga yang hidup diperairan dengan kelimpahan nutrisi tinggi. Mikroalga jenis ini dapat hidup dan tumbuh pada kawasan pesisir dan estuary yang masih dipengaruhi oleh salinitas dari air laut. Mikroalga ini termasuk dalam fitoplankton kelas Eustigmatophyceae. Berikut ini klasifikasi N. occulata yang dapat dilihat pada tabel 1 dibawah ini

Kingdom	Chromista
Filum	Chromophyta
Kelas	Eustigmatophyceae
Ordo	Eustigmatales
Famili	Eustigmataceae
Genus	Nannochloropsis

Species

Nannochloropsis oculata

Tabel 1. Klasifikasi Nannochloropsis oculata

2.1.2 Morfologi

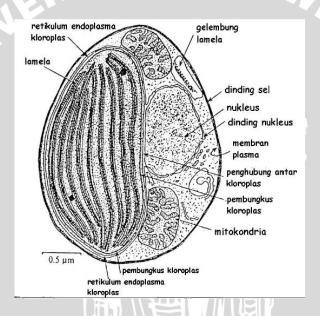
N. oculata merupakan fitoplankton berukuran mikroskopis dan berwarna hijau. N. oculata memiliki kloroplas dan nukleus yang dilapisi membran, kloroplas ini memiliki stigma (bintik mata) yang sensitive terhadap cahaya, selain itu N. oculata termasuk jenis alga yang dapat berfotosintesis karena memiliki klorofil C, dan yang paling khas dari organisme ini adalah memiliki dinding sel yang terbuat dari komponen selulosa.

N. oculata. memiliki sejumlah kandungan pigmen dan nutrisi seperti protein (52,11%), karbohidrat (16%), lemak (27,64%), vitamin C (0,85%), dan klorofil A (0,89%). Nannochloropsis sp. merupakan sel berwarna kehijauan, tidak motil, dan tidak berflagel. Selnya berbentuk bola dan berukuran kecil. N. oculata. merupakan pakan yang populer untuk rotifer, artemia, dan pada umumnya merupakan organisme filter feeder (penyaring) (Anon et al., 2009).



Gambar 1. Morfologi N. oculata (Facrulla, 2011)

Sel *Nannochloropsis* sp. bersifat berbentuk bulat telur, berdiameter 2-4 μm, memiliki pyrenoid dalam kloroplas tunggal dan mengandung klorofil yang banyak (Biondi, 2011). Sedangkan Hoek *et.al.* (1998) menjelaskan bahwa *Nannochloropsis* sp. merupakan fitoplankton berwarna hijau yang mampu melakukan aktifitas fotosintesis untuk memproduksi O₂ diperairan (Gambar 2). *Nannochloropsis* sp. dapat melakukan fotosintesis karena memiliki klorofil yang terdapat di kloroplas. Tiap satu sel *Nannochloropsis* sp. (Gambar 1) hanya memiliki satu kloroplas yang mengandung pyrenoid.



Gambar 2. Morfologi Sel N. oculata. (Hoek et.al., 1998)

2.1.3 Habitat Dan Biologi

Mikroalga *N. oculata* dapat tumbuh dimana-mana kecuali pada tempat yang sangat kritis bagi kehidupannya seperti di gurun pasir dan salju abadi. Merupakan spesies yang hidup diperairan dengan kelimpahan nutrisi tinggi pada daerah pesisir dan estuari. Selain dimanfaatkan sebagai pakan alami, *N. oculata* juga dapat digunakan sebagai absorben logam berat. *N. oculata* merupakan mikroalga bersel

satu yang mudah untuk dibudidayakan secara kontinyu dengan masa panen yang singkat.

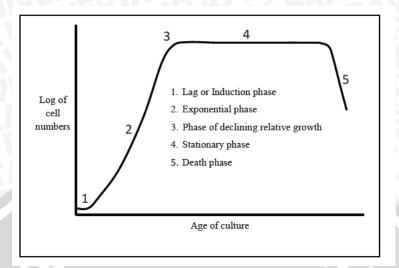
Nannochloropsis sp. dapat hidup di banyak tempat (kecuali tempat yang kritis bagi kehidupannya) sehingga bersifat kosmopolit dan dapat hidup pada kisaran salinitas yang baik sekitar 20 – 25 ‰. Nannochloropsis sp. Selain itu fitoplankton ini hidup pada pH 8-9,5; intensitas cahaya 1.000 – 10.000 lux dan suhu 25°-30° C. Selain itu Nannochloropsis sp. masih dapat bertahan hidup pada suhu 40° C namun pertumbuhannya tidak normal (Balai Budidaya Laut, 2002).

N. oculata adalah salah satu alga laut yang memiliki senyawa bahan aktif yang mampu digunakan sebagai antioksidan. Ekstrak N. oculata mengandung senyawa aktif yang salah satunya berupa terpenoid yang dapat digunakan sebagai antioksidan.

Nannochloropsis sp. memiliki kandungan lipid yang cukup tinggi yaitu antara 31-68% berat kering (Campbell, 2008; Kawaroe, 2007; Rao, 2008). Persentase PUFA (Poly Unsaturated Fattc Acid) utama pada Nannochloropsis sp. tetap stabil pada kondisi dengan keterbatasan cahaya, tetapi pada kondisi dengan intensitas cahaya jenuh kandungan PUFA menurun yang diikuti dengan kenaikan proporsi SFA dan MUFA (Mono Unsaturated Fatty Acid). Nannochloropsis sp. mengandung Vitamin B12 dan Eicosapentaenoic acid (EPA) sebesar 30,5 % dan total kandungan omega 3 HUFAs sebesar 42,7%, serta mengandung protein 57,02%.

2.1.4 Fase Pertumbuhan

Pertumbuhan mikroalga secara umum dapat dibagi menjadi lima fase yang meliputi fase lag (adaptasi atau istirahat), fase eksponensial, fase penurunan kecepatan pertumbuhan (deklinasi), fase stasioner dan fase kematian.



Gambar 3. Grafik pertumbuhan mikroalga (Edhy *et al.*, 2003) Pada fase lag penambahan jumlah densitas mikroalga sangat rendah atau bahkan dapat dikatakan belum ada penambahan densitas. Hal tersebut disebabkan karena sel-sel mikroalga masih dalam proses adaptasi secara fisiologis terhadap media tumbuh sehingga metabolisme untuk tumbuh manjadi lamban. Pada fase eksponensial terjadi penambahan kepadatan sel mikroalga (N) dalam waktu (t) dengan kecepatan tumbuh (μ) sesuai dengan rumus eksponensial.

Pada fase penurunan kecepatan tumbuh pembelahan sel mulai melambat karena kondisi fisik dan kimia kultur mulai membatasi pertumbuhan. Pada fase stasioner, faktor pembatas dan kecepatan pertumbuhan bersifat setimbang karena jumlah sel yang membelah dan yang mati sama. Pada fase kematian, kualitas fisik dan kimia kultur berada pada titik dimana sel tidak mampu lagi mengalami pembelahan.

Hal ini juga diakui oleh Lavens and Sorgeloos (1996) pertumbuhan mikroalga atau fitoplankton dibagi dengan beberapa fase (gambar 3) yaitu fase lag, fase logaritmik/eksponensial, fase berkurangnya pertumbuhan relatif, fase stasioner, dan fase kematian,

- Fase Lag: Pada fase ini pertumbuhan fitoplankton dikaitkan dengan adaptasi fisiologis metabolisme sel pertumbuhan fitoplankton, seperti peningkatan kadar enzim dan metabolit yang terlibat dalam pembelahan sel dan fiksasi karbon.
- Fase Logaritmik atau Eksponensial: Pada fase ini sel fitoplankton telah mengalami pembelahan sel laju pertumbuhannya tetap. Pertumbuhan fitoplankton dapat maksimal tergantung pada spesies, nutrien, intensitas cahaya, dan temperatur.
- 3. Fase berkurangnya pertumbuhan relatif : Pertumbuhan sel mulai melambat ketika nutrien, cahaya, pH, CO₂ atau faktor kimia dan fisika lain mulai membatasi pertumbuhan.
- 4. Fase Stasioner : Pada fase keempat faktor pembatas dan tingkat pertumbuhan seimbang. Laju kematian fitoplankton relatif sama dengan pertumbuhannya sehingga kepadatan pada fase ini relatif konstan.
- Fase Kematian : Pada fase kematian, kualitas air memburuk dan nutrient habis hingga ke level tidak sanggup menyokong kehidupan fitoplankton. Kepadatan sel.

2.1.5 Faktor Pendukung Pertumbuhan mikroalga N. oculata

Martosudarmo (1979) menyatakan, kualitas air juga dapat menjadi faktor pembatas dalam pertumbuhan mikroalga laut seperti salinitas, pH, suhu dan CO₂. Adakalanya jenis-jenis mikroalga tertentu tidak dapat hidup oleh karena faktor tersebut. Berikut ini berbagai macam parameter kimia untuk kelangsungan hidup mikroalga laut *N. oculata*:

a. Suhu

Suhu merupakan salah satu faktor penting yang dapat mempengaruhi tingkat metabolisme suatu organisme. Perubahan suhu perairan yang terjadi sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan perairan. Kenaikan suhu perairan akan berdampak pada meningkatnya kebutuhan akan oksigen, namun begitu disisi lain akan mengakibatkan turunnya kelarutan oksigen dalam air.

b. Salinitas

Salinitas merupakan salah satu faktor yang sangat penting bagi kehidupan di air, terutama dalam mempertahankan keseimbangan osmotik. Kisaran salinitas yang berubah-ubah dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroalga. Beberapa mikroalga dapat tumbuh dalam kisaran salinitas yang tinggi tetapi ada juga yang dapat tumbuh dalam kisaran salinitas yang rendah. Namun, hampir semua jenis mikroalga dapat tumbuh optimal pada salinitas sedikit dibawah habitat asal. Pengaturan salinitas pada media yang diperkaya dapat dilakukan dengan pengenceran dengan menggunakan air tawar.

c. Derajat Keasaman

Derajat keasaman atau pH digambarkan sebagai keberadaan ion hidrogen. pH yang telalu tinggi ataupun terlalu rendah yang tidak sesuai dengan habitatnya dapat mengganggu pertumbuhan mikroalga. Variasi pH dalam media kultur dapat mempengaruhi metabolisme dan pertumbuhan kultur mikroalga antara lain mengubah keseimbangan karbon anorganik, mengubah ketersediaan nutrien dan mempengaruhi fisiologi sel.

d. DO (Oksigen Terlarut)

Oksigen terlarut (DO) adalah jumlah oksigen terlarut dalam air yang berasal dari fotosintesa dan absorbsi atmosfer/udara. Oksigen terlarut di suatu perairan

sangat berperan dalam proses penyerapan makanan oleh mahkluk hidup dalam air.

Untuk mengetahui kualitas air dalam suatu perairan, dapat dilakukan dengan mengamati beberapa parameter kimia seperti oksigen terlarut (DO).

e. Cahaya

Pada kultur fitoplankton, cahaya merupakan faktor terpenting karena fitoplankton membutuhkan cahaya untuk proses fotosintesis (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995). Cahaya dalam kultur fitoplankton diperoleh dari penyinaran lampu neon. Penyinaran cahaya harus sesuai untuk kultur, apabila cahaya terlalu terang akan menghambat proses fotosintesis, durasi pencahayaan buatan minimum harus 18 jam (Lavens and Sorgeloos, 1996). Sari dan Manan (2012) menjelaskan bahwa untuk kultur skala laboratorium cahaya didapat dari cahaya lampu TL dengan kapasitas sebesar 1450 *lux*.

f. Nitrogen

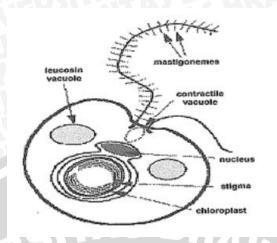
Nitrogen merupakan bagian dari molekul klorofil, maka tidak mengherankan bila defisiensi unsur ini akan menghambat pembentukan klorofil. Nitrogen merupakan kebutuhan pokok bagi seluruh organisme terutama fitoplankton untuk tumbuh dan berkembang (Riyono, 2007).

2.2 Fragmen Pigmen Protein

Komponen penting dan utama pada sel hewan atau manusia adalah protein, karena protein berperan sebagai zat utama dalam pembentukan tubuh (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995). Protein memiliki fungsi biologis yang sangat luas dan merupakan polipeptida yang terbentuk secara alami. Berat molekul protein dapat lebih besar dari 5000 Da (Kuchel and Ralston, 2006).

Organisme autotrof memiliki satu pigmen utama yaitu pigmen klorofil dan dua pigmen asesoris yaitu karotenoid dan fikobiliprotein/fikobilin. Karotenoid terbagi lagi menjadi dua: kelompok pigmen karoten dan xantofil, sedangkan fikobilin terbagi menjadi empat: fikoeritrobilin, fikosianobilin, fikoeritrosianin, dan fikourobilin (Nobel, 2009). Berdasarkan kepolaran dan kelarutannya, pigmen-pigmen ini dikelompokkan ke dalam golongan pigmen polar (hidrofilik) dan non polar (lipofilik). Klorofil dan karotenoid termasuk pigmen non polar dan harus diekstrak dengan pelarut organic (metanol, etanol, aseton) dengan kepolaran tertentu. Pigmen fikobilin merupakan pigmen yang berasosiasi dengan protein dan bersifat polar serta larut air, dapat diekstrak dengan menggunakan pelarut air atau buffer (Sedjati, *et al.*, 2012).

Pigmen atau zat warna, pada tumbuh-tumbuhan tingkat tinggi pada umumnya terdapat dalam sel-sel jaringan meristem yang dalam perkembangannya akan membentuk *chloroplast* ataupun *chromoplast. Chloroplast* pada alga mempunyai bentuk dan ukuran yang sangat beragam, sedangkan pada tumbuh-tumbuhan tingkat tinggi pada umumnya seragam (BOGORAD, 1962). Kloroplas tersusun dari stroma yang diliputi selaput membran, di dalamnya tersebar granula kecil yang mengandung pigmen klorofil berwarna hijau dan pigmen-pigmen lainnya, antara lain carotenoid yang berwarna merah-kuning. *Chromoplast* mengandung pigmen-pigmen merah dan kuning tetapi bentuk dan ukurannya sangat berbeda dengan *chloroplast*. Pigmen dalam *chloroplast*, khususnya klorofil mempunyai peranan yang esensial dalam proses fotosintesis (Riyono, 2007). Didalam FPP terdapat berbagai pigmen yang ada di mikroalga *N. oculata* salah satunya PCP dan Karetenoid yang umum banyak ditemukan pada mikroalga lainnya untuk membantu proses fotosentesis.



Gambar 4. Letak pigmen di sel mikroalga N. oculta (Waggoner dan speer, 1999)

2.2.1 Peridinin Chlorophyll Protein (PCP)

PCP adalah organel, pusat fiksasi karbondioksida dalam kloroplas ganggang, tidak terikat oleh membran, akan tetapi PCP merupakan wilayah khusus didalam plastida (Sudarsono, 2013). PCP diketahui mengandung enzim ribulose-1,5-bisphosphase carboxylase/ oxygenase (RubisCO) yaitu enzim yang berfungsi untuk fiksasi karbon.

PCP merupakan organel dalam stroma chloroplast yang tidak berikatan dengan membran dan dikelilingi oleh butiran-butiran halus zat pati. Oleh karena itu PCP diasosiasikan sebagai gudang zat pati yang dihasilkan oleh sel. Zat pati dalam sel tersebut yang akhirnya akan diubah menjadi amilum untuk dimanfaatkan oleh sel (Fasya, 2013).

PCP merupakan salah satu komponen penyusun nutrisi pada *N. oculata* yang terkait dengan klorofil. PCP adalah protein yang larut dalam air, merupakan pigmen protein kompleks yang berperan sebagai pemanen cahaya dalam proses fotosintesis. (Ogata *et.al.*, 1994). Protein yang merupakan karotenoid memiliki fungsi sebagai pemanen cahaya. Sebuah pigmen yang berasosiasi dengan klorofil yang

ditemukan dalam *Peridinin Chlorophyll Protein*. Fungsi lain PCP yaitu pendukung dari kerja kloroplas, dimana dia menyerap gelombang cahaya yang tidak dapat diserap oleh kloroplas (450-550 nm), sehingga penyerapan cahaya dapat optimal.

2.2.2 Karetenoid

Karotenoid merupakan pigmen yang paling umum terdapat di alam dan disintesis oleh semua organisme fotosintetik dan fungi. Karotenoid berasal dari kelas terpenoid, berupa rantai poliena dengan 40 karbon yang dibentuk dari delapan unit isoprene C₅, yang memberikan struktur molekl karotenoid yang khas. Karotenoid dikelompokan menjadi 2 kelompok yaitu karoten yang merupakan kelompok hidrokarbon (C₄₀H₅₀) dan Xantofil yang merupakan turunan karoten teroksigenasi. Semua xantofil disintesis oleh tanaman tinggi, sementara violaxantin, anteraxanting, zeaxantin, neoxantin dan lutein juga dapat disintesis oleh mroalgae (Fretes, *et. al.*, 2013)

Karotenoid merupakan senyawa isoprenoid yang dihasilkan dari salah satu jalur asam mevalonat. Jalur asam mevalonat tidak hanya membentuk senyawa isoprenoid saja tetapi juga membentuk senyawa metabolit lain; diantaranya isoflavonoid, indol alkaloid, diterpenoid, dan triterpenoid, sehingga diduga kandungan karotenoid yang rendah pada beberapa tumbuhan air lebih dioptimalkan untuk pembentukkan senyawa-senyawa tersebut (Kurniawan *et al.*, 2010).

Karotenoid terbagi lagi menjadi dua: kelompok pigmen karoten dan xantofil sedangkan fikobilin terbagi menjadi empat fikoeritrobilin, fikosianobilin, fikoeritrosianin, dan fikourobilin. Berdasarkan kepolaran dan kelarutannya, pigmenpigmen ini dikelompokkan ke dalam golongan pigmen polar (hidrofilik) dan non polar (lipofilik). Klorofil dan karotenoid termasuk pigmen nonpolar dan harus diekstrak dengan pelarut organic (metanol, etanol, aseton) dengan kepolaran tertentu. Pigmen

fikobilin merupakan pigmen yang berasosiasi dengan protein dan bersifat polar serta larut air, dapat diekstrak dengan menggunakan pelarut air atau buffer (Sedjati *et al.*, 2012).

Karoten yang dikenal sebagai prekursor vitamin A (beta karoten), saat ini telah dikembangkan karoten sebagai efek protektif melawan sel kanker, penyakit jantung, mengurangi penyakit mata, antioksidan, dan regulator dalam sistem imun tubuh. Likopen yang terkandung dalam tomat mampu mengoksidasi LDL (*low dencity lipoprotein*) sehingga kadar LDL berkurang. Selain itu mengurangi resiko pembentukkan atheriosklerosis serta penyakit jantung koroner. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa likopen mampu mengurangi resiko penyakit kanker prostat, kanker paru-paru, kanker rahim, dan kanker kulit (Kurniawan *et al.*, 2010).

2.3 Klorofil

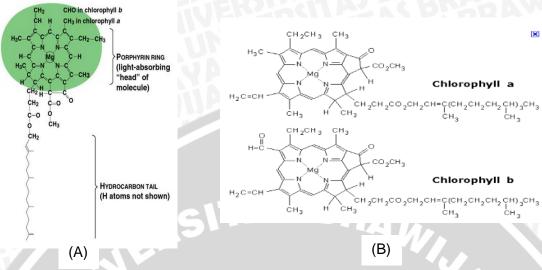
Klorofil berasal dari bahasa Yunani "chloros" yang berarti hijau dan "phyllum" yang berarti daun. Klorofil merupakan pigmen tanaman berwarna hijau (Setijo, 2008). Klorofil adalah pigmen utama dalam fotosintesis, lebih banyak menyerap cahaya biru dan merah, dimana pigmen asesoris seperti karotenoid dan fikobilin dapat meningkatkan penyerapan spektrum hijau-biru dan kuning (Kumara dan Gontjang, 2012). Klorofil merupakan senyawa ester dan larut di dalam solvent organik. Ekstraksinya dilakukan dengan menggunakan pelarut organik polar, khususnya aseton dan alkohol. Kandungan klorofil bersifat tidak stabil dan lebih mudah rusak bila terkena sinar, panas, asam dan basa (Rozak dan Hartanto, 2008).

Klorofil adalah pigmen fotosintesis yang terdapat dalam tumbuhan, menyerap cahaya merah, biru, dan ungu, serta merefleksikan cahaya hijau yang menyebabkan tumbuhan memperoleh cirri warnanya. Terdapat dalam kloroplas dan memanfaatkan

cahaya yang diserap sebagai energi untuk reaksi-reaksi cahaya dalam proses fotosintessis. Klorofil A merupakan salah satu bentuk klorofil yang terdapat pada semua autrotof. Klorofil B terdapat pada ganggang hijau dan tumbuhan darat. Akibat adanya klorofil tumbuhan dapat menyusun makanannya sendiri dengan bantuan cahaya matahari (Ernest, 2012)

Menurut Riyono (2007), pigmen dalam kloroplas yaitu klorofil mempunyai peranan yang esensial dalam proses fotosintesis. Fotosintesis merupakan dasar dari produksi zat-zat organik dalam alam (produksi primer). Proses fotosintesis merupakan reaksi berantai yang amat panjang dan kompleks. Proses ini tidak dapat dilakukan secara *in-vitro* dengan menggunakan larutan klorofil ataupun dengan menggunakan *chloroplast* yang telah diisolir dari sel. Proses tersebut hanya dapat berlangsung di dalam sel hidup yang mengandung klorofil. Fungsi utama klorofil dalam proses fotosintesis adalah sebagai katalisator dan menyerap energi cahaya (kinetic energy) yang akan digunakan dalam proses tersebut.

Klorofil juga mengandung logam, tetapi logam di dalam klorofil bukan Fe melainkan Mg (Sumardjo, 2006). Ada 2 macam klorofil yang dimiliki tanaman tingkat tinggi: klorofil-a ($C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$) dan klorofil-b ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$). Klorofil a mengandung warna hijau dan mempunyai rumus molekul $C_{55}H_{72}MgN_4O_5$ sedangkan klorofil b mengandung warna biru dan mempunyai rumus molekul $C_{55}H_{70}MgN_4O_6$. Klorofil berfungsi untuk menyerap energi cahaya matahari selain warna hijau atau biru (Furqonita, 2007).



Gambar 5.(A) Struktur Klorofil (Campbell *et al* 2000). (B) Struktur Klorofil a dan klorofil b (Ernest, 2012)

Bentuk klorofil alami yang larut dalam lemak terdapat dalam jus segar memberikan beberapa keuntungan lebih daripada klorofil larut dalam air. Jenis klorofil ini dapat mendorong produksi hemoglobin dan sel-sel darah merah serta mengurangi keluarnya darah saat menstruasi. Kenyataannya molekul klorofil sama fungsinya dengan molekul hemoglobin dari sel darah merah. Tidak seperti klorofil yang larut dalam air, klorofil larut dalam lemak dapat diserap dengan mudah oleh tubuh. Selain itu, klorofil ini mengandung senyawa-senyawa lain dari kloroplas kompleks (termasuk beta karoten dan vitamin K) yang mempunyai manfaat untuk kesehatan yang hampir sama dengan fungsi yang disebutkan diatas.

Kandungan klorofil dapat dihitung dengan rumus (Arrohmah. 2007).

Klorofil a = 12.7 (A.663) - 2.69 (A.645) mg/l

Klorofil b = 22.9 (A.645) - 4.68 (A.663) mg/l

Klorofil total = 8.02 (A.663) + 20.2 (A.645) mg/l

2.3.1 Manfaat Klorofil

Menurut Abdilah *et al.*, (2012) Klorofil sebagai bahan pangan fungsional bermanfaat menambah asupan gizi, dapat digunakan untuk memelihara kesehatan dan mungkin berguna untuk mencegah penyakit (preventif) bukan untuk menyembuhkan penyakit (kuratif). Menurut Hosikian *et al.*, (2010) klorofil merupakan senyawa bioaktif yang dapat diekstrak dari mikroalga. Klorofil ini biasa digunakan sebagai pewarna makanan dan memiliki kemampuan sebagai antioksidan dan antimutagenik. Menurut Mardaningsih *et al.*, (2012) klorofil mampu meningkatkan fungsi metabolik dalam tubuh. Klorofil merupakan senyawa antioksidan alami yang terdapat di dalam organisme fotosintetik.

Klorofil yang merupakan salah satu pigmen yang sangat berperan aktif dalam membantu proses fotosintesis mikroalga menurut Harnadiemas (2012), memiliki beberapa manfaat bagi makhluk hidup yaitu :

- Menghambat pertumbuhan bakteri jahat di dalam saluran cerna dan merangsang pertumbuhan bakteri yang berguna untuk pencernaan makanan sehingga tidak mudah sariawan dan diare
- Dapat merangsang pertumbuhan fibroblast yang mampu mempercepat penyembuhan pada luka
- Merangsang pembentukan sel darah merah (eritrosit), mencegah penggumpalan pada pembuluh darah sehingga mampu mencegah tekanan darah tinggi, penyakit reumatik dan jantung sehingga aliran darah menjadi lancar.
- Bersifat anti-proteolitik, untuk mencegah alergi, tumor dan kanker
- Bersifat antioksidan sehingga dapat mengikat radikal bebas.

 Mempunyai kemampuan memperbaiki fungsi hati sehingga tubuh mampu melakukan metabolisme dengan baik dan detoksifikasi racun.

2.3.2 Analisis FPP Mikroalga N. oculata

Protein hasil sentrifugasi yang berada didalam salah satu jenis mikrolaga biasa terdiri dari berbagai jenis protein atau yang biasa disebut *Crude protein*. Untuk pengujian dan analisis dari keberadaan *crude protein* mikroalga tersebut biasanya bisa dilakukan dengan cara pengujian kuantitatif maupun kualitatif. Analisis kuantitatif biasa dilakukan dengan alat Spektrofotometer dengan panjang gelombang tertentu tergantung pada jenis protein dan pereaksi yang dipakai. Sedangkan untuk analisis kualitatif bisa menggunakan kromatografi atau elektroforesis. Kedua analisis tersebut bisa digunakan pada saat yang berbeda ataupun digunakan untuk analisa secara terpisah (Widyarti, 2011).

a. Elektroforesis

Elektroforesis adalah suatu teknik yang mengukur laju perpindahan atau pergerakan partikel-partikel bermuatan dalam suatu medan listrik. Prinsip kerja dari elektroforesis berdasarkan pergerakan partikel-partikel bermuatan negatif (anion), yang bergerak menuju kutub positif (anode), sedangkan partikel-partikel bermuatan positif (kation) akan bergerak menuju kutub negatif (anode). Hasil elektroforesis yang terlihat adalah terbentuknya band yang merupakan fragmen DNA hasil amplifikasi dan menunjukkan potongan-potongan jumlah pasangan basanya. Elektroforesis digunakan dengan tujuan untuk mengetahui ukuran dan bentuk suatu partikel baik DNA, RNA dan protein. Selain itu, elektroforesis juga digunakan untuk fraksionasi yang dapat digunakan untuk mengisolasi masingmasing komponen dari campurannya, mempelajari fitogenetika, kekerabatan dan mempelajari penyakit yang diturunkan (Klug & Cummings 1994).

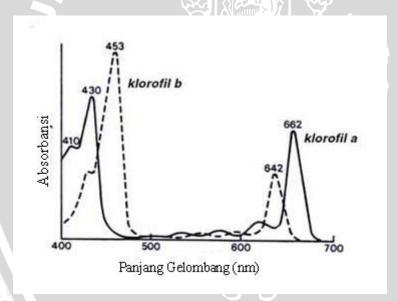
Menurut Widyarti (2011), elektroforesis sendiri merupakan metode yang sangat umum digunakan untuk memisahkan molekul yang bermuatan atau dibuat bermuatan. Dengan menggunakan alat ini protein bisa dipeisahkan berdasarkan berdasarkan berat molekulnya (Menggunakan SDS-PAGE) atau berdasarkan titik isoelektriknya (menggunakan IEF). DNA juga dipisahkan brdasarkan berat molekulnya menggunakan elektroforesis karena alat ini mampu melakukan pemisahan makromolekul (seperti protein dan asam nukleatnya). Tetapi disisi lain pemisahan makromolekul ini memerlukan penyangga untuk mencegah terjadinya difusi karena timbulnya panas dari arus listrik yang digunakan. Gel poliakrimida dan agarosa merupakan matriks penyangga salah satu contoh Elektroforesis ini adalah SDS-PAGE (Sodium deodecyl poliakrilamide gel electrophoresis) yang digunakan untuk pemisahan sampel protein.

b. Spektrofotometer

Spektrofotometer merupakan salah satu peralatan penelitian yang paling banyak digunakan dalam bidang biologi. Spektrofotometer mengukur jumlah relatif cahaya dari panjang gelombang berbeda yang diserap dan diteruskan oleh larutan pigmen. Di dalam spektrofotometer, cahaya putih dipidahkan menjadi sejumlah warna (panjang gelombang) oleh prisma. Kemudian, satu demi satu, warna cahaya yang berbeda itu dilewatkan melalui sampel. Cahaya yang diteruskan menabrak tabung fotolistrik, yang mengubah energi cahaya menjadi listrik, dan arus listriknya diukur dengan suatu alat ukur. Setiap kali panjang gelombang cahaya berubah, alat ukur akan mengindikasikan fraksi cahaya yang diteruskan melalui sampelnya, atau sebaliknya, fraksi cahaya yang diserap.

Grafik yang menyajikan profil penyerapan (absorpsi) pada panjang gelombang yang berbeda disebut spektrum absorpsi (Campbell *et al.*, 2002).

Di alam, panjang gelombang sinar bervariasi, baik kualitas maupun kuantitasnya. Panjang gelombang yang biasa digunakan oleh tumbuhan untuk berfotosintesis adalah yang berkisar antara 400-700 nanometer (nm). Sinar ini biasa disebut sebagai sinar tampak, karena bila dipantulkan dalam air akan terlihat warna merah, jingga, kuning, hijau, biru, ungu (Kuncoro, 2004). Gelombang dengan panjang berlainan akan menimbulkan cahaya dengan warna berlainan sedangkan campuran cahaya dengan panjang-panjang gelombang ini akan menyusun cahaya putih (Bassett *et al.*, 1991).



Gambar 2.3. Panjang Gelombang Klorofil (Sumaryati, 2011)

Pada klorofil a maupun klorofil b memiliki serapan cahaya pada dua daerah gelombang, yaitu pada panjang gelombang 400 nm – 490 nm dan pada rentang panjang gelombang 620 nm sampai 680 nm. Pada serapan klorofil, cahaya biru dan merah dari sinar matahari merupakan panjang gelombang yang paling efektif untuk menghasilkan eksitasi electron.

Spektrum serapan tersebut juga menunjukkan bahwa hanya panjang gelombang cahaya tertentu saja yang aktif dalam proses fotosintesis. Bagian radiasi cahaya yang aktif dalam proses fotosintesis dikenal dengan istilah *Photosynthetic Active Radiation* (PAR), yaitu pada rentang panjang gelombang 400 nm sampai 700 nm (Sumaryati, 2011).

Tabel 2. Panjang Gelombang Warna-Warna (Bassett dkk, 1991)

Warna	Panjang Gelombang (nm)	Warna	Panjang Gelombang (nm)
Ultraviolet	<400	Kuning	570-590
Violet	400-450	Jingga	590-620
Biru	450-500	Merah	620-760
Hijau	500-570	Inframerah	>760

Absorbansi disebabkan oleh ketidakmurnian pada suatu material dan mengacu pada perubahan energi optik menjadi optoelektronik atau getaran molekul. Jumlah absorbs dari ketidakmurnian bergantung pada konsentrasi dan panjang gelombang cahaya. Pada daerah *infrared* dan *far infrared*, berkas absorbs juga terrjadi, ekor dari spektrum absorpsi mendekati daerah infrared yang disebabkan oleh getaran molekul dalam materi (Tambunan 2009).

Hukum Beer-Lambert menghubungkan antara absorbansi cahaya dengan konsentrasi pada suatu bahan yang mengabsopsi berdasarkan persamaan berikut (Lestari, 2007).

$$A = log (I_{in}/I_{out}) = (1/T) = a - b - c$$

A = Absorbance

I_{in} = Intensitas cahaya yang masuk

I_{out} = Intensitas cahaya yang keluar

T = Transmitansi

- a = tetapan absorpsivitas molar
- b = panjang jalur
- c = konsentrasi pada suatu bahan yang mengabsorpsi

2.4 Ikan Kerapu Tikus

Kerapu atau yang dikenal juga dengan grouper merupakan salah satu spesies ikan yang sangat penting baik dari segi komersil maupun segi ekologi. Kerapu termasuk golingan 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.

2.4.1 Klasifikasi

Taksonomi ikan Kerapu Tikus menurut Evalawati *et al.*, (2001), dapat dilihat dibawah ini:

Phylum : Chordata : Vertebrata Subphylum Class : Osteichtyes Sub Class : Actinopterigi : Percomorphi Ordo : Percoidea Sub Ordo Family : Serranidae Genus : Cromileptes

Species : (Cromileptes altivelis)

2.4.2 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 bagian depan. Umumnya ikan ini memiliki sirip ekor yang bulat (*rounded*). Dengan warna dasar sawo matang, perut bagian bawah berwarna agak putih dan badannya memiliki bintik berwarna merah kecoklatan. Tampak pula 4-6 baris warna gelap yang melintang hingga ekornya. Badannya ditutupi oleh sisik sisik kecil mengkilap loreng (Fajriani, 2011).



Gambar 6. Morfologi Ikan Kerapu Tikus (c. altivelis) (Sumber: Google image, 2015)

2.4.3 Habitat

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 diadaerah 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).

2.4.4 Kebiasaan Pakan

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.

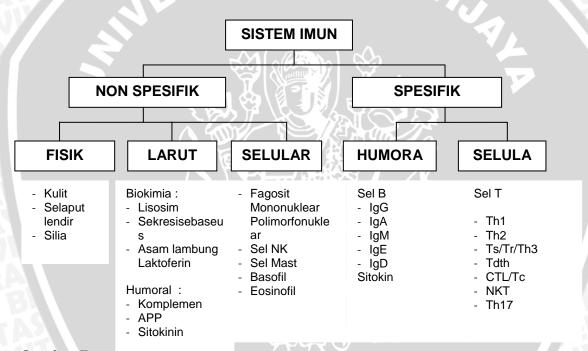
Spesies Ikan Kerapu memiliki panjang usus yang lebih panjang dibandingkan dengan panjang tubuhnya, diduga memilii pertumbuhan yang cepat. Hal ini disebabkan oleh aktivitas dan kebiasaan dalam tingkay pemilihan jenis makanan. Ikan kerapu memiliki panjang usus berkisar 0,26-1,54 meter, selain itu usus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

2.5 Sistem Pertahanan Tubuh Ikan

Ikan teleostei termasuk anggota vertebrata yang paling rendah. Meskipun demikian ikan teleostei memiliki dua sistem pertahanan tubuh sebagaimana anggota vertebrata lainnya yaitu pertahanan alamiah (*innate immunity*) dan pertahanan adaptif (*adaptive immunity*), walaupun sistem pertahanan tubuh ikan relatif paling sederhana jika dibandingkan dengan anggota vertebrata lainnya. Hal ini ditunjukkan

bahwa ikan bertulang rawan (*Elasmobranchii*) hanya memiliki IgM sedangkan pada Teleostei memiliki IgM dan antibodi lainnya tetapi masih belum jelas termasuk kategori kelas antibodi yang mana. Berbeda pada amfibi yang memiliki 2 atau 3 kelas Ig, reptil (3 kelas Ig), burung (3 kelas Ig), dan mamalia (7 atau 8 kelas Ig) (Tort *et al.*, 2003).

Baratawidjaja dan Rengganis (2009), membagi secara garis besar sistem pertahanan tubuh (imun) ada 2 yaitu : sistem imun nonspesifik dan sistem imun spesifik, seperti yang digambarkan pada Gambar dibawah ini.



Gambar 7. Gambaran umum sistem imun vertebrata (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009)

2.5.1 Sistem Pertahanan alamiah (innate immunity) / Non- Spesifik

Pertahanan non-spesifik (*innate*) merupakan pertahanan utama pada ikan juvenil, karena respon imun yang sempurna baru terbentuk ketika ikan telah dewasa. Ikan muda tidak mempunyai respon imun spesifik yag sempurna, oleh karena itu lebih mengandalkan sistem pertahanan non-spesifik (Vastein, 1997). Menurut Abbas and Lichtman (2005), menjelaskan pertahanan *innate* (disebut juga pertahanan

alamiah atau *native*) merupakan pertahanan tubuh pertama terhadap semua infeksi mikroorganisme yang masuk ke dalam tubuh inang.

Sistem imun pada *avertebrata* yang sangat efisien dimana sistem imun yang teramati adalah sistem imun *innate*. Sistem imun *innate* juga berperan penting dalam memberantas infeksi pada ikan. Pertahanan *innate* berperan penting dalam pengaktifan pertahanan adaptif. Pengaktifan beberapa komponen pada pertahanan *innate* seperti sel-sel fagosit, produksi sitokin dan kemokin, dan pengaktifan sistem komplemen dan berbagai macam reseptor sel akan memicu sel T dan sel B serta APC (*Antigen Presenting Cells*) (Magnadottir, 2006).

2.5.2 Sistem Pertahanan Adaptif (Spesifik)

Pada dasarnya sistem imun innate dan adapitf selalu bekerjasama dalam mengeliminasi pathogen. Sistem imun adaptif mampu mengenali dan secara selektif mengeliminasi mikroorganisme dan antigen asing secara spesifik. Freeman (2007), Menurut Fujaya (2004). Berdasarkan cara perolehannya kekebalan ini disebut juga kekebalan buatan atau adaptif karena kekebalan baru akan terbentuk setelah dipicu oleh antigen dari luar.

Abbas and Lichtman (2005), menyebutkan respon imun adaptif membutuhkan pengenalan spesifik antigen (Ag) asing. Respon imun adaptif sering disebut juga dengan istilah pertahanan spesifik dan kadang juga disebut dengan istilah acquired immunity (pertahanan dapatan). Karakterisitik yang dimiliki dalam sistem pertahanan adaptif antara lain: kemampuan untuk mengenali antigen baik dari jenis mikrobia maupun antigen yang bukan dari jenis mikrobia secara spesifik, mampu untuk mengenali senyawa dari mikroba maupun nonmikroba dalam jumlah besar karena reseptor-reseptornya diproduksi dengan rekombinasi somatic pada segmen-segmen gen, kemampuan untuk "mengingat" antigen yang pernah dikenali

dan akan merespon dengan lebih cepat antigen-antigen tersebut pada pengenalan berikutnyaSistem pertahanan adaptif dibagi menjadi dua, yaitu humoral dengan agen imun limfosit sel B yang diperantarai oleh antibody dan sistem imun selular dengan agen imun limfosit sel T yang diperantarai oleh sel (Baratawidjaja, 2002).

2.5.3 Sel B (BCR/ B-Cell Receptor)

Sebanyak 20% dari semua leukosit dalam sirkulasi darah adalah limfosit yang terdiri dari Sel T dan Sel B yang merupakan pengontrol atau pengatur sistem imun. Sel-sel tersebut dapat mengenali benda asing dan membedakannya dari sel jaringan sendiri. Sel B sendiri merupakan 5-25% dari limfosit dalam darah yang berjumlah 1000-2000 sel/mm³. Pada saat Seleksi pematangan terjadi pada organ limfoid primer yaitu sumsum tulang belakang. Reseptor sel B mengikat antigen multivalent asing, akan memacu 4 proses, yaitu: (1). proliferasi, (2.) diferensiasi menjadi sel plasma yang memproduksi antibodi, (3.) membentuk sel memori dan (4.) mempresentasikan antigen ke sel T (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009).

Aktivasi sel B oleh antigen protein larut memerlukan bantuan sel Th, Tanpa adanya interaksi dengan TCR dan sitokin, ikatan antigen dengan mlg pada sel B sendiri tidak akan menginduksi proliferasi dan diferensiasi. Pada waktu yang sama, sebagian sel B akan kembali ke fase istirahat, sebagian sel akan menjadi matang, sel B menjadi memori yang dapat memberikan respon imun dengan lebih cepat pada paparan ulang dengan antigen yang sama. Ikatan antigen juga mengawali sinyal melalui BCR yang menginduksi sel B meningkatkan ekspresi sejumlah molekul membrane sel seperti MHC-II dan ligan kostimulator B. Peningkatan ekspresi kedua protein membrane tersebut meningkatkan kemampuan sel B berfungsi sebagai APC dalam aktivasi sel Th. Pada umumnya diperlukan 30-60

menit untuk memproses dan mempresentasikan antigen melalui MHC-II pada permukaan sel (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009).

2.5.4 Sel T (TCR. T-cell Receptor)

TCR adalah *Antigen-antigen* yang *dipresentasikan* oleh molekul MHC, baik MHC kelas I maupun MHC kelas II, sel T kemudian diikat oleh sebuah *reseptor* yang terletak pada permukaan sel T TCR secara *spesifik* mengikat 2 protein yaitu peptide asing (*antigen*) dan molekul MHC pada permukaan APC. TCR terdiri dari dua rantai *polipeptida* yaitu rantai α (BM 27.000 Da) dan rantai β (31.000 Da). TCR mengerjakan dua pengikatan ganda menggunakan suatu tempat perlekatan (*binding site*) yang disebut dengan V (*variable*) domain pada rantai β dan rantai α. Seperti pada antibodi, V domain rantai α dan rantai β pada TCR mengandung tiga CDR (*complementary determining regions*) yaitu CDR1, CDR2 dan CDR3. Molekul MHC mengikat salah satu bagian dari *antigen* (disebut dengan *agretop*) sedangkan TCR mengikat bagian yang lain dari *antigen* tersebut (disebut dengan *epitop*) (Madigan *et al.*, 2003).

Sel T pada umumnya berperan pada inflamasi, aktivasi fagositosis makrofag, aktivasi dan ploriferasi sel B dalam produksi antibodi. Sel T juga berperan dalam pengenalan dan penghancuran sel yang terinfeksi virus. Sel T terdiri dari sel Th (*T-helper*) yang mengaktifkan makrofag untuk membunuh mikroba dan sel CTL/Tc(*Cytotoxic T Lymphocyte/ T Cytotoxic*) yang membunuh sel yang terinfeksi mikroba/virus dan menyingkirkan sumber infeksi (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009).

2.5.5 β -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 kontraktil (Joseph *et al.*, 2012). Aktin memiliki dua bentuk yaitu globular aktin (G-aktin) dan filament aktin (F-aktin).

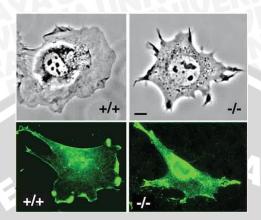
Filamen aktin dibentuk oleh perakitan searah monomer Globular subunit aktin yang terdiri dari ujung yang berduri runcing dan sebaliknya (Wickramarachchi *et al.*, 2010).

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 γ aktin pada otot jantung dan α aktin yang terletak ada skeletal, dua isoform lain merupakan aktin yang berhubungan dengan otot polos yaitu α dan γ aktin, serta dua aktin lainnya terdapat pada sitoplasma yaitu β - aktin dan γ -aktin (Joseph et al., 2012).

Salah satu isoform aktin yang memiliki peranan penting dalam sel yaitu β-aktin. β- 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, β- aktin berperan penting dalam perubahan bentuk sel yang tepat selama proses mitosis. (Joseph *et al.*, 2014). Ekspresi β- 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 Borisy, 2003).

Dalam respon imun, aktin memiliki fungsi sebagai regulator kunci yang berperan dalam mengatur keberhasilan respon imun (Jonsson., 2012). β -aktin memiliki fungsi dalam sistem pertahan 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 β-aktin (Buxbaum *et al.*, 2014)

Gambar diatas merupakan salah satu visualisasi remodeling aktin yang menunjukkan terjadinya perubahan bentuk. Pada sel B, *remodelling* β-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 aktifasi sel T adalah MHC. β-aktin berperan dalam pengaturan pengangkutan molekul MHC ke membran sel (Chow *et al.*, 2002). Kurangnya ekpresi β-aktin akan berdampak pada kurang efektifnya presentasi MHC dan akhirnya mengurangi prentasi antigen ke sel T (Vascotto 2007).

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah klorofil mikroalga laut *N. oculata* yang diujikan secara klinis pada ikan Kerapu Tikus. Hal ini dilakukan untuk mengetahui efek dari pemberian materi nabati unntuk meningkatkan system imun yang dilihat dari munculnya beta actin. Klorofil didapatkan dari isolasi protein mikroalga laut *N. oculata* mengunakan metode pelarutan klorofil dengan aseton dan dibuktikan dengan SDS-PAGE dan uji kuantitatif dengan Spektrofotometer. Ikan Kerapu Tikus yang digunakan sebagai hewan uji adalah berukuran ± 13-15 cm yang berasal dari BBAP Situbondo.

3.2 Alat dan Bahan

Pada penelitian ini menggunakan alat dan bahan sebagai berikut

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain: autoklaf, inkubator, timbangan analitik, tabung reaksi, cawan petri, magnetik stirrer, disecting set, jarum ose, pembakar bunsen, pipet tetes, beaker glass, erlenmeyer, pH meter, DO meter, mortar, laminary air flow, sentrifuge suhu ruang, sentrifuge 4°C, eppendorf 1,5 ml, falcon 15 ml dan 50 ml, mikropipet 2, 20, 200, dan 1000, chamber dot blot, seperangkat westem blot, thermocycer, blue tip, yellow tip, white tip, seperangkat elektroforesis vertikal *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE), Deckglass, coverglass, nanodrop spektrofotometer, shaker inkubator, freezer -20 dan -80 °C, tabung nitrogen cair, refrigator 4°C, mikro plate V-bottom, spuit 1 cc "X26G, sarung tangan karet (gloves), masker, alumunium foil, hot stirer plate, aquarium, heater, seperangkat aerasi, baki/nampan.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Mikroalga laut (N. oculata), ikan Kerapu Tikus (C. altivelis), air kolam, tissue, alumunium foil, H_2SO_4 , $N_2S_2O_3$, Amilum, MnSO $_4$, NaOH+KI, kertas label, kertas alas, tali, Tryptic Soy Agar (TSA), poliakrilamide, phosphate Buffer Saline (PBS), separating gel 12,5 % dan stacking gel 4%, running buffer, staining (Commassie briliant blue) dan destaining (methanol: asam asetat glasial aquades 1:2:7), Ethylenediamine tetra-acetate (EDTA), nitrocelulosa (membran selovan), aquades, alkohol 70%, Sukrosa, DTT (dithiotreitol), Tris-HCI, aquabidest, es batu, Bradford konsentrat, NaCl 0,9%, ethanol, buffer phospat, buffer ekstrak, PBS Tween, PBS skim, larutan NOG 0,005%, larutan pouncou, Marker (PRO-STAINTM Prestained Protein Marker).

3.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Darmono dan Hasan (2002), menyebutkan bahwa metode eksperimen adalah hasil kajian empiris dan menggunakan analisis dengan bantuan statistik untuk menguji hipotesis. Metode eksperimen dalam penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan pengaruh FPP pada *N. oculata* yang diberikan pada Ikan Kerapu Tikus sebagai kandidat antiviral VNN. Metode penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan memberikan FPP dengan dosis yang berbeda pada ikan Kerapu Tikus.

3.4 Teknik Pengambilan Sampel

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

3.4.1 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 ada 3 macam, yaitu:

1. Metode Survey

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

2. Metode Observasi

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

3. Metode Eksperimen

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

metode ini, peneliti dapat mengatur atau memberikan perlakuan tertentu pada suatu variabel.

3.4.2 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 penelitian ini.

3.5 Prosedur Penelitian

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,
- Kompor 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 ± 15 menit,
- Kompor 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.

3.5.1 Kultur Mikroalga

Pelaksanaan kultur mikroalga laut *N. oculata* dilakukan di BBAP (Balai Budidaya Air Payau) Situbondo selama 1 minggu pengkulturan. Memiliki beberapa tahap di dalam laboratorium dan kultur intermediet yaitu

A. Kultur Laboratorium

1. Kultur agar atau kultur di plate/petridish (tanpa aerasi)

Kultur agar diawali dengan sterilisasi alat dan pembuatan media agar yang sudah diberi pupuk PA(*Pro Analis*) kemudian disterilisasi menggunakan *Autoclave* kemudian dituang ke petridish steril ¾ bagian. Setelah media agar membeku dilakukan inokulasi menggunakan metode gores, atau metode pipet). Phytoplankton yang ditanam biasanya akan tumbuh setelah dua minggu (tergantung species yang ditanam).

2. Kultur test tube (tanpa aerasi)

Kulturan agar yang sudah tumbuh dapat dipindahkan kekulturan testube, dengan cara media steril dipupuk dengan dosis 1m/liter. pupuk yang digunakan adalah pupuk PA. Untuk species diatom menggunakan pupuk diatom dan untuk species Chlorophyceae menggunakan pupuk Walne. Sebelum melakukan kultur terlebih dahulu diambil satu coloni dari media agar dan diberi air laut steril kemudian dicek dibawah mikroskop, apabila steril tidak ada kontaminasi maka dikultur ditest tuber. Untuk sebuah test tube diberi media air laut steril yang sudah dipupuk ¾ bagian kemudian diberi bibit satu koloni. Mikroalga akan tumbuh minimal 7 hari (seminggu)

3. Kultur erlenmeyer (tanpa aerasi)

Hasil kulturan test tube selanjutnya dapat dijadikan bibit (*starter*) pada kulturan erlenmeyer tanpa aerasi, disiapkan media air laut yang sudah dipupuk dengan dosis 1 ml/liter kemudian diberi bibit. Lama kulturan 6-7 hari untuk species *Nannochloropsis sp* dan 3-4 hari untuk species diatom.

4. Kultur erlenmeyer/ stoples 1-2 liter (aerasi)

Sterilisasi media dengan cara direbus hingga mendidih kemudian dituang ke dalam wadah dan ditutup rapat. Setelah dingin dilengkapi peralatan aerasi, dipupuk dengan dosis 1ml/liter (PA), perbandingan bibit dan media adalah 3 : 7, dipertahankan pada suhu 25 °C dan penyinaran menggunakan lampu TL 40 watt 2 buah dan inkubasi 5-7 hari

5. Kultur carboy / stoples 10 liter (aerasi)

Sterilisasi media menggunakan kaporit 10 ppm dan dinetralkan dengan thiosulfat ≤ 5 ppm Setelah netral dipupuk dengan dosis 1ml/liter (PA), perbandingan bibit dan media adalah 3 : 7, dipertahankan pada suhu 25 C danpenyinaran menggunakan lampu TL 40 watt 2 buah dan inkubasi 5-7 hari.

B. Kultur intermediate

Air laut disterilisi menggunakan kaporit 10 ppm dan dinetralkan dengan thiosufat 5 ppm, lama sterilisasi min 24 jam. Sebelum dilakukan pemberian bibit terlebih dahulu diberi pupuk TG (*Tehnical Growth*) dengan dosis 1 ml/l. Untuk species diatom menggunakan pupuk diatao (TG) kalau untuk species Chlorophyceae menggunakan pupuk Walne (TG). Perbandingan penggunaan bibit dan media adalah 3 :7. Kultur dilakukan pada ruangan semi outdoor dengan atap fiber tembus cahaya matahari Dan lama inkubasi 5-7 hari

3.5.2 Proses Ekstraksi Klorofil Mikroalga

A. Menyiapkan Sampel

- Dilakukan pemanenan pada fase kultur intermediet dengan mengendapkan mikroalga dalam bak dengan dibantu larutan NaOH+KI (soda api) agar lebih mudah mikroalga itu mengendap ke bawah bak pengkulturan
- Air laut dalam bak kemudian dibuang dan disisakan mikrolaga *N.oculata* kemudian diletakkan dalam plastic
- Mikroalga yang sudah didapatkan kemudian disaring menggunakan kertas saring hingga terpisah antara air dan endapannya
- Setelah endapan diperoleh diletakan pada falcon 15 ml untuk dilakukan sentrifugase 4000rpm selama 10 menit untuk memisahkan air laut dan pellet mikroalga
- Kemudian pellet diletakkan pada falcon 50 ml untuk disimpan pada lemari pendingin -80°C.

B. Proses Ekstraksi Klorofil

Pada ekstraksi klorofil mikroalga *N. oculata* menggunakan Aseton dengan rincian perlakuan yaitu:

- Sampel dikeluarkan dari lemari pendingin -80°C dan ditunggu hingga menjadi suhu ruangan.
- Kemudian sampel mikroalga ditimbang pada timbangan analitik sebanyak 5
 gr kemudian diletakkan pada alumunium foil
- Setelah diimbang, sampel diletakkan kedalam mortar dan diberi Nitrogen cair hingga menjadi kaku hal ini dilakukan untuk memberikan kejutan kepada dinding sel mikroalga N. oculata
- Setelah itu mikroalga di gerus menggunakan alu hingga warna berubah dan tidak kaku kembali.
- Kemudian diberi aseton 80% sebanyak 60 ml ke dalam mortar kemudian dihomogenkan hingga antara aseton dan mikroalga tercampur
- Setelah itu didiamkan selama 15 menit dengan ditutup menggunakan alumunium foil seluruh permukaan mortar agar aseton mampu mengikat klorofil yang ada di dalam mikroalga
- Disaring menggunakan kertas saring hingga mendapatkan filtrat dari mikroalga *N. oculata* dan diletakkan di dalam falcon 50 ml
- Dilakukan pengukuran kandungan klorofil total dengan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 480 nm, 646 nm, dan 663 nm

3.5.3 Pengukuran Klorofil

Pengukuran klorofil ini dilakukan secara kuantitaif dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-VIS dengan tujuan melihat absorbansi pada panjang gelombang tertentu dari klorofil total yang didapatkan pada hasil ekstraksi diatas. Panjang gelombang yang akan diukur yaitu 646 nm dan 663 nm. Setelah didapatkan nilai absorbansi dari spektrofotometer kemudian kandungan klorofil dihitun.

Kandungan klorofil dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

Klorofil total (mg/L) =
$$\frac{(17,3 \times A646) + (7,18 \times A663)}{(100 \times A480 - 3,27 \times klorofil a) - 104 \times klorofil b)}$$
 (Harborne, 1987) = $\frac{(100 \times A480 - 3,27 \times klorofil a) - 104 \times klorofil b)}{(100 \times A480 - 3,27 \times klorofil a) - 104 \times klorofil b)}$

Ket : A645 = absorbansi pada panjang gelombang 645 nm

A663 = absorbansi pada panjang gelombang 663 nm A480 = absorbansi pada panjang gelombang 480 nm

3.5.4 Elektroforesis Protein SDS-PAGE (Sodium deodecyl poliakrilamide gel electrophoresis)

Fatchiyah (2011), menyatakan prosedur Elektroforesis protein dengan SDS-

PAGE adalah sebagai berikut:

A. 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.

B. 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 μl SDS 10%. Tabung ditutup, lalu digoyang cecara perlahan.
- Dimasukkan 75 μl APS 10%. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan.
- Dimasukkan 6,25 μl TEMED. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan.
- Dituangkan larutan kedalam plate pembentuk gel menggunakan mikropipet 1
 ml (jaga jangan sampai terbentuk gelembung udara) sampai batas yang terdapat pada plate.
- Secara perlahan, tambahkan aquades di atas larutan gel dalam plate agar permukaan gel tidak bergelombang.
- 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 μl SDS 10%. Tabung ditutup, lalu digoyang cecara perlahan.
- Dimasukkan 30 µl APS 10%. Tabung ditutup, lalu digotang secara perlahan.
- Dimasukkan 5 µl TEMED. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan.

C. 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 µl (yang kandungan proteinnya minimal 0,1 g dan maksimal 20-40 g) secara hati-hati ke dalam dasar sumur gel menggunakan Syringe Hamilton.
- Bilas syringe sampai 3x dengan air atau dengan running buffer sebelum dipakai untuk memasukkan sampel yang berbeda pada sumur gel berikutnya.

1. 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.
- 2. Pewarnaan (Stainning) 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 solusion sambil digoyang selama kurang lebih15 menit. Setelah itu, tuang kembali larutan staining pada wadahnya.
- c. Cuci dengan air beberapa kali. Setelah itu, rendam gel dalam larutan 50 ml destaining solusion 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 selam 30 menit.
- Larutan fiksasi di tung 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.

3.5.5 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.

3.5.6 Uji Invivo Pada Ikan

A. Aklimatisasi Ikan

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 kolam. Pakan diberikan secara *adlibitum* yaitu pemberian pakan sedikit demi sedikit sampai ikan kenyang.

Tujuan dari pemberian pakan secara *adlibitum* untuk menghindari adanya pengendapan sisa pakan yang tidak dimakan pada dasar kolam sehingga mengakibatkan kolam ikan akan mengalami penurunan kualitas air utamanya oksigen terlarut. Pemberian pakan dilakukan pada jam 08.00 dan 15.00 WIB. Selain itu setiap harinya dilakukan pengukuran parameter kualitas air seperti suhu, salinitas, pH dan oksigen terlarut untuk menjaga agar kondisi lingkungan ikan kerapu tikus tetap terjaga.

B. Uji in-vivo Fragmen Pigmen Protein pada Kerapu Tikus

Pengujian dilakukan dengan metode sonde dengan bantuan selang feeding tube sebanyak 6 kali yang dilakukan selama 6 kali yaitu pada hari ke-0, ke-6, ke-9, ke-14, ke-19, dan ke-24. Masing-masing dosis yang diberikan yaitu pada hari ke-0 (306 μ l), ke-6 (315 μ l), ke-9 (322 μ l), ke-14 (326 μ l), ke-19 (345 μ l) dan ke-24 (351 μ l). Pemberian dosis FPP mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Yanuhar (2011).

Dosis FPP yang diberikan berbeda pada setiap penyondean, yaitu dengan mengitung dosis stok FPP yang sudah diperoleh dari hasil spektofotometri dengan dibandingkan pada berat ikan. Pemberian FPP disesuaikan dengan berat badan ikan. Perhitungan dosis ini dilakukan untuk

mendapatkan hasil yang optimal dalam melakukan penelitian, diharapkan ikan yang digunakan masih dapat menerima FPP yang diberikan sehingga dapat digunakan atau dimanfaatkan sebagai materi hayati didalam tubuh untuk meningkatkan sistem imun pada ikan.

Ikan yang sudah dipelihara dan diberi perlakuan, dibedah untuk dianalisa organnya, yaitu organ hati ikan Kerapu Tikus.. Analisa organ menggunakan metode SDS-PAGE, Western blotting, dan Imunohistokimia.

C. Uji in-vivo VNN pada kerapu tikus

Penginfeksian VNN pada Kerapu Tikus menggunakan metode oral, yaitu pakan berupa ikan rucah yang disisipi daging ikan yang sebelumnya sudah positif VNN. Penginfeksian dilakukan pada hari ke-14 atau setelah penyondean FPP yang ke-4 dan diberikan secara berkala 2 kali sehari sampai hari ke 24 dengan dosis yang disesuaikan dengan berat bada ikan. Pengamatan dilakukan setiap jam untuk melihat perubahan tingkah laku mulai dari normal sampai abnormal atau gejala spesifik seperti berenang yang tidak beraturan.

3.5.7 Isolasi Protein Organ Ikan

lkan kerapu tikus yang sudah diberi perlakuan, lalu dilakukan pembedahan. hati yang menjadi organ target dalam penelitian ini diambil sebanyak 0,5 gr, kemudian digerus dengan menggunakan mortar. Penggerusan dilakukan di atas es selama 10 menit, kemudian ditambah buffer ekstrak (CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH:8), 20 mM EDTA, 14 M NaCl) sebanyak 500 μl. Kemudian digerus lagi 5 menit, dan disentrifuse 12.000 rpm selama 10 menit dengan kondisi suhu 4 °C. Setelah selesai supernatan diambil dan disimpan pada suhu 4 °C sampai dilakukan analisa berikutnya.

3.5.8 Imunohistokimia (IHC)

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

- Melakukan preparasi jaringan organ yang dipapar imunogenik
- Melakukan deparafinasi preparat dengan xilol 20 μm selama ± 5 menit
- Melakukan dehidrasi dengan alkohol absolut sebanyak 2 kali ulangan pada konsentrasi 90%, 80% dan 70% masing-masing selama 5 menit
- Membilas preparasi dengan dionize water 20 μm sebanyak 3 kali ulangan, masing-masing 5 menit
- Menyimpan preparasi dalam refrigerator (overnight)
- Membilas preparat dengan PBS pH 7,4 20 µm sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit
- Menginkubasi preparat dengan H₂O₂ 3% selama 10 menit
- Blocking unspesifik protein dan inkubasi dalam 5% PBS dengan 1-2% BSA
- Menyiapkan antibodi primer yang dilarutkan dalam larutan blotto dengan perbandingan 1:1000
- Mencuci dengan antibodi primer antibodi monoclonalβ-aktin (AC-15), (1:1000) overnight 4°C
- Preparat kemudian dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masingmasing 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 kembali dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit
- Menggunakan kromagen DAB selama 20 menit
- Preparat kembali dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing 5
 menit
- Memberikan counterstain dengan majer hemotoxilen selama 10 menit
- Membilas preparat dengan DH₂Osebanyak 3 kali ulangan masing-masing selama 5 menit
- Mengeringkan preparat dengan cara diangin-anginkan
- Mengamati preparat hasil pewarnaan IHK dibawah mikroskop okuler dengan perbesaran 40x
- Mengambil gambar hasil IHK dengan menggunakan olympus digital camera
- Hasil

4. HASIL DAN PEMBAHASAAN

4.1 Kultur Mikroalga N. occulata

Pengkulturan mikroalga *N. oculta* dilakukan di BBAP Situbondo, dengan durasi pengkulturan 1- 2 minggu, tergantung dengan sinar matahari yang membantu proses fotosintesis dan pemberian pupuk sebagai suplai makanan mikroalga *N. oculat.* Pengkulturan mikroalga ini dilaksanakan di dalam dan di luar labortorium BBAP situbondo. Pada tahapan Laboratorium terdapat 3 proses yaitu kultur awal atau biasa di sebut kultur agar, kultur murni 1, dan kultur murni 2. Sedangkan pada tahapan diluar laboratorium terdapat kultur Intermediet dan Kultur masal, namun pada penelitian ini hanya sampai pada kultur Intermediet. Hal ini karena, jumlah yang dibutuhkan pada penelitian ini hanya sebanyak 1 ton kultur mikroalga yang hasilkan pada 1 kolam pada proses klutur Intermediet.

Hal ini sama yang dilakukan pada penelitian yang dilakukan oleh (Octhreeani & Soedarsono, 2014) Kultur secara semi massal menggunakan bibit yang berasal dari kultur skala laboratorium. Pengkulturan menggunakan skala laboratorium menggunakan erlenmeyer ukuran besar dengan volume 1,5-2 L, dengan memberikan air laut yang sudah steril dan mencampurkannya dengan iodin. Tujuan diberikannya iodin untuk membunuh sel bakteri yang masih terdapat dalam air laut lalu biarkan sampai air laut tidak berbau, kemudian menambahkan bibit yang telah disaring. Sebelum dikultur kembali dilakukan penyaringan dengann kertas saring untuk memisahkan kotoran atau fitoplankton yang sudah mati menggumpal. Erlenmeyer diberi aerasi dengan volume yang besar, agar dapat menstabilkan suhu dan zat hara yang tersedia. Kultur secara semi massal sama halnya dengan pengkulturan skala laboratorium, perbedaan terletak pada wadah yang

digunakan skala semi massal. Wadah yang digunakan adalah aquarium ukuran semi massal 100 L yang dikonversikan menggunakan skala kecil menjadi 50 L. Awal kultur langkah pertama yang dilakukan dengan memasukan air *treatment*, kemudian bibit hasil dari skala laboratorium disebar, lalu diberi pupuk yang berbeda jenisny a pada masing-masing wadah yang tersedia.

Pada saat pengkulturan yang dilakukan di laboratorium pertama pembuatan media agar yang dilakukan di dalam petridish yaitu kultur awal untuk dilakukan budidaya bertingkat. Kultur awal atau kultur agar ini dilakukan untuk menumbuhkan bibit awal mikroalga menggunakan inokulasi teknik gores. Proses ini memakan waktu 2 minggu untuk menumbuhkan bibit mikroalga *N. oculata* dalam media agar tersebut.



Gambar 8. Pembuatan media agar pada kultur awal (Dokumentasi pribadi, 2015)

Proses selanjutnya adalah kultur murni 1 yaitu pengkulturan dilakukan pada toples 1-2 liter Pada tahap ini, sanitasi media (air laut) dilakukan dengan cara merebus hingga mendidih kemudian dituang kedalam wadah dan ditutup rapat. Tujuannya untuk menghindari tumbuhnya plankton jenis lain dan berbagai virus atau bakteri. 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 21-25°C dan penyinaran menggunakan lampu TL 40 watt 2 buah dan diinkubasi selama 5-7 hari.



Gambar 9. Pengkulturan pada toples 1-2 liter (Dokumentasi pribadi, 2015)

Setelah melalui proses murni 1, selanjutnya kultur murni 2 dengan media toples 10 liter dengan perlakuan sama dengan toples 1-2liter. Setelah di sterilisasi 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 ≥ 5 ppm. Setelah pH media netral dilakukan pemindahan bibit kedalam media dengan perbandingan antara bibit dan media sebesar 3 :7. Setelah itu, ditambahkan pupuk walne dan vitamin dengan dosis 1 ml/liter. Suhu dikondisikan sebesar 21-25°C dengan penyinaran menggunakan lampu TL 40 watt.



Gambar 10. Pemberian pupuk dan vitamin mikroalga (Dokumentasi pribadi, 2015)

Pada Proses yang terakhir yaitu kultur Intermediet atau semi masal Sanitasi dapat dilakukan dengan menggunakan chlorine dengan dosis 30 ppm (30 g/ton air). Pada umumnya bak budidaya diisi air sebanyak 85-90% dari kapasitas. Air disanitasi dengan menggunakan chlorine 30 ppm selama 6 jam. Setelah chlorine dimasukkan, air diaerasi sampai chlorine tercampur rata diseluruh badan air dan setelah itu aerasi dimatikan. Untuk menetralkan chlorine, air diberi Na–thiosulfate 10 ppm dan diaerasi kuat. 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 11. N. oculata pada saat media kultur intermediet (Dok. Pribadi, 2015)

Kultur semi *outdoor* yang dapat mencapai volume 60-100 liter. Kultur *outdoor* merupakan tahapan kultur selanjutnya yang dimulai dari volume 1 ton hingga lebih dari 20 ton, tergantung besar kecilnya skala pembenihan. Prinsip kultur fitoplankton yang menggunakan proses bertingkat dari volume kecil ke volume yang lebih besar disebut dengan kultur bertingkat (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995). Achmad,

(1993) mengatakan, keberhasilan budidaya *N. oculata* sangat ditentukan oleh kemurnian, kepadatan awal, pupuk, kualitas air, intensitas cahaya, suhu, pH, dan salinitas serta sanitasi dan higienis. Kemurnian *N. oculata*. Ditentukan oleh penanganan yang bersih, penggunaan peralatan yang steril serta kultur dengan dosis pupuk yang tepat sehingga dapat digunakan sebagai bibit dalam kultur skala besar yang merupakan makanan bagi rotifer dan ikan budidaya.

4.2 Isolasi Crude Protein

Sebelum dilakukan proses isolasi Crude protein pada mikroalga laut *N. oculata* yang dikultur dari BBAP Situbondo, Jawa Timur. *N. oculata* dibudidayakan dalam wadah dengan volume 5.000 liter, diambil mikroalga saja dengan cara mengendapkan menggunakan NaOH + KI kemudian setelah itu air laut dibuang disisakan mikroalga yang berwarna hijau pekat. Setelah itu hasil panen disaring dengan kertas saring dan dipadatkan dengan menggunakan sentrifus 4000 rpm untuk memisahkan air laut yang tersisa dan padatan mikroalga *N. oculata* sehingga menghasilkan *N. oculata* dalam bentuk padatan sebanyak ± 1250 gram.



Gambar 12. (a) Penyaringan mikroalga (b) sentrifuse 4000 rpm untuk memisahkan padatan dan air laut yang masih tersisa (Dok. Pribadi, 2015)

Untuk menjaga kualitas sel mikroalga, padatan tersebut dimasukan kedalam beberapa falcon steril dengan volume 50 ml dan disimpan dalam *deepfreezer* -80°C, seperti pada gambar 13. Penyimpanan pada suhu -80°C menurut Day (2007) dapat menjaga kualitas sel-sel mikroalga.



Gambar 13. Padatan mikroalga disimpan pada falcon 50 ml (dok. Pribadi, 2015)

4.2.1 Klorofil dan Karotenoid

Isolasi klorofil dilakukan bersama dengan isolasi karoten dengan menggunakan Aseton sebagai pelarut klorofil dan karotenoid yang ada didalam mikroalga *N. oculata.* Menurut Sahbana *et al.*, (2015) Aseton dipilih karena memenuhi syarat sebagai pelarut yaitu tidak mengadsorpsi radiasi pada panjang gelombang pengukuran sampel. Langkah awal mikroalga dikeluarkan dari lemari pendingin -80°C yang dismpan untuk menghindari sampel mikroalga membusuk.

Sampel mikroalga *N. oculata* ditimbang pada timbangan analitik sebanyak 5 gr kemudian diletakkan pada alumunium foil. Setelah diimbang, sampel diletakkan kedalam mortar dan diberi nitrogen cair hingga menjadi mikroalga menjadi kaku hal ini dilakukan untuk memberikan kejutan kepada dinding sel mikroalga *N. oculata* sehingga dinding sel mampu membuka. Setelah itu mikroalga di gerus menggunakan alu hingga warna berubah dan tidak kaku kembali hal ini dilakukan

agar memecah sel dari mikroalga *N. oculata*. Seperti pernyataan Bintang (2010), pemecahan sel secara mekanik dapat dilakukan dengan metode solid shear atau pemecahan padatan, metode pemecahan sel (tanaman, yeast dan bakteri) ini dapat dilakukan dengan cara menggerus bersama nitrogen cair di dalam mortar.





(a) (b) **Gambar 14.** (a) Penggerusan mikroalga *N. oculata* (b) Pemberian nitrogen cair ke dalam mortar (Dok. Pribadi, 2015)

Kemudian diberi aseton 80% sebanyak 60 ml ke mortar dihomogenkan hingga aseton dan mikroalga tercampur ini dilakukan untuk melarutkan klorofil dan karetenoid yang ada didalam mikroalga. Setelah itu didiamkan selama 15 menit dengan ditutup menggunakan alumunium foil seluruh permukaan mortar agar aseton mampu melarutkan klorofil yang ada di dalam mikroalga. Kemudian setelah didiamkan larutan aseton dan mikroalga tersebut disaring menggunakan kertas saring hingga mendapatkan filtrat dari mikroalga *N. oculata* dan diletakkan di dalam falcon 50 ml.



Gambar 15. (a) pendiaman dengan alumunium foil dalam Penyaringan untuk memisahkan endapan dengan filtrat (b) Filtrat mikroalga *N. oculata* (dok. Pribadi, 2015)

Langkah berikutnya hasil isolasi klorofil di analisa secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 480nm untuk analisis karetenoid, panjang gelombang 646 nm dan 663 nm untuk analisis klorofil secara kuantitatif.

4.2.2 Fragmen Pigment Protein (FPP)

Untuk isolasi FPP (fragmen pigmen protein) mikroalga memiliki kesamaan dengan isolasi klorofil yaitu setelah dikeluarkan dari lemari pendingin kemudian dibiarkan hingga suhu yang ada didalam falcon menjadi sama dengan suhu ruang 20°C (thawning). Langkah selanjutnya penggerusan yang diawali dengan menimbang N. oculata seberat 10 gr, untuk selanjutnya ditambahkan nitrogen cair yang berfungsi untuk memberi kejutan pada sel agar mulut sel membuka sehingga pada saat penggerusan dinding sel N. oculata ini dapat terpecah. Setelah itu N. oculata digerus dengan menggunakan mortar dan alu sampai benar-benar halus. Setelah halus kemudian ditambakan Glisin + KCL sebanyak 7 ml. Pemberian glisyn + KCL ini bertujuan sebagai pelarut, selanjutnya proses penggerusan sampel dilakukan selama satu jam sampai mikroalga berwarna berwarna pucat.



Gambar 16. Penggerusan dan pemberian Glysin + KCL ke mortar mikroalga (Dok. Pribadi, 2015)

Setelah itu, hasil penggerusan sampel dimasukkan kealam eppendorf steril berukuran 2 ml yang selanjutnya akan dilakukan proses sentrifuge. Setelah itu dilakukan proses sentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm, selama 10 menit dengan suhu 4°C. Setelah proses sentrifuge selesai, dipisahkan antara supernatan cairan yang berwarna bening dan pellet yaitu endepan yang ada di eppendorf. Setelah melakukan proses sentrifuge, hasil supernatan yang didapat lalu dilakukan proses pengukuran konsentrasi protein menggunakan nanodrop-spectrophotometry UV-VIS. Pengukuran konsentrasi whole protein (kadar protein total dalam mikroalga) dengan nanodrop-spectrophotometry menggunakan 3 panjang gelombang yaitu 260, 280 dan 320 dan hasil konsentrasi protein *N. oculata* sebesar 5,649 mg/l.





(a) (b) **Gambar 17.** (a) Proses sentrifuse dingin (b) Hasil supernatant dari sentrifuse dingin (Dok. Pribadi, 2015)

Semua proses ini juga sama dengan penielitian yang dilakukan oleh Fatiyah (2011), menyatakan bahwa Untuk menganalisa protein yang ada di dalam sel tersebut, diperlukan prosedur fraksinasi sel yaitu :

- a. Memisahkan sel dari jaringannya,
- b. Menghancurkan membran sel untuk mengambil kandungan sitoplasma dan organelnya serta
- c. Memisahkan organel-organel dan molekul penyusunnya.

Prosedur (1) dan (2) dinamakan homogenasi dapat dilakukan dengan menggunakan alat yang paling sederhana seperti homogeniser atau mortal sampai alat yang paling mutakhir seperti pemakaian vibrasi dan sonikasi tergantung pada bahan yang akan dihomogenasi. Prosedur (3) dilakukan dengan menggunakan sentrifus dengan kecepatan dan lama sentrifugasi tertentu.

4.3 Analisis Mikroalga N. oculata FPP

4.3.1 Analisis Kuantitatif

Analisis kuantitatif protein biasanya dilakukan untuk melihat kisaran atau kadar dari crude protein. Alat yang digunakan pada analisis kuantitatif ini adalah spektrofotometer dengan panang gelombangtertentu tergantung dengan enis protein dalam suatu sampel. Untuk satuan hasil pengukrannya dinyatakan dalam mg protein/mL sampel, g protein/ mL sampel, atau dalam satuan ppm tergantung dari satuan yang dipakai pada saat membuat kurva standart (Widyarti, 2011).

Pada analisis kuantitaif dengan klorofil diukur menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan tujuan melihat absorbansi pada panjang gelombang tertentu dari klorofil total yang didapatkan pada hasil ekstraksi yang

sudah dilakukan. Panjang gelombang yang akan diukur yaitu 646 nm dan 663 nm dan 480 nm.

Maka didapatkan hasil yaitu pada pengukuran di panjang gelombang 646 nm 0,1293, pada panjang gelombang 663 nm yaitu 0,2556 dan pada panjang gelombang 480 yaitu 0,3531. Dengan demikian didapatkan hasil analisis kuantitatif pada kandungan essential mikroalga pada tabel dibawah ini yaitu :

Tabel 3. Kandungan Essential Mikroalga N. oculata

β- karoten (mg/l)	Klorofil a (mg/l)	Klorofil b (mg/l)	Klorofil total (mg/l)
0.7102	2.230	1.7749	4.0720

Jika dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Sahbana *et al.*, (2015) didapatkan kandungan klorofil a paling tinggi sebesar 27 mg/mL. Nilai pada kandungan esential yang didapatkan dari mikroalga *N.oculata* sangat sedikit hal ini disebabkan pengaruh oleh beberapa factor yaitu proses pemecahan dinding sel yang tidak optimal, tingginya tingkat kontaminasi pada sample atau ketidakmurnian pelarut yang digunakan. Hal ini juga dinyatakan dalam penelitian yang dilakukan oleh (Harnadiemas, 2012) yang menyatakan kemurnian dari pelarut merupakan salah satu factor yang menjadi penentu pada analisis kuantitatif karena akan mempengaruhi zat terlarut yang didalamnya.

Seharusnya pada mikroalga *N. oculata* memiliki kandungan klorofil yang tinggi karena merupakan salah satu jenis alga hijau yang dapat melakukan proses fotosintesis. *N. oculata* termasuk jenis alga yang dapat berfotosintesis karena memiliki klorofil a, dan yang paling khas dari organisme ini adalah memiliki dinding sel yang terbuat dari komponen selulosa (Rusyani, 2012). Menurut (Fachrullah, 2011) *N. oculata* juga dilaporkan memiliki sejumlah kandungan pigmen dan nutrisi

seperti protein (52,11%), karbohidrat (16%), lemak (27,64%), vitamin C (0,85%), dan klorofil A (0,89%).

Menurut (Hosikian *et al.*, 2010) Klorofil dan turunannya digunakan secara luas dalam produk farmasi. Klorofil mampu mempercepat penyembuhan luka lebih dari 25% yang ditemukan dalam beberapa penelitian. Klorofil mampu merangsang pertumbuhan jaringan, yang fungsinya juga mencegah kemajuan bakteri dan mempercepat proses penyembuhan luka. Klorofil memiliki struktur kimia yang sama dengan hemoglobin dan diperkirakan memiliki cara yang sama dalam merangsang jaringan pertumbuhan yaitu melalui fasilitasi yang cepat karbon dioksida dan pertukaran oksigen.

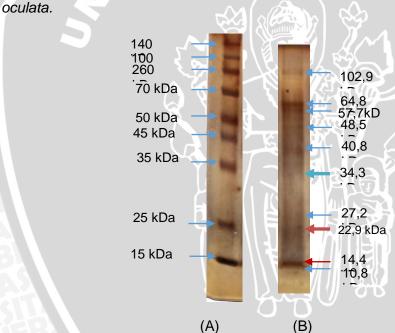
Stimulasi sel dalam host dan percepatan konsekuen dalam pembentukan jaringan pada tubuh. Selain itu, dari beberapa penelitian klorofil ditemukan dapat menghilangkan bau dari luka yang merupakan salah satu sifatnya penangkal racun, antibakteri dan deodorizing. Konsumsi buah dan sayuran telah dikaitkan dengan penurunan risiko kanker karena Fitokimia ini dalam makanan ini, terutama klorofil dan turunannya, terbukti mampu dalam pencegahan kanker karena klorofil ini mampu meningkatkan kegiatan antioksidan dan antimutagenik. kegunaan yang paling signifikan dari klorofil adalah derivatif dalam pencegahan kanker seperti perangkap dari mutagen dalam saluran pencernaan.

4.3.2 Analisis Kualitatif

Analisis kualitatif pada mikroalga *N. oculata* menggunakan metode SDS-PAGE yaitu suatu metode yang umum digunakan untuk memisahkan molekul yang bermuatan atau dibuat bermuatan sesuai dengan berat molekulnya. Elektroforesis ini bekerja dengan menggunakan matriks berupa gel poliakrimida untuk pemisahan

sampel proteinnya. Metode ini yang digunakan untuk memisahkan antara mikroalga N. oculata dengan Fragmen Pigmen Proteinnya. Metode Sodium Dodesyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) digunakan untuk membuktikan bahwa hasil dari ekstraksi mikroalga laut N. oculata yang didapatkan adalah FPP. Terdapat dua macam cairan pewarna / staining untuk elektroforesis SDS-PAGE yaitu Comassie Brilliant Blue dan Silver Stain atau pewarnaan perak nitrat.Pewarnaan ini fungsinya untuk memvisualisasikan pita-pita protein yang terbentuk pada gel hasil elektroforesis.

Berikut ini merupakan gambar hasil SDS-PAGE dari ekstraksi mikroalga N.



Gambar 18. (A) Marker (PRO-STAIN[™]), (B) Hasil Elektroforesis Pita *Crude* Protein *N. oculata* dengan *SDS-PAGE* (Sumber : Laporan Penelitian Unggulan PT-BOPTN, 2015)

Hasil Elektroforesis Pita Protein *N. oculata SDS-PAGE* dengan pewarnaan Silver Stain dan setelah dilakukan perhitungan Berat Molekul (BM) untuk pita protein dari FPP *N.oculata* adalah sebanyak 2 pita protein dengan berat molekul masingmasing yaitu 22,9 kDa dan 14,4 kDa. Dari hasil diatas diduga *N. oculata* memiliki 2

jenis FPP yaitu *Violaxanthin Chlorophyll protein* (VCP) dan *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP). Indikasi tersebut didasarkan pada beberapa penelitian protein mikroalga bahwa protein dengan berat molekul 22 kDa merupakan VCP (Sukenik *et al.*, 1992 dan Basso *et al.*, 2014), dan 14 kDa merupakan PCP (Weis *et al.*, 2002).

Duncan dan Klesius (1996) dalam Junita (2002), telah mengevaluasi pengaruh protein alga terhadap peningkatan respon kekebalan ikan Chanel Catfish (Ichtaluruas punctatus). Dari dasar inilah Pirenoid digunakan sebagai bahan imunostimulan untuk merangsang kekebalan tubuh ikan terhadap penyakit infeksi. Sedangkan menurut Hirschberg, et al. (1997) dalam Fasya (2013), mengatakan bahwa peridinin pada tumbuhan dan alga mempunyai peran penting pada reaksi fotosintesis dan juga terlibat dalam proses transfer energi. Selain digunakan untuk menangkal radikal bebas dan meningkatkan kekebalan tubuh, karotenoid juga mampu mengurangi resiko kanker.

4.4 Uji In vivo pada Ikan Kerapu Tikus

Setelah dilakukan isolasi pada FPP mikroalga *N. oculata*, dilakukan pengujian kepada ikan kerapu tikus dengan cara oral (metode sonde) yaitu metode memasukan FPP melalui mulut ikan. Ikan kerapu tikus yang digunakan berukuran ± 13-15 cm, dipilih ikan kerapu tikus dengan ukuran tersebut karena pada ukuran ini ikan tergolong dalam fase larva, dimana ikan belum mempunyai sistem imun yang sempurna.

Pengujian in-vivo FPP pada ikan kerapu tikus dilakukan selama 27 hari. Ikan uji menggunakan kerapu tikus dengan berat tubuh yang digunakan rata-rata 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 μl), hari ke-6 (315 μl),hari ke-9 (322 μl), hari ke-14 (326 μl), hari ke-19 (345 μl) dan hari ke-24 (351 μl).

Berdasarkan pengamatan yang dilakukan pada penelitian ini, terdapat perbedaan respon yang diberikan pada ikan kontrol, ikan + FPP, ikan + VNN, dan ikan + VPP + VNN. Secara makroskopis dapat dilihat dari respon terhadap gerakan dan pakan, warna tubuh dan tingkat kematian. Hasil pengamatan tersaji pada tabel dibawah ini.

Tabel 4. Performa atau respon ikan selama pemeliharaan

Perlakuan	Aktivitas	Warna	On ikan selama Respon	Pertumbuhan	Keterangan
		Tubuh			9
Ikan Kontrol	Aktif berenang hampir di seluruh kolom akuarium	Cerah	Responsif terhadap gerakan dan pakan	Penambahan berat Total (23,2 gr), sedangkan Perhari (0,97 gr)	Normal
Ikan + FPP	Aktif berenang hampir di seluruh kolom akuarium, terkadang bergerombol di aerasi	Cenderung putih cerah keabu-abuan	Responsif terhadap gerakan dan pakan	Penambahan berat Total (12 gr), sedangkan Perhari (0,50 gr)	Normal
Ikan + VNN	Berenang di dasar akuarium dan sering bergerombol di aerasi	Cenderung Gelap, coklat tua agak hitam	Kurang responsif dan nafsu makan menurun, terjadi <i>Whirling</i>	Ikan mati pada minggu ke-2	Serangan VNN menimbulkan kematian pada minggu ke-2
Ikan + FPP + VNN	Aktif berenang hampir di seluruh kolom akuarium, terkadang bergerombol di aerasi	Putih keabu- abuan	Kurang responsif terhadap gerakan, akan tetapi respon pakan normal	Penambahan berat Total (8,8 gr), sedangkan Perhari (0,37 gr)	Pertumbuhan berat cendrung lebih kecil karena infeksi virus

Tabel 4 tersebut menyatakan bahwa terjadi perbedaan respon dan performa ikan pada setiap perlakuan.Pada ikan kontrol ikan dalam kondisi normal, hal tersebut dilihat dari aktivitas berenang yang aktif pada hampir semua kolom akuarium, warna tubuh yang cerah dan respon yang baik terhadap gerakan dan juga pakan. Selain itu data pertumbuhan juga normal yaitu 0,97 gr/hari. Berbeda dengan hasil pengamatan perlakuan yang lain. Pada perlakuan ikan dengan penambahan FPP tidak terjadi perbedaan aktivitas pada ikan, hanya saja warna yang sedikit berubah dan pertumbuhan yang lebih kecil dibandingkan ikan kontrol.Hal ini diindikasikan karena perlakuan pemberian FPP yang dilakukan dengan metode sonde yang sedikit membuat ikan menjadi stres. Menurut Yokoyama *et al.*, (2006) menyatakan bahwa stress pada ikan akan berdampak terhadap menurunnya laju pertumbuhan pada ikan.

Pada perlakuan ikan dengan penginfeksian VNN memberikan perubahan yang cukup signifikan. Hal tersebut dapat dilihat dari aktifitas ikan yang lebih sering berada di dasar, warna yang gelap, respon yang menurun pada gerakan maupun pakan, dan kematian akhirnya terjadi ikan pada minggu ke-2 pemeliharaan.Perubahan performa tersebut merupakan dampak dari serangan virus pada ikan. Beberapa penelitian menyatakan, serangan virus ini akan berdampak terhadap menurunnya nafsu makan, berenang terbalik dan berdiam di dasar kolam (Roza et al., 2002), dan kemudian terjadi kematian (Roza et al., 2003). Sedangkan menurut Bovo et al., (1999) menyatakan serangan VNN akan berdampak terhadap abnormalnya tingkahlaku dan gangguan penglihatan yang diakibatkan kerusakan sistem saraf pusat dan retina, seperti nekrosis, vakuolasi, dan adanya granulat pada jaringan mata.

Pada perlakuan ikan dengan pemberian FPP dan diinfeksi dengan VNN memperlihatkan ikan yang masih bisa dikatakan dengan kondisi normal.Hal tersebut dilihat dari aktifias berenang ikan, warna, dan respon terhadap pakan.Selain itu meskipun ikan diinfeksikan VNN ikan bisa bertahan sampai akhir masa pemeliharaan.Kondisi ini diasumsikan pemberian FPP mampu mebentuk sistem imun yang baik, dan ketika terjadi serangan VNN ikan mampu bertahan.Yang tampak juga pada perlakuan ini adalah pertumbuhan berat badan yang lebih kecil dari ikan kontrol dan ikan pemberian FPP saja.Ini merupakan dampak serangan VNN dan ikan memanfaatkan energi yang dimiliki untuk pembentukan gen-gen antivirus, sehingga dapat mempengaruhi laju pertumbuhan.Menurut Mcloughlin dan Graham (2007) serangan virus pada ikan dapat berdampak terhadap perilaku, asupan makanan dan pertumbuhan. Pada saat terjadi infeksi, ikan mampu mengeliminasi virus akan tetapi akan berdampak terhadap terganggunya pertumbuhan (Heidari, *et al.*, 2015).

4.5 Hasil Uji Imunohistokimia (IHC) PCP *N. oculata* Terhadap Organ Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*)

Imunohistokimia adalah metode untuk mendeteksi protein di dalam sel suatu jaringan dengan menggunakan prinsip pengikatan antara antibodi dan antigen pada jaringan hidup. Dalam penelitian ini menggunakan metode IHK tidak langsung, atau disebut *indirect method* yang menggunakan dua jenis antibodi yaitu primer dan sekunder. Antibodi primer (tidak berlabel) berfungsi untuk mengenali antigen yang diidentifikasi pada jaringan antibodi primer yang digunakan adalah antibody monoclonal β-actin (AC-15), sedangkan antibody sekunder berfungsi untuk berikatan dengan antibodi primer antibody yang digunakan adalah anti mouse

conjugate pajotin. Menurut Hasdianah *et al.*, (2014), IHK digunakan untuk mendeteksi keberadaan antigen spesifik didalam suatu sel jaringan dengan mengunakan prinsip pengikatan antara antibodi dengan antigen pada jaringan hidup.

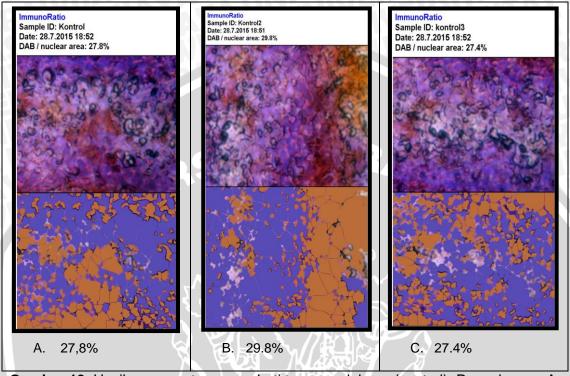
Imunohistokimia merupakan metode yang digunakan untuk mendeteksi tempat asal jaringan antigen menggunakan spesifik antibodi. Reaksi dari antigenantibodi dapat dilihat dengan munculnya warna cokelat pada area sel positif dan warna biru pada area sel negatif. Citra sel pulasan imunohistokimia mempunyai 4 elemen, yaitu inti sel positif, inti sel negatif, bukan sel utama (limfosit), dan jaringan ikat (Rohandi, 2012).

Pada penelitian ini menggunakan Organ perlakuan yaitu Hati ikan Kerapu Tikus. Organ Hati dipilih karena hati pada ikan merupakan bagian terpenting yang berfungsi mensekresikan bahan untuk proses pencernaan. Organ ini merupakan suatu kelenjar kompak berwarna merah kecoklatan tersusun oleh sel hati (hepatosit) yang sangat erat kaitannya dengan fungsi dari empedu (Fujaya, 2008).

Untuk perlakuan ada 4 macam yaitu Organ tanpa perlakuan (Kontrol). Organ perlakuan VNN, Organ perlakuan FPP dan Organ perlakuan VNN+FPP. Tahap analisa data yang digunakan dalam imunohistokimia, mengacu pada tehnik yang digunakan oleh Ramadhani, *et al.* (2012), yaitu menggunakan *ImmunoRatio* (IR). IR digunakan secara bebas secara *on line* maupun *off line* untuk menganalisis citra digital hasil pewarnaan IHK.

Perlakuan pertama yaitu Organ tanpa perlakuan atau kontrol merupakan organ ikan yang tanpa diberikan perlakuan FPP maupun VNN. Pengamatan ini dilakukan dengan tujuan untuk melihat profil β-aktin pada ikan normal pada umumnya.

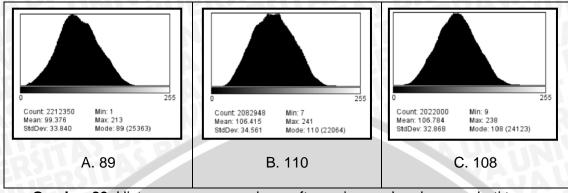
Berikut ini hasil IHK dari organ tanpa perlakuan atau kontrol bisa dilihat pada gambar dibawah ini.



Gambar 19. Hasil pengamatan organ hati tanpa perlakuan (control), Pengulangan A. *ImmunoRatio* I, B. *ImmunoRatio* II B. *ImmunoRatio* III

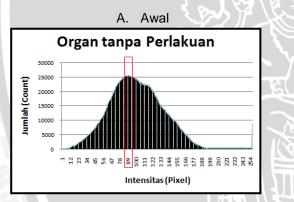
Jika dilihat dari gambar diatas, organ hati tanpa perlakuan atau kontrol masih dalam kondisi yang normal, dapat dilihat dari penampakan sel-sel jaringan dalam kondisi normal. Terdapat 3 kali pengulangan yaitu analisa *ImmunoRatio* I pada ikan kontrol didapatkan prosentase nilai DAB adalah 27,8 %, *ImmunoRatio* II prosentase DAB sebesar 29,8% dan *ImmunoRatio* III adalah 27,4 %. Nilai DAB menunjukkan bahwa keberadaan gen target β-aktin pada ikan kontrol rata-rata sebesar 28,33 % ditunjukkan dengan adanya warna orange yang berarti bahwa adanya ikatan antara antigen dengan antibodi yang diberikan.

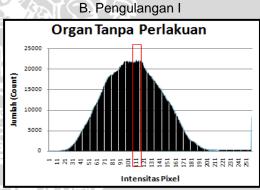
Sedangkan untuk grafik histogram dengan menggunakan software imageJ pada organ tanpa perlakuan (Kontrol) dapat dilihat pada gambar dibawah ini



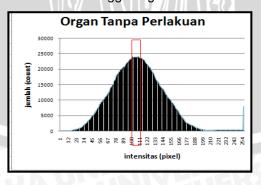
Gambar 20. Histogram menggunakan software image J pada organ hati tanpa perakuan (kontrol)

Gambar 20 diatas merupakan hasil image J dari organ hati tanpa perlakuan (kontrol) yang menunjukan data secara kuantitatif melalui nilai mode yang muncul pada histogram gambar diatas. Berikut ini gambar intensitas ekspresi gen target β-aktin pada organ hati tanpa perlakuan (kontrol) disajikan dalam bentuk grafik:





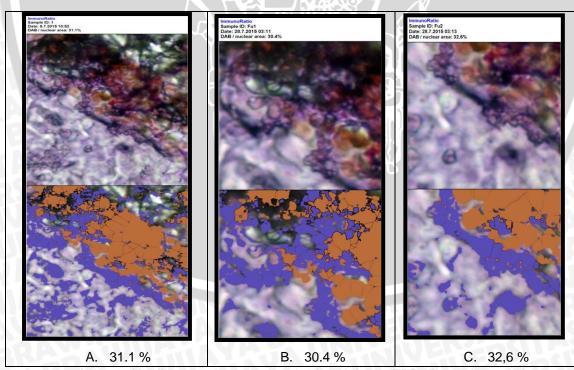
C. Penggulangan II



Gambar 21. Keterikatan antigen-antibodi dengan intensitas gen target β-aktin yang muncul pada organ hati tanpa perlakuan

Gambar 20a Pengulangan I menunjukan nilai mode sebesar 89, gambar 20b pengulangan II nilai mode 110, dan gambar 20c pengulangan III nilai mode sebesar 108. Gambar diatas menggambarkan aktifitas gen target β-aktin pada organ hati tanpa perlakuan pada grafik 1 diatas menunjukan kisaran intensitas yang positif semua pada awal hingga pengulangan II. 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 disini didasarkan pada intensitas pixel, angka 0 mewakili angka paling gelap/pekat, sedangkan 255 menunjukan angka rendah terbagi dalam 4 zona, yaitu 0-60 positif kuat, 61-120 positif, 121-180 positif lemah, dan 181-235 negatif,

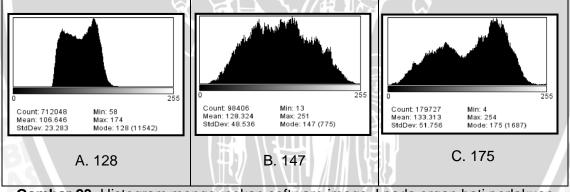
Perlakuan yang kedua adalah Organ hati perlakuan FPP, merupakan organ hati yang diberikan perlakuan Crude protein yaitu FPP mikroalga *N. oculata*. Berikut ini adalah hasil IHK yang bisa dilihat pada gambar dibawah ini



Gambar 22. Hasil pengamatan organ hati perlakuan FPP, Pengulangan A. ImmunoRatio I, B. ImmunoRatio II B. ImmunoRatio III

Pada organ hati ikan perlakuan pemberian *crude protein* FPP mikroalga *N. oculata*, dapat dilihat bahwa tampak terdapat perbedaan jika dibandingkan dengan hasil profil organ hati ikan tanpa perlakuan (kontrol). Pada gambar 22 diatas terlihat bahwa hasil DAB *ImmunoRatio* I sebesar 31,1 %, *ImmunoRatio* II sebesar 30,4 % dan *ImmunoRatio* III sebesar 32,6 %. Pada gambar diatas terlihat adanya warna kuning kecoklatan atau warna orange yang cukup banyak, yang menandakan peningkatan dari ikatan antara antigen dengan antibodi yang diberikan. Hal tersebut menyatakan bahwa pada organ hati perlakuan pemberian *crude protein* FPP mikroalga *N. oculata* terdapat ekspresi β-aktin rata-rata sebesar 31,36%.

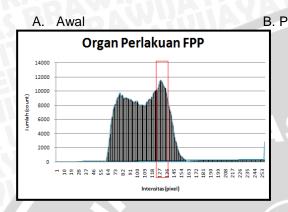
Sedangkan untuk grafik histogram dengan menggunakan software imageJ pada organ perlakuan pemberian *crude protein* berupa FPP dari mikroalga *N. oculata* dapat dilihat pada gambar dibawah ini

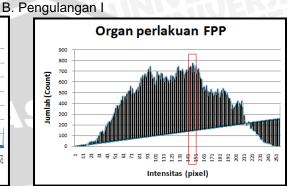


Gambar 23. Histogram menggunakan software image J pada organ hati perlakuan *crude protein* FPP mikroalga *N. oculata*

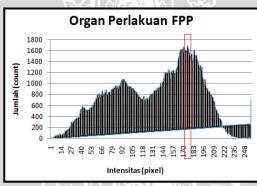
Gambar 23 diatas merupakan hasil image J dari organ hati perlakuan *crude protein* FPP mikroalga *N. oculata* yang menunjukan data secara kuantitatif melalui nilai mode yang muncul pada histogram gambar diatas. Gambar 23a Pengulangan I menunjukan nilai mode sebesar 128, gambar 23b pengulangan II nilai mode 147, dan gambar 23c pengulangan III nilai mode sebesar 175.

Berikut ini gambar intensitas ekspresi gen target β-aktin pada organ hati perlakuan pemberian *crude protein* berupa FPP dari mikroalga *N. oculata* menggunakan imageJ jika disajikan dalam bentuk grafik





C. Pengulangan II

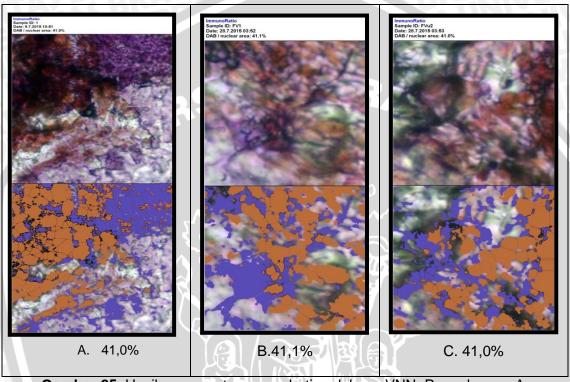


Gambar 24. Keterikatan antigen-antibodi dengan intensitas gen target β-aktin yang muncul pada organ hati perlakuan *crude protein* FPP mikroalga *N. oculata*

Gambar diatas menggambarkan aktifitas gen target β-aktin pada organ hati perlakuan *crude protein* FPP mikroalga *N. oculata* pada gambar 24 diatas menunjukan kisaran intensitas yang positif lemah semua pada awal hingga pengulangan II. Berarti *crude protein* FPP mikroalga *N. oculata* mampu menjadi *inducer* dalam meningkatkan ekspresi β-aktin yang dibuktikan dengan meningkatnya nilai prosentase DAB pada organ ikan perlakuan pemberian FPP jika dibandingkan dengan nilai DAB pada organ hati ikan kontrol yaitu rata-rata sebesar 31,36%.. Pada

gambar 23 menunjukkan bahwa keberadaan gen target β-aktin juga dalam kategori positif lemah karena berdapat pada titik 128-175.

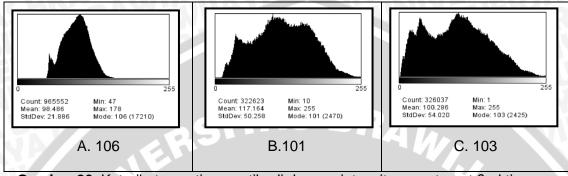
Kemudian pada perlakuan ketiga yaitu organ hati dengan pemberian virus VNN, berikut ini adalah hasil IHK yang bisa dilihat pada gambar dibawah ini



Gambar 25. Hasil pengamatan organ hati perlakuan VNN, Pengulangan A. *ImmunoRatio* I, B. *ImmunoRatio* II B. *ImmunoRatio* III

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. Pada gambar 25 diatas terlihat bahwa hasil DAB *ImmunoRatio* I sebesar 41,0 %, *ImmunoRatio* II sebesar 41,1 % dan *ImmunoRatio* III sebesar 41,0 %. Dari analisa diatas juga menunjukkan bahwa tubuh ikan dapat merespon kehadiran VNN dengan memberikan respon berupa peningkatan ekpresi β-aktin jika dibandingkan dengan prosentase yang didapatkan pada perlakuan kontrol dan perlakuan pemberian FPP.

Berikut ini gambar yang menunjukan untuk grafik histogram dengan menggunakan software imageJ pada organ perlakuan pemberian VNN dapat dilihat pada gambar dibawah ini

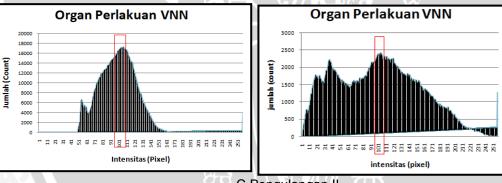


Gambar 26. Keterikatan antigen-antibodi dengan intensitas gen target β-aktin yang muncul pada organ hati perlakuan VNN

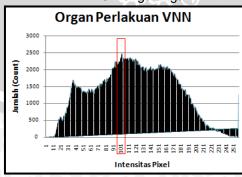
Berikut ini gambar intensitas ekspresi gen target β-aktin pada organ hati perlakuan VNN menggunakan *imageJ* jika disajikan dalam bentuk grafik.



B. Pengulangan I



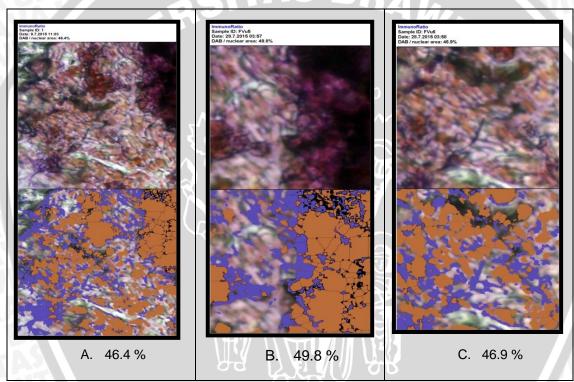
C.Pengulangan II



Gambar 27. Keterikatan antigen-antibodi dengan intensitas gen target β-aktin

Jika dilihat pada gambar 26 menunjukkan bahwa keberadaan gen target β -aktin juga dalam kategori positif karena berdapat pada kisaran mode sekitar 101-106. Artinya pada organ hati dengan perlakuan VNN positif terekspresi gen target β -aktin dengan rata-rata sel yang terekspresi sebesar 41,05%.

Pada perlakuan organ hati ikan Kerpu Tikus yang terakhir yakni penggabungan antara pemberian VNN dan *Crude protein* dari FPP dari mikroalga *N. oculata*. Berikut ini adalah gambar hasil *ImunnoRatio* organ perlakuan VNN + FPP

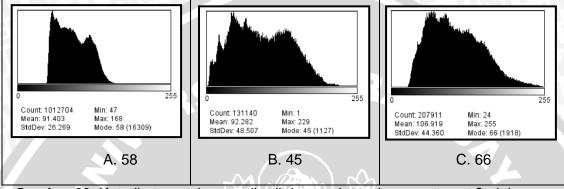


Gambar 28. Hasil pengamatan organ hati perlakuan VNN + FPP, Pengulangan A. ImmunoRatio I, B. ImmunoRatio II B. ImmunoRatio III

Pada gambar diatas menunjukan organ hati dengan perlakuan VNN + FPP mengalami peningkatan prosentase pada setiap *ImmunoRatio*. untuk gambar 28a dengan *ImmunoRatio* I menghasilkan 46,4%, gambar 28b *ImmunoRatio* II menghasilkan prosentase 49,8%, dan gambar 28c *ImmunoRatio* III mengahsilkan

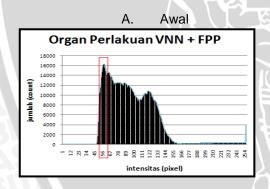
prosentase 46,9 %. Hasil prosentase yang meningkat diakibatkan karena jumlah gen target β-aktin lebih meningkat dibandingkan dengan perlakuan yang lainnya.

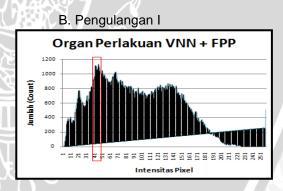
Berikut ini gambar yang menunjukan untuk grafik histogram dengan menggunakan software imageJ

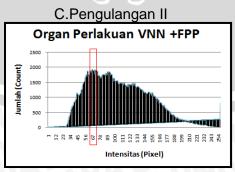


Gambar 29. Keterikatan antigen-antibodi dengan intensitas gen target β-aktin yang muncul pada organ hati perlakuan VNN

Berikut ini gambar intensitas ekspresi gen target β-aktin pada organ hati perlakuan VNN menggunakan *imageJ* jika disajikan dalam bentuk grafik.







ambar 30. Keterikatan antigen-antibodi dengan intensitas gen target β-aktin yang muncul pada organ hati perlakuan VNN

Histogram diatas menunjukan keberadaan gen target β-aktin dengan dibuktikan dengan adanya keterikatan antigen dengan antibodi yang diberikan menunjukan nilai mode 45-66 hal ini masih dalam kisaran positif kuat. Dari grafik diatas menunjukan bahwa organ hati perlakuan FPP dan VNN mampu memunculkan gen target β-aktin dengan rata-rata prosentase sebesar 47,7 % dan menunjukan keterikatan antara antigen dan antibody positif kuat. Keterikatan ini menunjukkan bahwa pemberian FPP dapat meningkatakan respon imun pada ikan yang dapat dilihat dari meningkatnya ekspresi β-aktin ketika VNN menyerang tubuh ikan kerapu tikus. Disini juga dapat dikatakan bahwa pembentukan sistem imun dengan pemberian crude protein FPP dari mikroalga N. oculata berhasil. FPP dari mikroalga N. oculata yang dinduksikan pada ikan kerapu tikus mampu memberikan damapak yang cukup segnifikan terhadap peningkatan ekspresi β-aktin. Terjadinya peningkatan tersebut tidak terlepas dari kandungan yang dimiliki mikroalga N. oculata yaitu PCP yang mampu menjadi biokatalisator dalam pembentukan ekspresi β-aktin. Peningkatan dan perubahan profil β-aktin akan berdampak terhadap perubahan fungsi seluler pada tubuh organisme.

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

4.6 Analisis Data

Analisa data pada penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 3 kali pengulangan. Data yang digunakan dalam penelitian ini adalah data prosentasi DAB β aktin dapa 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. Berikut adalah tabel data hasil penelitian.

Tabel 5. Data Hasil Penelitian

Managa	1E	Perla	kuan		TOTAL
Ulangan	Kontol	FPP (A)	VNN (B)	FPP+VNN (C)	TOTAL
1	27,8	31,1	41,0	46,4	146,3
2	29,8	30,4	41,1	49,8	151,1
3	27,4	32,6	41,0	46,9	147,9
Total	85	94,1	123,1	143.1	445,3

Setelah didapatkan data hasil penelitian seperti yang ditampilkan pada tabel diatas, selanjutnya dilakukan analisa sidik ragam prosentase DAB β-aktin pada setiap perlakuan. Tabel analisa sidik ragam dapat dilihat dibawah ini. Sedangkan perhitungan analisa sidik ragam (ANOVA) dapat dilihat pada lampiran 6.

Tabel 6. Analisa Keragaman (ANOVA) DAB β-aktin setiap perlakuan

SK	DB	JK	KT	FHIT	F tabel 5%
Α	3	712.6692	237.5564	151.0692*	4.07
Galat	8	12.58	1.5725		
Total	11	725.2492			

Ket: A = perlakuan * = berbeda nyata **= berbeda sangat nyata

Berdasarkan analisa sidik ragam diatas, diperoleh hasil F $_{\rm hitung}$ > F $_{\rm tabel.}$ Ini menunjukkan bahwa hasil pemberian perlakuan yang berbeda yaitu pemberian

crude protein berupa FPP dari mikroalga N. oculata, pemberian VNN serta pemberian FPP dan VNN berpengaruh berbeda nyata dengan tingkat ekspresi β -aktin. Hal ini menandakan adanya pengaruh pemberian perlakuan berbeda terhadap jumlah ekspresi gen β -aktin yang ditunjukkan oleh besarnya prosentase DAB. Hal ini karena pemberian perlakuan yang berbeda sehingga jumlah ekspresi gen β -aktin juga berbeda.

Uji BNT (beda nyata terkecil) perlu dilakukan untuk mengetahui bagaimana pengaruh dari pemberian perlakuan yang berbeda terhadap ekspresi β-aktin. Hasil uji BNT pengaruh pemberian perlakuan yang berbeda terhadap ekspresi β-aktin disajikan pada tabel dibawah, sedangkan untuk perhitungan BNT dapat dilihat pada lampiran 7...

Tabel 7. Hasil Uji BNT pengaruh pemberian perlakuan yang berbeda terhadap ekspresi β-aktin

	chopied b aktin							
	Prosentase B Aktin tiap perlakuan		€ Ke	F _y /		FV.	notasi	BNT
١			31.367	28.333	41.033	47.700	Hotasi	5%
N	K	31.367	4	500			Α	
	F	28.333	-3.033*	1	力物自	37-	В	0.40
	V	41.033	9.667*	12.700*		X -	С	2,48
	FV	47.700	16.333*	19.367*	6.667*	夕 -	D	

Ket: K = Kontrol

= Perlakuan Pemberia FPP

V = Perlakuan Pemberia VNN

FV = Perlakuan Pemberia FPP+VNN

Tn = Tidak Nyata

* = Berbeda Nyata

Berdasarkan hasil uji BNT diatas, diperoleh bahwa perlakuan pemberian perlakuan yang berbeda yaiti pemberian FPP, pemberian VNN dan pemberian FPP+VNN berbeda nyata terhadap jumlah prosentase DAB ekspresi β-aktin. Hal ini ditunjukkan oleh nilai selisih prosentase DAB > BNT 5%. Jika dilihat ada tabel

diatas, perlakuan pemberian FPP+VNN merupakan perlakuan yang paling baik diantara perlakuan yang lainnya, karena memilik notasi d.

4.7 Kualitas Air Pemeliharan Ikan Kerapu Tikus

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

4.7.1 Suhu

Menurut Hasrun (2013), suhu dapat mempengaruhi pertumbuhan dan respirasi organisme. Organisme mempunyai kisaran suhu yang sesuai untuk pertumbuhannya. Diperkuat dengan penyataan Kordi (2010), bahwa pengaruh suhu secara tidak langsung adalah mempengaruhi metabolisme, daya larut gas-gas, termasuk oksigen serta berbagai reaksi kimia di dalam air. Semakin tinggi suhu air semakin tinggi pula laju metabolisme ikan Kerapu Tikus, yang berarti semakin besar konsumsi oksigennya padahal kenaikan suhu tersebut mengurangi daya larut oksigen dalam air. Hasil pengukuran suhu selama pemeliharaan pada kolam ikan kerapu ini dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Hasil pengukuran suhu (⁰C) pada kolam ikan Kerapu Tikus.

Hari Penyondean	Aquarium dengan perlakuan					
	Ikan control	Ikan FPP	Ikan VNN	Ikan FPP+VNN		
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		

Hasil pengukuran suhu yang diperoleh dari hasil Peneitian pada kolam ikan Kerapu Tikus yang diberi *N. oculata* berkisar 29°C sampai 31°C. Nilai yang diperoleh konstan dan tidak begitu banyak terjadi perubahan karena terjaganya aerasi sehingga dapat menjaga kualitas air di dalam kolam.

Ikan Kerapu Tikus yang digunakan adalah ikan Kerapu Tikus muda yang memiliki panjang tubuh kurang lebih 15 cm. Amiruddin, *et al.* (2012), pada habitat asli, ikan Kerapu Tikus hidup pada kawasan terumbu karang di perairan – perairan dangkal hingga 100 m di bawah permukaan laut. Kerapu muda hidup di perairan karang pantai dengan kedalaman 0,5 – 3 m dengan suhu 27 - 29°C. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang menunjukkan nilai suhu sesuai untuk pertumbuhan dan keberlangsungan hidup ikan ini.

4.7.2 Salinitas

Pada pengukuran kualitas air salinitas juga perlu diperhatikan. Salintas sendiri dapat didefinisikan sebagai total konsentrasi ion-ion terlarut dalam air. Dalam budidaya perairan salinitas dinyatakan dalam satuan permil (‰) atau ppt (*Part perthousand*) atau g/l. Boyd (1982) *dalam* Kordi, *et al.* (2007), salinitas adalah kadar seluruh ion-ion yang terlarut didalam air. Salinitas berpengaruh terhadap reproduksi,

distribusi dan osmoregulasi (Agus, 2008). Hasil pengukuran salinitas pada kolam pemeliharaan dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Hasil pengukuran salinitas (‰) pada kolam ikan Kerapu Tikus

Hari	Aquarium dengan perlakuan					
penyondean	lkan Kontrol	Ikan FPP	Ikan VNN	Ikan FPP+VNN		
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		

Hasil pengukuran salinitas terlihat pada tabel 5 bahwa nilai salinitas air kolam berkisar antara 29-30‰. Menurut Ammiruddin *et al.* (2012), ikan Kerapu Tikus hidup pada kisaran salinitas 30-33 ‰. Salinitas sangat berpengaruh dalam proses osmoregulasi organisme perairan. Salinitas yang terlalu tinggi ataupun terlalu rendah akan mengakibatkan terganggunya kehidupan biota perairan seperti stress.

4.7.3 Derajat Keasaman (pH)

Perairan yang memiliki kondisi asam akan kurang produktif, dan dapat membunuh hewan budidaya. Hal ini disebabkan pH air mempengaruhi tingkat kesuburan perairan sehingga dapat mempengaruhi kehidupan jasad renik. Pada pH rendah (keasaman yang tinggi) kondisi oksigen terlarut akan mengalami penurunan,hal sebaliknya terjadi pada kondisi basa. Atas dasar ini, maka usaha budidaya perairan akan berhasil baik dalam air dengan pH 6,5-9 dan kisaran optimal adalah 7,5-8,7 (Ghufran, *et al.*, 2007). Hasil pengukuran pH pada kolam pemeliharaan dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Hasil pengukuran pH pada kolam ikan Kerapu Tikus

Hari penyondean	Aquarium dengan perlakuan					
	lkan Kontrol	Ikan FPP	Ikan VNN	Ikan FPP+VNN		
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		

Hasil pengukuran pH pada kolam ikan Kerapu Tikus yang telah diinduksi dengan protein *Nannochloropsis oculata* dari hari ke-0 sampai hari ke-24 hingga tidak mengalami perubahan yang besar yaitu bernilai 7,6-7,9. Hal ini dilakukan untuk menjaga keberlangsungan hidup ikan Kerapu Tikus. pH dengan 7,6-7,9 adalah nilai yang optimal untuk pertumbuhan ikan. Ghufran, *et al.* (2007), menyatakan bila nilai pH lebih dari 6,5-9,0 maka pertumbuhan ikan akan terhambat karena kondisi basa. Sedangkan jika kondisi asam atau kurang dari 6,5 maka ikan akan mengalami gangguan seperti tumbuhnya penyakit akibat bakteri maupun parasit yang menyukai lingkungan asam. Nilai pH dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain aktivitas biologi seperti fotosintesis, suhu, respirasi organisme dan keberadaan ion-ion dalam perairan tersebut.

4.7.4 Oksigen Terlarut

Oksigen terlarut atau DO dalam perairan merupakan salah satu kualitas air yang harus diperhatikan. Oksigen sendiri sangat diperlukan oleh biota air untuk respirasi namun harus dalam keadaan terlarut dalam air. Oksigen merupakan salah satu faktor pembatas, sehingga bila ketersediaan didalam air tidak mencukupi kebutuhan biota budi daya, maka segala aktivitas biota akan terhambat. Oksigen

yang digunakan oleh biota perairan digunakan untuk bahan bakar atau sebagai makanan sehingga dapat menghasilkan aktivitas berenang, pertumbuhan, reproduksi dan sebaliknya. Oleh karena itu, 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.*, 2007). Dengan demikian kekurangan ataupun kelebihan oksigen akan dapat mengganggu kehidupan biota air. Hasil pengamatan oksigen terlarut dapat dilihat pada Tabel 11.

Tabel 11. Hasil pengukuran oksigen terlarut (mg/l) pada kolam ikan Kerapu Tikus

Hari penyondean	Aquarium dengan perlakuan					
	lkan Kontrol	Ikan FPP	Ikan VNN	Ikan FPP+VNN		
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		

Pada Tabel 11 menunjukkan hasil pengukuran oksigen terlarut. Nilai oksigen yang dihasilkan antara rentang 5,3 mg/L - 6,2 mg/L. Apridayanti (2005), menyatakan ikan Kerapu Tikus dapat hidup dengan baik pada konsentrasi oksigen lebih dari 5ppm. Hal ini sesuai dengan nilai pada aquarium pemeliharaan ikan Kerapu Tikus dengan demikian ikan Kerapu mampu tubuh dengan baik. Menurut Sutimin (2006), perubahan oksigen dipengaruhi oleh perubahan temperatur. Untuk temperatur yang tinggi memberikan efek pada turunnya oksigen dan sebaliknya. Maka dari itu adanya aerasi dan suhu yang selalu dijaga merupakan keharusan untuk mempertahankan DO pada angka pertumbuhan yang optimum.

5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah pada analisis kuantitatif didapatkan Kandungan essential yang terdapat pada mikroalga ini adalah klorofil a sebesar 2,230 mg/L, klorofil b sebesar 1,7749 mg/L dan klorofil total sebesar 4,0720 mg/L. Sedangkan pada analisa secara kualitatif pada *crude protein* berupa FPP dari mikroalga yang ditemukan dalam *N. oculata* berupa PCP pada berat molekul 14 kDa dan VCP pada berat molekul 14 kDa. Pemberian Fragmen pigmen protein (FPP) mikroalga *N. oculata* mampu meningkatkan ekpresi β-aktin. Pada ikan kontrol ekpresi β-aktin 27,8%, ikan dengan pemberian FPP 31,1%, ikan dengan penginfeksian VNN 41,0%, dan ikan dengan penginduksian FPP dan penginfeksian VNN sebesar 46,4%. *Peridinin chlorophyll protein* (PCP) yang terkandung dalam *N. oculata* mampu menjadi biokatalisator terekpresinya β-aktin. Peningkatan ekpresi β-aktin dalam penelitian ini menjadi indikator peningkatan respon imun pada ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*).

5.2 Saran

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

DAFTAR PUSTAKA

- Amelia, N., &Prayitno, S. B. (2012). Pengaruh Ekstrak Daun Jambu Biji (Psidiumguajava) Untuk Menginaktifkan Viral Nervous Necrosis (VNN) Padalkan Kerapu Bebek (*Epinephelus fuscoguttatus*), 1, 1–18.
- Amirudin, H, R.K Dongaran, R. Nurhadidan L. Darto. 2012. **Manajemen Induk Ikan Kerapu Tikus ((Cromileptes altivelis)) sebagai Upaya Optimalisasi Produksi telur Berkualitas**. Balai Budidaya Laut Ambon.
- Antoro, S., E. Widiastutidan 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.
- Aslianti, Titiek, Bedjo Slamet dan Gegar Sapta Prasetya. 2012. Aplikasi Budidaya Kerapu Bebek ((Cromileptes altivelis)) di Teluk Ekas Kabupaten Lombok Timur.Bali.
- Balai Budidaya Laut, 2002. **Balai Besar pengembangan Budidaya Laut Lampung**.Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya kementerian Kelautan dan Perikanan. ISSN 0853-4411
- Baratawidjaja, K. G, Rengganis. 2002. Imunologi Dasar. Edisi Kelima. Jakarta. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- ______, 2009. **Imunologi Dasar**.Edisi Kedelapan. Jakarta. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- ______, Karnen Garna dan Iris Rengganis. 2010. **Imunologi Dasar**. Edisi ke-10.Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Basso, S., Simionato, D., Gerotto, C., Segalla, A., Giacometti, G. M., Morosinotto, T. 2014. Characterization of the photosynthetic apparatus of the Eustigmatophycean Nannochloropsis gaditana: evidence of convergent evolution in the supramolecular organization of photosystem I. Biochim. Biophys. Acta Bioenerg., 1837 (2014), pp. 306–314

- Bulanin, Usman. 2003. Perkembangan Larva Ikan Kerapu Bebek (*(Cromileptes altivelis)*) Sampai Umur 50 Hari. Fakultas Perikanan Universitas Bung Hatta Padang.
- Campbell, Neil A.; Jane B. Reece and Lawrence G.Mitchell. 1999. **Biology**. Addison-Wesley,
- Chow, A., Toomre, D., Garrett, W., and Mellman, I. 2002. Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane. Nature418: 988–994
- Darmono dan Hasan A. M. 2002. **Menyelesaikan Skripsi dalam Satu Semester**. PT Grasindo. Jakarta.
- Ernest, Prima 2012, **Pengaruh kandungan ion nitrat terhadap pertumbuhan** *Nannochloropsis oculata*. Fakultas Teknik, Universitas Indonesia.

 Depok, Jakarta
- Effendi, Hefni. 2003. **Telaah Kualitas Air Bagi Pengelolaan Sumber Daya dan Lingkungan Perairan**. Kanisus: Yogyakarta
- Ekawati, arningwilujeng. 2005. **Budidaya Makanan Alami**. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Malang
- Evalawati; Maya meiyanadan T.W. Aditya.2011. Pembesaran Kerapu Macan (Epinephelus fuscogutattus) dan Kerapu Tikus ((Cromileptes altivelis)) di keramba Jaring apung. Departemen Kelautan dan Perikanan. Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya, Balai Budidaya Laut, Lampung
- Fachrullah, M. R. (2011). Laju Pertumbuhan Mikroalga Penghasil Biofuel Jenis *Chlorella* sp. Dan *Nannochloropsi*ssp. yang Dikultivasi Menggunakan Air Limbah Hasil PenambanganTimah di Pulau Bangka.
- Fasya, Arif Habib. 2013. **Efek Inhibitory VNN (Viral Nervous Necrotic)**padaKerapuTikus ((Cromileptes altivelis)) yang diinduksi PCP
 (Peridinin Chlorofil Protein) Halimeda sp melalui Ekspresi MHC I.
 Tesis. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.
- Fatchiyah; Estri L. Arumingtyas; Sri Widyartidan Sri Rahayu. 2011. **Biologi Molekular**. Erlangga: Jakarta

- Fatmah. 2006. **Respon Imunitas yang Rendah Pada Tubuh Manusia usia lanjut**.

 Departemen Gizi Kesehatan masyarakat, fakultas kesehatan Mayarakat, universitas Indonesia, Depok.MAKARA, kesehatan Vol.10 No. 1.
- Fujaya, Yushinta. Fisiologilkan, **Dasar Pengembangan Teknologi Perikanan**. RinekaCipta. Yogyakarta
- Fajriani, Nur N. 2011. Polimorfisme Ikan Kerapu Macan (Ephinephelusf uscoguttatus forsskål) yang Tahan Bakteri Vibrio alginolitycus dan Toleran Salinitas Rendah Serta Salinitas Tinggi. Universitas Hasanudin. Makassar.
- Fauzi, Abdilah, Indah, Raya, Ahyar, & Ahmad. (2012). Pengujian Day Antioksidan Dan Sifat Toksisitas EkstrakCo(li) Turunan Klorofil, (li), 1–8.
- Fretes, H. D., Susanto, a B., Prasetyo, B., &Limantara, L. (2013). Carotenoids From Macroalgae and Microalgae: Health Potential, Application and Biotechnology. *Jurnal Teknologi Dan Industri Pangan*, 23(2), 221–228.
- Gerdelmann, J., & Pawlizak, S., 2009. **Cytoskeleton**. http://www.uni-leipzig.de/~pwm/web/?section=introduction&page=cytoskeleton. Akses 25 Februari 2015
- Harborne, J.B. 1987. Metode Fitokimia. Penerbit ITB Bandung
- Harnadiemas, R. F. (2012). Evaluasi pertumbuhan dan kandungan Esenssial Chlorella vulgaris pada Kultivasi Fotobioreaktor outdoor skala pilot dengan pencahayaan terang gelap alami.
- Hosikian, A., Lim, S., Halim, R., &Danquah, M. K. (2010). Chlorophyll extraction from microalgae: A review on the process engineering aspects.

 International Journal of Chemical Engineering, 2010. http://doi.org/10.1155/2010/391632
- Impra. 2009. Protein. Jurusan Kimia Fakultas Matematikan dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya Malang.
- Jönsson, F., Gurniak, C. B., Fleischer, B., Kirfel, G., Witke, W. 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)

- Isnanstyo, A. Dan Kurniastuti. 1995. **Teknik Kultiur Phytoplankton dan Zooplankton**.Kansius. Jogjakarta. 198 hal.
- Klug, W. S. and M. R. Cummings. 1994. **Concepts of genetics**. 4th ed. Prentice Hall, Englewood cliffs: xvi + 779 hlm
- Kordi. K. M. Ghufran, H., dan A.B. Tancung. 2007. **Pengelolaan Kualitas Air Dalam Budidaya Perairan**. RinekaCipta. Jakarta
- Kordi K., M.Ghufran H. 2001. **Usaha Pembesaran Kerapu di Tambak. Kanisius**.Yogyakarta.111 hal.
- Kurniawan, M., Izzati, M., & Nurchayati, Y. (2010). **Kandungan Klorofil**, **Karotenoid**, **dan Vitamin C** pada Beberapa Spesies Tumbuhan Akuatik, *XVIII*(1).
- Marzuki. 1983. Metodologi Riset. Fakultas Ekonomi. UII Yogyakarta.
- Octhreeani, A. M., &Soedarsono, P. (2014). Pengaruh Perbedaan Jenis Pupuk Terhadap Pertumbuhan *Nannochloropsis* Sp. Dilihat Dari Kepadatan Sel Dan Klorofil A Pada Skala Semi Massal (Vol. 3, pp. 102–108).
- Pollard, T. D., Borisy, G. G. 2003. *Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments*. Cell 112:453–465.
- Rao, S.P.N. 2011. *B cell activation and Humoral Immunity*. JJMMC, Davangere.
- Riyono, S. H. (2007). **Beberapa Sifat Umum Dari Klorofil Fitoplankton**. *XXXII*(1), 23–31.
- Rohandi, Manda. 2012. Penerapan Algoritma Image Adjustment Pada Metode
 WaFuMos Dalam Penentuan Prosentase Positifitas Antigen Citra
 imunohistokimia Pulasan Cokelat. Universitas Gorontalo.
- Rusyani, E. (2012). Molase sebagai Sumber Mikro Nutrien pada budidaya Phytplankton Nannochloropsis sp., Salah Satu Alternatif Pemanfaatan Hasil Samping Pabrik Gula. *Tesis*.
- Sahbana, E., Ni Wayan, S. A., &Syaiful, B. (2015). **Analisis Kandungan Nutrisi Dan Pigmen Mikroalga** *Nannochloropsis* **Sp.**
- Sahbana, E., Ni Wayan, S. A., &Syaiful, B. (2015). **Analisis Kandungan Nutrisi Dan Pigmen Mikroalga Nannochloropsis sp.** https://www.scribd.com/doc/
 11626265. diakses pada tanggal 18 juni 2015 pada pukul 17.00

- Sedjati, S., &Yudiati, E. (2012).**Profil Pigmen Polar dan Non Polar Mikroalga Laut** *Spirulina* sp. dan Potensinya sebagai Pewarna Alami, *17* (September), 5–8.
- Sudaryatma, Putu Eka dan Ni Nyoman Eriawati. 2012. **Histopatologis Insang Ikan Hias Air Laut yang Terinfeksi Dactylogyrus sp.** Balai Karantina,
 Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Denpasar.
 Jurnal Sains Veteriner ISSN: 0126-0421
- Sudarsono, Afik. 2013. Studi In Vivo Treatment Crude Pyrenoid Mikroalga Laut Nanochloropsis oculata Terhadap Ekspresi Tnf-A pada Ikan Kerapu Tikus ((Cromileptes altivelis)). Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.
- Surakhmad, Winarno. 1998. **Pengantar Penelitan Ilmiah (Dasar, Metode dan Teknik)**. Tarsito. Bandung.
- Sukenik, A., Livne, A., Neori, A., Yacobi, Y. Z., Katcoff, D. 1992. Purification and characterization of A light-harvesting chlorophyll-protein complex from the marine eustigmatophyte Nannochloropsis sp. Plant Cell Physiol., 33, pp. 1041–1048.
- Tampubolon, G.H. danMulyadi, E. 1989.**Sinopsis Ikan Kerapu di Perairan Balit Bangka**. Semarang. Hlmn 2.
- Tarsim, Setyawan, A., Harpen, E., &Pratiwi, A. (2013). The Effication Of Black Cummin (Nigella Sativa) As Immunostimulant In Humpback Grouper (Cromileptes Altivelis) Againts Vnn (Viral Nervous Necrosis) Infection, (November), 316–328.
- 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, UniversitatAutónoma 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
- 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, et al., 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.
- Wickramarachchi, D., Argyrios N. T., Dwight H. K. 2010. Immune Pathology Associated with Altered Actin Cytoskeleton Regulation. Department of Immunology & Microbial Science, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA.
- 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 (Dynuphyceae) From the Sea Anemone Anthopleura elegantissima (Cnidaria). J.Phycol. 38, 157 163
- Widyarti, S., Fatchiyah., Estri L. A., Sri, R. 2011. **Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis**. Erlangga: Jakarta
- Yanuhar, U. 2009. Pengaruh Pemberian Bahan Aktif Ekstrak Nannochloropsis oculata Terhadap Kadar Radikal Bebas pada Ikan Kerapu Tikus ((Cromileptes altivelis)) yang Terinfeksi Bakteri Vibrio alginoliticus. Unpublished.
- Yanuhar, U., Nurdiani, R. & Hertika, A.M.S., 2011. Potency of Nannochloropsis oculata as Antibacterial, Antioxidant and Antiviral on Humpback Grouper Infected by Vibrio alginolyticus and Viral Nervous Necrotic., 1, pp.323–330.
- Yanuhar, U. 2015. Effects of Pigment-Protein Fraction from Nannocloropsis Oculata on TNFα and IL-6 which Act as an Anti-Inflammatory Against Viral Nervous Necrosis (VNN) Infection. *Procedia Chemistry*, 14, 437–443. http://doi.org/10.1016/j.proche.2015.03.059
- Yuseff, M. I., A. Reversat, 2011. Polarized secretion of lysosomes at the B cell synapse couples antigen extraction to processing and presentation. Immunity 35(3): 361-374.

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Pertumbuhan Berat Badan Ikan Uji

Perlakuan		Hari Ke- (gr)						Pertumbuhan Total	Rata- rata Per-
	0	4	8	12	16	20	24	Total	hari
Ikan Kontrol	46,0	48,6	50,2	52	56,7	66,8	69,2	23,2	2,65
Ikan + FPP	46,0	48,9	50	51,8	52,5	54,6	58	12,0	3,68
Ikan + VNN	46,0	48,2	49	49,7	-	-	-	-	1,76
Ikan + FPP + VNN	46,0	47,3	48,4	49	51,8	52,7	54,8	8,8	0.59

- A. Penentuan dosis FPP untuk perlakuan pada ikan Kerapu Tikus (Cromileptes altivelis)
- Konsentrasi FPP hasil isolasi dari mikroalga *N. oculata* adalah 5,649 mg/l (5649µg/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

V1 x N1 = V2 x N2
1 ml x 5649
$$\mu$$
g/ml = V2 x 33,3 μ g/ml
5649 = V2 x 33,3 μ g/ml
5649 / 33,3 = V2
0.005894 = V2

Untuk mendapatkan konsentrasi 33,3 µg/ml, dilakukan dengan penambahan Tris HCL 0,5 N dengan pH 8,6 sebanyak 0.0005894 ml.

- Dosis yang diberikan pada setiap penyondean :

Penyondean ke-1	1000 µl / 150 gr 6,666666667 6,66 X 46 306	= V2 / 46 = V2 / 46 = V2 = V2
Penyondean ke-2	1000 µl / 150 gr 6,666666667 6,66 X 47,3 315	= V2 / 47,3 = V2 / 47,3 = V2 = V2

```
Penyondean ke-3
                                      = V2 / 48,4
                    1000 µl / 150 gr
                     6,66666667
                                      = V2 / 48,4
                     6,66 X 48,4
                                      = V2
                                      = V2
                     322
Penyondean ke-4
                    1000 µl / 150 gr
                                      = V2 / 49
                     6,66666667
                                      = V2 / 49
                     6,66 X 49
                                      = V2
                                      = V2
                     326
Penyondean ke-5
                    1000 µl / 150 gr
                                      = V2 / 51,8
                     6,66666667
                                      = V2 / 51,8
                     6,66 X 51,8
                                      = V2
                                      = V2
                     345
Penyondean ke-6
                    1000 µl / 150 gr
                                      = V2 / 52,7
                     6,66666667
                                      = V2 / 52,7
                     6,66 X 52,7
                                      = V2
                     351
                                      = V2
```

- **B.** 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 mg/ml = 320 μg/ml
- Tiap 1 gram daging ikan mengandung protein VNN = 320 / 2 (1 ml/500 μl) = 160 μg/ml
- Dosis uji klinis pada ikan adalah 0,51 mg/ml (510 μg/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 / konsentrasi perotein dalam 1 g (160 μg/ml)

= 1,04 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

 $= 176 / 160 \mu g/ml$

= 1,1 g.

Pada hari ke-19 pemberian pakannya sebanyak 1,10 g RAMINAL

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

= 510/(150/52,7)

= 179,18

 $= 179,18 / 160 \mu g/ml$

= 1,12 g.

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

Lampiran 2. Perhitungan analisa kandungan klorofil dan β-karoten mikroalga

Rumus pengukuran konsentrasi kandungan essential mikroalga N. oculata:

1. Klorofil a $(mg/L) = 12,25 \times A663 - 2.55 \times A646$

2. Klorofil b $(mg/L) = 22.9 \times A646 - 4.64 \times A663$

3. Klorofil a+b (mg/L) = $(17.3 \times A646)+(7.18 \times A663)$

4. β - karoten = $\frac{(1000 \times A480 - 3,27 \times klorofila) - 104 \times klorofila}{}$

Maka didapatkan hasil pengukuran konsentrasi klorofil dan β- karoten adalah

a. Klorofil a = 2,230 mg/mL

b. Klorofil b = 1.7749 mg/mL

c. Klorofil a+b = 4.0720 mg/mL

d. β - karoten = 0,7102 mg/mL

Lampiran 3. Cara Perhitungan Berat Molekul

- a. Menghitung panjang separating gel (cm)
- b. Menghitung jarak pita-pita protein marker dari separating gel (cm)
- c. Menghitung pergerakan masing-masing pita protein marker (Rf) sebagai X dengan rumus :

RF=	Jarak	pita	protein
	Panjang	separat	ting Gel

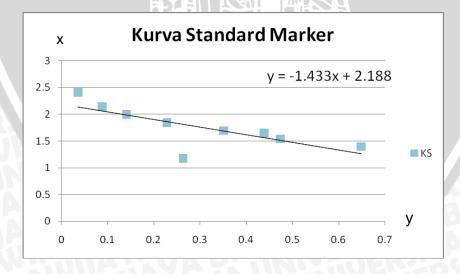
d. Mencari logaritma dari berat molekul protein (Y) dalam marker

BM(kDa)	Log BM (y)	A (cm)	B (cm)	Rf (x)
260	2.414973348	2	57	0.035087719
140	2.146128036	5	57	0.087719298
100	2	8	57	0.140350877
70	1.84509804	13	57 🛇	0.228070175
50	1.698970004	20	57	0.350877193
45	1.653212514	25	57	0.438596491
35	1.544068044	27	57	0.473684211
25	1.397940009	37	57	0.649122807
15	1.176091259	15	57	0.263157895
	260 140 100 70 50 45 35 25	260 2.414973348 140 2.146128036 100 2 70 1.84509804 50 1.698970004 45 1.653212514 35 1.544068044 25 1.397940009	260 2.414973348 2 140 2.146128036 5 100 2 8 70 1.84509804 13 50 1.698970004 20 45 1.653212514 25 35 1.544068044 27 25 1.397940009 37	260 2.414973348 2 57 140 2.146128036 5 57 100 2 8 57 70 1.84509804 13 57 50 1.698970004 20 57 45 1.653212514 25 57 35 1.544068044 27 57 25 1.397940009 37 57

Keterangan = A : panjang band

B: panjang separating

e. Mencari persamaan dari X dan Y



Ket :X = Log berat molekul; Y = Rf

- f. Menghitung Rf untuk masing-masing pita protein sampel
- g. Mencari Y (log BM sampel) dari persamaan diatas
- h. Mencari BM sampel dengan rumus log^Y

Tabel data berat molekul PCP N.oculata

pita	A(cm)	B(cm)	Rf (x)	y= -1,4333x+2,1887	BM Sampel
1	7	57	0.122807	2.012680702	103.0
2	15	57	0.263158	1.811515789	64.8
3	17	57	0.298246	1.761224561	57.7
4	20	57	0.350877	1.685787719	48.5
5	23	57	0.403509	1.610350877	40.8
6	26	57	0.45614	1.534914035	34.3
7	30	57	0.526316	1.434331579	27.2
8	33	57	0.578947	1.358894737	22.9
11	41	57	0.719298	1.157729825	14.4
12	46	57	0.807018	1.032001754	10.8



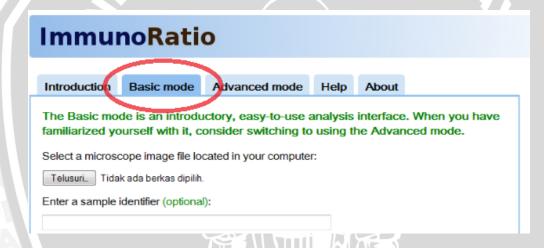
Lampiran 4. Tahapan menggunakan aplikasi IR pada software

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

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



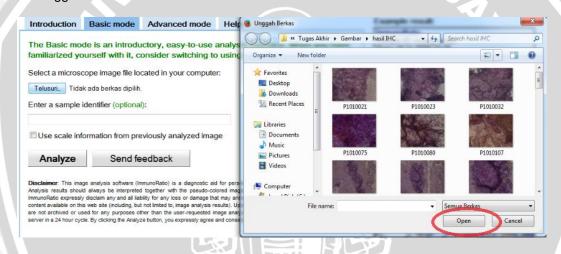
2. Pilih "Basic mode" pada menu pilihan



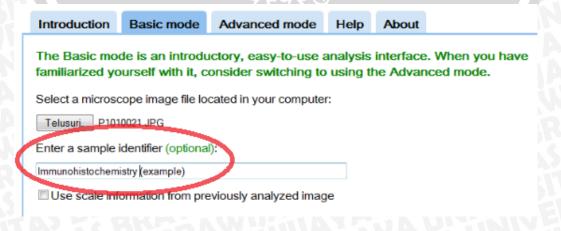
3. Klik "Telusuri" pada menubar untuk mengambil gambar yang akan dianalisa menggunakan aplikasi IR pada PC

Introduction Basic mode Advanced mode Help About The Basic mode is an introductory, easy-to-use analysis interface. When you have familiarized yourself with it, consider switching to using the Advanced mode. Select a microscope image file located in your computer: Telusuri. Tidak ada berkas dipilih. Enter a sample identifier (optional):

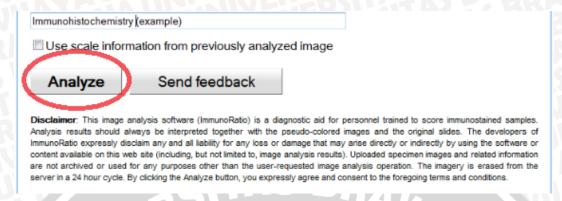
4. Pilih salah satu foto yang akan dianalisa menggunakan aplikasi IR dan Klik "open" pada tab unggah berkas



 Tulis nama yang akan digunakan untuk membedakan antara fota yang telah dianalisa sebelumnya pada kolom "Enter a sample identifier (optional)"



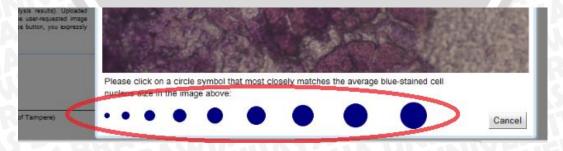
6. Klik "analyze" untuk menunculkan hasil IR



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



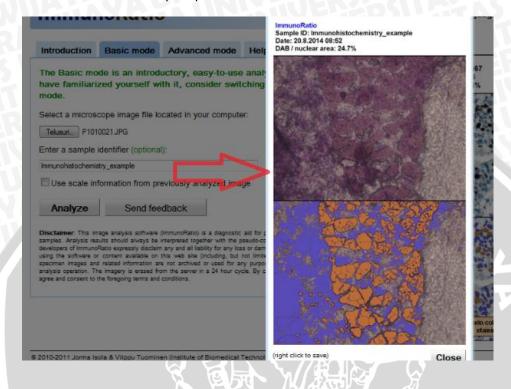
8. Pilih besaran simbol atau scale yang akan digunakan



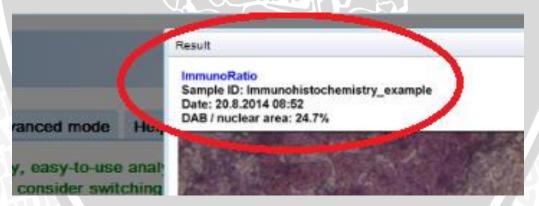
9. Tunggu hasil IR keluar hingga muncul seperti pada gambar dibawah ini



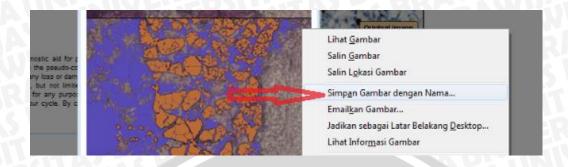
10. Hasil IR akan muncul seperti pada tambilan berikut ini



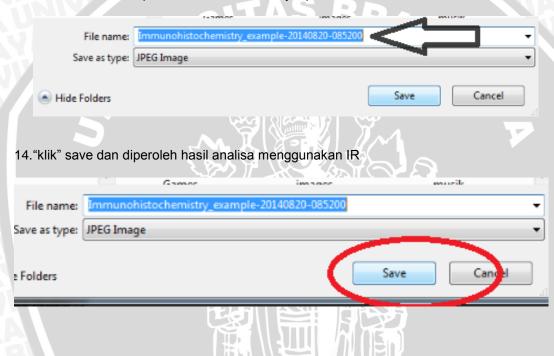
11. Nilai persentasi DAB akan muncul yang menunjukkan positif dan negatif



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



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

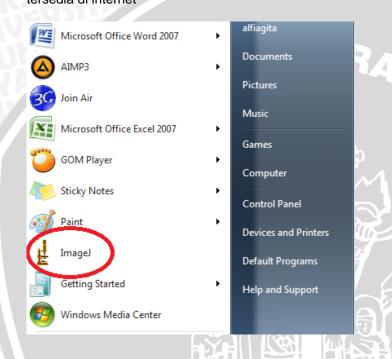


BRAWIJAY

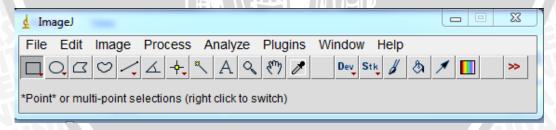
Lampiran 5. Tahapan menggunakan software "imageJ"

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

 Download dan install aplikasi software "ImageJ" yang dapat diperoleh secara gratis yang tersedia di internet



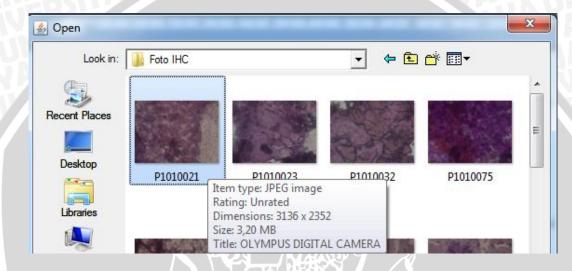
2. Tampilan "ImageJ" dapat dilihat pada gambar dibawah ini



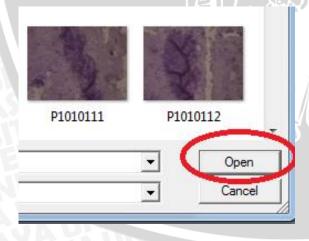
3. Klik "file"dan pilih menu "open" untuk memelih foto yang akan digunakan



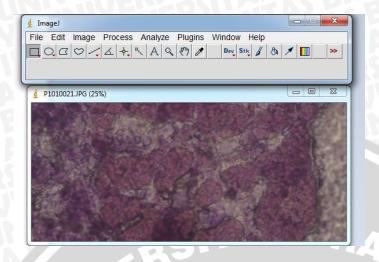
4. Pilih file yang akan digunakan



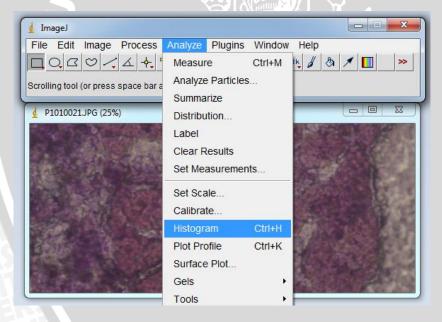
5. Klik "open"



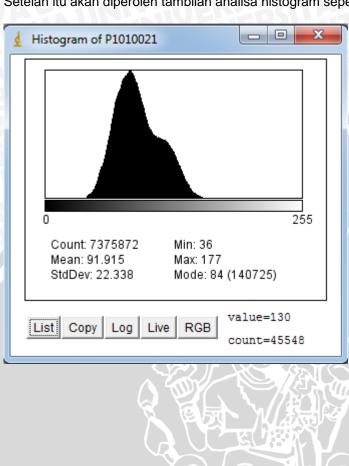
6. Setelah di klik "open" akan muncul tampilan sebagai berikut



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



8. Setelah itu akan diperoleh tambilan analisa histogram seperti tampilan berikut ini



Lampiran 6. Perhitungan Analisa Sidik Ragam dan Uji BNT

Tabel analisa sidik ragam

	VI STE	TOTAL			
Ulangan	Kontol	FPP (A)	FPP (A) VNN (B) FPP+VNN (C)	TOTAL	
1	27,8	31,1	41,0	46,4	146,3
2	29,8	30,4	41,1	49,8	151,1
3	27,4	32,6	41,0	46,9	147,9
Total	85	94,1	123,1	143.1	445,3

$$\begin{array}{lll} a = 4 & & ^*db & & dbp = t-1 & & dbg = t \ (r-1) & & & = 4+1 & = 4(3-1) \\ an = 12 & & & = 12-1 & = 3 & = 8 \end{array}$$
 FK
$$= \frac{r^2}{4\pi^3}$$

$$= \frac{(5A+\sum B+\sum C+\sum K)^2}{4\times 3}$$

$$= \frac{(94.1+123.1+143.1+85)^2}{12}$$

$$= 16524.34$$

$$= (Aa1)^2 + (Aa2)^2 + \dots + (Ak3)^2 - FK$$

$$= (31.1)^2 + (30,4)^2 + \dots + (27,4)^2 - 16524.34$$

$$= 725.2492$$
 JK Perlakuan
$$= \frac{(\sum A^2+\sum B^2+\sum C^2+\sum K^2)}{4\times 3} - FK$$

$$= ((94,1^2 + 123,1^2 + 143,1^2 + 85)/12) - 16524.34$$

AS BRAWIUAL

= 712.6692

JK Galat = JKT - JKP

= 725.2492 - 712.6692

= 12.58

KT (Kuadrat Tengah)

KTP = JKP/dbp = 712.6692/3

= 237.5564

KTG = JKG/dbg = 12.58/8

= 1.5725

f) F hit = KTP/KTG

= 237.5564/1.5725

= 151.0692

Tabel Anova

SK	DB	JK	KT	FHIT	F tabel 5%
Α	3	712.6692	237.5564	151.0692*	4.07
Galat	8	12.58	1.5725		
Total	11	725.2492			

Ket: A = perlakuan

* = berbeda nyata

**= berbeda sangat nyata

Perhitungan Nilai BNT Perlakuan :

$$SED = \frac{\sqrt{2 \text{ KTG}}}{n \text{ (perlakuan)}}$$

$$= \frac{\sqrt{2 \times 1.5725}}{4}$$

= 0.443354

Tabel BNT

BNT 5%	= t tabel 5% x SED							
	= 2,306004 x 0.443354 = 1.022375							
	= 1.0	22375				W		
Tabel BNT					\		4	
Rata-rata β	actin	31.367	28.333	41.033	47.700	notasi	BNT 5%	
31.367		1	MI	WELL.		а		
28.333		-3.033	ジスジン	S JO		b		
41.033		9.667	12.700			7 c	1.187788	
47.700		16.333	19.367	6.667		d		