

**FRAGMEN PIGMEN PROTEIN MIKROALGA LAUT *Spirulina* sp YANG DI UJI
SECARA IN-VIVO PADA IKAN KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*)**

SKRIPSI

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

Oleh :

HENDRA SAPUTRA

NIM. 115080107111006



FAKULTAS PRIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2015

**FRAGMEN PIGMEN PROTEIN MIKROALGA LAUT Spirulina sp YANG DI UJI SECARA
IN-VIVO PADA IKAN KERAPU TIKUS (Cromileptes altivelis)**

LAPORAN SKRIPSI

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

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar Sarjana

**Di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya**

Oleh :

HENDRA SAPUTRA

NIM. 115080107111006



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2015

LEMBAR PENGESAHAN

SKRIPSI

FRAGMEN PIGMEN PROTEIN MIKROALGA LAUT *Spirulina sp* YANG DI UJI
SECARA IN-VIVO PADA IKAN KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*)

Oleh :

HENDRA SAPUTRA

NIM. 115080107111006

telah dipertahankan didepan penguji
pada tanggal 23 Desember 2015
dan dinyatakan telah memenuhi syarat
SK Dekan No. :
Tanggal :

Dosen Penguji I

Prof. Ir. Yenny Risiani, DEA, PhD
NIP. 19610523 198703 2 003

Tanggal: 08 JAN 2016

Menyetujui,
Dosen Pembimbing I

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

Tanggal: 08 JAN 2016

Dosen Penguji II

Andi Kurniawan, S.Pi, M.Eng, D.Sc
NIP. 19790331 200501 2 003

Tanggal: 08 JAN 2016

Dosen Pembimbing II

Dr. Asus Maizar S.H., S.Pi., MP
NIP. 19720529 200312 1 001

Tanggal: 08 JAN 2016



Mengetahui,
Ketua Jurusan MSP

Dr. Arning Wiljeng Ekawati, MS

NIP. 19620805 198603 2 001

Tanggal: 08 JAN 2016



PERNYATAAN ORISINALITAS

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

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

Malang, 23 Desember 2015

Mahasiswa,

HENDRA SAPUTRA
NIM. 115080107111006



RINGKASAN

HENDRA SAPUTRA. Skripsi mengenai FRAGMENT PIGMEN PROTEIN MIKROALGA LAUT *Spirulina* sp YANG DI UJI 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.**

Spirulina sp merupakan mikroalga dari salah satu jenis genus ganggang hijau-biru bersel tunggal yang hidup di laut. Banyak nutrisi yang terkandung didalam *Spirulina* sp, seperti *Fragmen Pigmen Protein* (FPP). Cara untuk memperoleh FPP itu sendiri dengan mengekstrak mikroalga *Spirulina* sp yang dilarutkan kedalam buffer menggunakan teknik manual maupun menggunakan teknologi seperti pemisahan molekul dengan sentrifuge. FPP sebagai agen hayati memiliki fungsi sebagai imunostimulan yang mampu merespon kekebalan non fisik dan fisik pada organisme vertebrata. Kendala yang sering terjadi pada kegiatan budidaya ikan Kerapu Tikus adalah kematian massal yang menyerang ikan pada usia juvenil dan benih. Hal ini dipicu karena ikan belum mempunyai sistem imun secara optimal.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan FPP yang ada di dalam mikroalga *Spirulina* sp serta manfaatnya untuk antivirus VNN (*Viral Nervous Necrosis*) pada Ikan Kerapu Tius (*Cromileptes altivelis*). 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 *Spirulina* sp yang dilanjutkan pada tahapan isolasi FPP *Spirulina* sp, uji profil FPP *Spirulina* sp, uji in vivo FPP pada ikan Kerapu Tikus, pengamatan ekspresi -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 SDS-PAGE FPP *Spirulina* sp terdapat 3 band protein yaitu dengan berat molekul 14,3 kDa, 19,9 kDa, dan 33,4 kDa. Berdasarkan hasil berat molekul yang tampak, dapat diindikasikan bahwa FPP dari mikroalga *Spirulina* sp merupakan *Piridin Chlorophyl Protein* (PCP) 14,3 kDa (Homodimer) dan 33,4 kDa (Moodimer) dan *Phycocyanin* (CPC). 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 -aktin pada organ hati ikan Kerapu Tikus dilakukan dengan menggunakan *immunoratio*. Pada organ hati ikan control tampak warna kecoklatan yang menandakan adanya ekspresi -aktin. Nilai DAB yang muncul pada organ hati ikan kontrol sebesar 35,2%. Pada organ hati ikan perlakuan pemberian FPP didapatkan nilai DAB sebesar 54,3%, ini menunjukkan adanya peningkatan ekspresi -aktin setelah dilakukan penginduksian FPP kedalam ikan. Pada organ hati ikan perlakuan pemberian VNN terdapat peningkatan ekspresi -aktin yang ditunjukkan oleh prosentase DAB sebesar 57,1% 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 α -aktin yang cukup tinggi yaitu sebesar 63,4 %. Hasil yang didapatkan dari SDS-PAGE organ hati ikan uji terdapat 1 band protein yaitu dengan berat molekul 42 kDa. Berdasarkan hasil berat molekul yang tampak, dapat diindikasikan bahwa organ hati ikan uji pada Kerapu tikus merupakan α -aktin. Hasil pengukuran kualitas air yaitu, suhu perairan berkisar antara 28-31°C, salinitas berkisar antara 29-30‰, pH memiliki nilai 8 sedangkan hasil pengukuran oksigen terlarut (DO) memiliki kisaran antara 5,3-6,02 mg/l .

Kesimpulan dari penelitian ini adalah Kandungan FPP yang ditemukan dalam *Spirulina* sp berupa PCP pada berat molekul 14,3 kDa dan 33,4 kDa sedangkan Phycocyanin (CPC) pada berat molekul 19,9 kDa. Pemberian Fragmen pigmen protein (FPP) mikroalga *Spirulina* sp mampu meningkatkan ekspresi α -aktin sedangkan dari hasil profil α -aktin pada ikan uji pada berat molekul 42 kDa. Pada ikan kontrol ekspresi α -aktin 35,2%, ikan dengan pemberian FPP 54,3%, ikan dengan penginfeksi VNN 57,1%, dan ikan dengan penginduksian FPP dan penginfeksi VNN sebesar 63,4%. *Peridinin chlorophyll protein* (PCP) dan Phycocyanin (CPC) yang terkandung dalam *Spirulina* sp mampu menjadi biokatalisator terekpresinya α -aktin. Peningkatan ekspresi α -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 memanfaatkan Fragmen Pigmen Protein mikroalga laut *Spirulina* sp sebagai peningkatan sistem imun Humoral dan Seluler. Dan pengkajian secara biologi molekuler.



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, 23 Desember 2015

Penulis

DAFTAR ISI

RINGKASAN	i
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR GAMBAR.....	vi
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat.....	3
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	3
1.4.2 Manfaat Praktis.....	4
1.5 Waktu dan Tempat.....	4
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Mikroalga <i>Spirulina</i> sp.....	5
2.1.1 Klasifikasi.....	5
2.1.2 Morfologi.....	6
2.1.3 Biologi dan Habitat.....	7
2.1.4 Fase pertumbuhan <i>Spirulina</i> sp.....	8
2.1.5 Faktor Pendukung Pertumbuhan <i>Spirulina</i> sp.....	9
2.2 Fragmen Pigmen Protein <i>Spirulina</i> sp.....	12
2.2.1 Phycocyanin (C-PC).....	13
2.2.2 Mekanisme Pigmen Phycocyanin dalam Sel <i>Spirulina</i> sp.....	15
2.2.3 Mekanisme Pigmen Phycocyanin Dalam Antioksidan.....	16
2.3 Ikan Kerapu Tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>).....	17
2.3.1 Klasifikasi.....	17
2.3.2 Morfologi.....	17
2.3.3 Habitat dan Penyebaran.....	18
2.3.4 Reproduksi.....	19
2.3.5 Kebiasaan Pakan dan Pakan.....	20
2.3.6 Kualitas Air Ikan Kerapu Tikus.....	21
2.4 Sistem Pertahanan Tubuh Ikan.....	23
2.4.1 Sitem imun Non Spesifik.....	24
2.4.2 Sistem imun Spesifik.....	25
2.5 Reaksi Inflamasi Jaringan HSP70 Dan -Aktin.....	27

3. METODE PENELITIAN.....	30
3.1 Materi Penelitian	30
3.2 Alat dan Bahan	30
3.2.1 Alat	30
3.2.2 Bahan	31
3.3 Metode Penelitian	31
3.4 Teknik Pengambilan Sampel	32
3.5 Prosedur Penelitian.....	34
3.5.1 Sterilisasi Alat	34
3.5.2 Kultur Mikroalga <i>Spirulina</i> sp	34
3.5.3 Proses Isolasi Protein <i>Spirulina</i> sp.....	37
3.5.4 Elektroforesis Protein dengan Metode SDS-PAGE	38
3.5.5 Pengukuran Berat Molekul Protein Sampel.....	42
3.5.5 Aklimatisasi Ikan Kerapu Tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>).....	42
3.5.6 Uji in-vivo Fragmen Pigmen Protein pada kerapu Tikus.....	43
3.5.7 Uji in-vivo VNN pada kerapu tikus.....	44
3.5.8 Isolasi Protein Organ Ikan.....	44
3.5.9 Imunohistokimia (IHC)	44
4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	47
4.1 Kultur mikroalga <i>Spirulina</i> sp	47
4.2 Kandungan Pupuk Walne dalam Pertumbuhan <i>Spirulina</i> sp	51
4.3 Isolasi FPP <i>Spirulina</i> sp	52
4.4 Profil FPP <i>Spirulina</i> sp Menggunakan Metode SDS-PAGE.....	54
4.5 Uji In Vivo pada Ikan Kerapu Tikus (<i>Cormileptes altivelis</i>).....	57
4.6 Hasil Uji Imunohistokimia (IHC) PCP <i>Spirulina</i> sp Terhadap Organ Ikan Kerapu Tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>).....	64
4.6 Profil Protein Organ Hati <i>C. altivelis</i>	80
4.7 Analisa Data	82
4.8 Kualitas Air Pemeliharaan Ikan Kerapu Tikus	84
4.8.1 Suhu	85
4.8.4 Oksigen Terlarut (DO).....	88
5. PENUTUP	90
5.1 Kesimpulan.....	90
5.2 Saran.....	90
DAFTAR PUSTAKA.....	91
LAMPIRAN.....	104

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Sel <i>Spirulina</i> sp.....	6
2. Grafik Pertumbuhan Fitoplankton.....	8
3. Struktur kimia Pigmen Phycocyanin.....	14
4. Ikan Kerapu Tikus <i>Cromilptes altivelis</i>	18
5. Gambaran sistem Pertahanan tubuh ikan.....	24
6. Pembuatan media agar.....	47
7. Kultur Murni 2 stoples 2 liter.....	48
8. Kultur Intermediet.....	49
9. Pembuatan kultur masal <i>Spirulina</i> sp.....	50
10. (a) penyaringan mikroalga, (b) endapan <i>Spirulina</i> yang didalam valkon ukuran 50 ml, (c) endapan dari hasil sentrifugase 4000 rpm.....	52
11. (a) mikroalga yang ditimbang sebanyak 5 gr, (b) pemberian nitrogen cair, (c) pengerusan mikroalga <i>Spirulina</i> sp.....	53
12. (a) proses sentrifugase dingin, (b) hasil pengerusan di masukan ke avendoft 2 ml, (c) hasil supernatant dan pellet.....	54
13. A. Marker (PRO-STAIN™) B. Hasil elektroforesis pita crude protein <i>Spirulina</i> sp dengan SDS-PAGE dengan pewarnaan comasion Brilliant Blue.....	55
14. Hasil pengamatan organ hati tanpa perlakuan (control), Pengulangan A. <i>ImmunoRatio</i> I, B. <i>ImmunoRatio</i> II B. <i>ImmunoRatio</i> III.....	66
15. Histogram menggunakan software image J pada organ hati tanpa perakuan (kontrol).	67
16. Grafik histogram pada organ hati tanpa perakuan (kontrol).....	67
17. Hasil pengamatan organ hati perlakuan FPP, Pengulangan A. <i>ImmunoRatio</i> I, B. <i>ImmunoRatio</i> II B. <i>ImmunoRatio</i> III.....	68
18. Histogram menggunakan software image J pada organ hati perakuan (FPP)..	69
19. Grafik histogram menggunakan software image J pada organ hati tanpa perakuan (FPP).....	69
20. Hasil pengamatan organ hati perlakuan VNN, Pengulangan A. <i>ImmunoRatio</i> I, B. <i>ImmunoRatio</i> II B. <i>ImmunoRatio</i> III.....	70

21. Histogram menggunakan software image J pada organ hati perakuan (VNN) . 71

22. Grafik histogram menggunakan software image J pada organ hati perakuan (VNN)..... 71

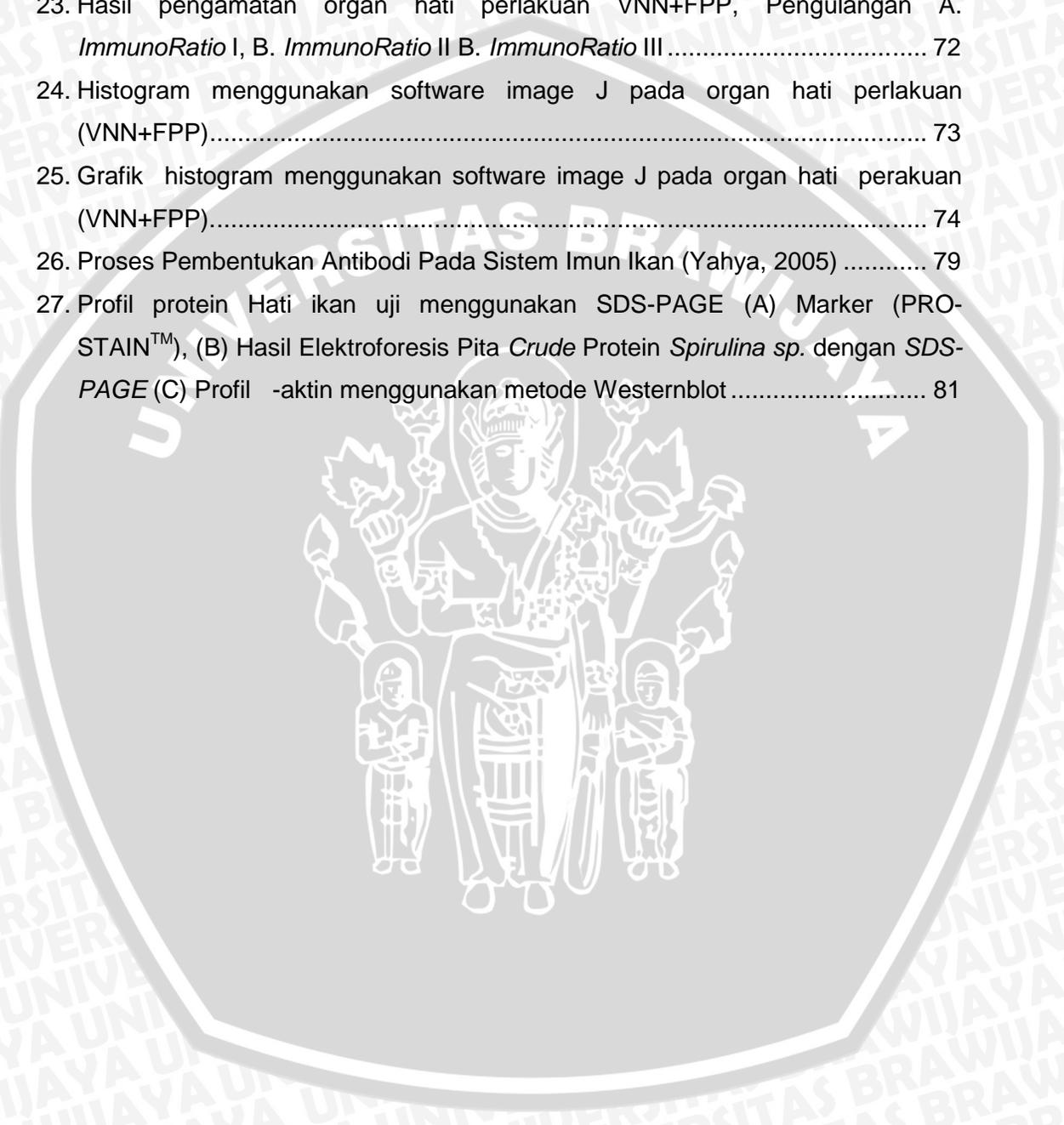
23. Hasil pengamatan organ hati perlakuan VNN+FPP, Pengulangan A. *ImmunoRatio* I, B. *ImmunoRatio* II B. *ImmunoRatio* III 72

24. Histogram menggunakan software image J pada organ hati perlakuan (VNN+FPP)..... 73

25. Grafik histogram menggunakan software image J pada organ hati perakuan (VNN+FPP)..... 74

26. Proses Pembentukan Antibodi Pada Sistem Imun Ikan (Yahya, 2005) 79

27. Profil protein Hati ikan uji menggunakan SDS-PAGE (A) Marker (PRO-STAIN™), (B) Hasil Elektroforesis Pita *Crude Protein Spirulina sp.* dengan SDS-PAGE (C) Profil -aktin menggunakan metode Westernblot 81



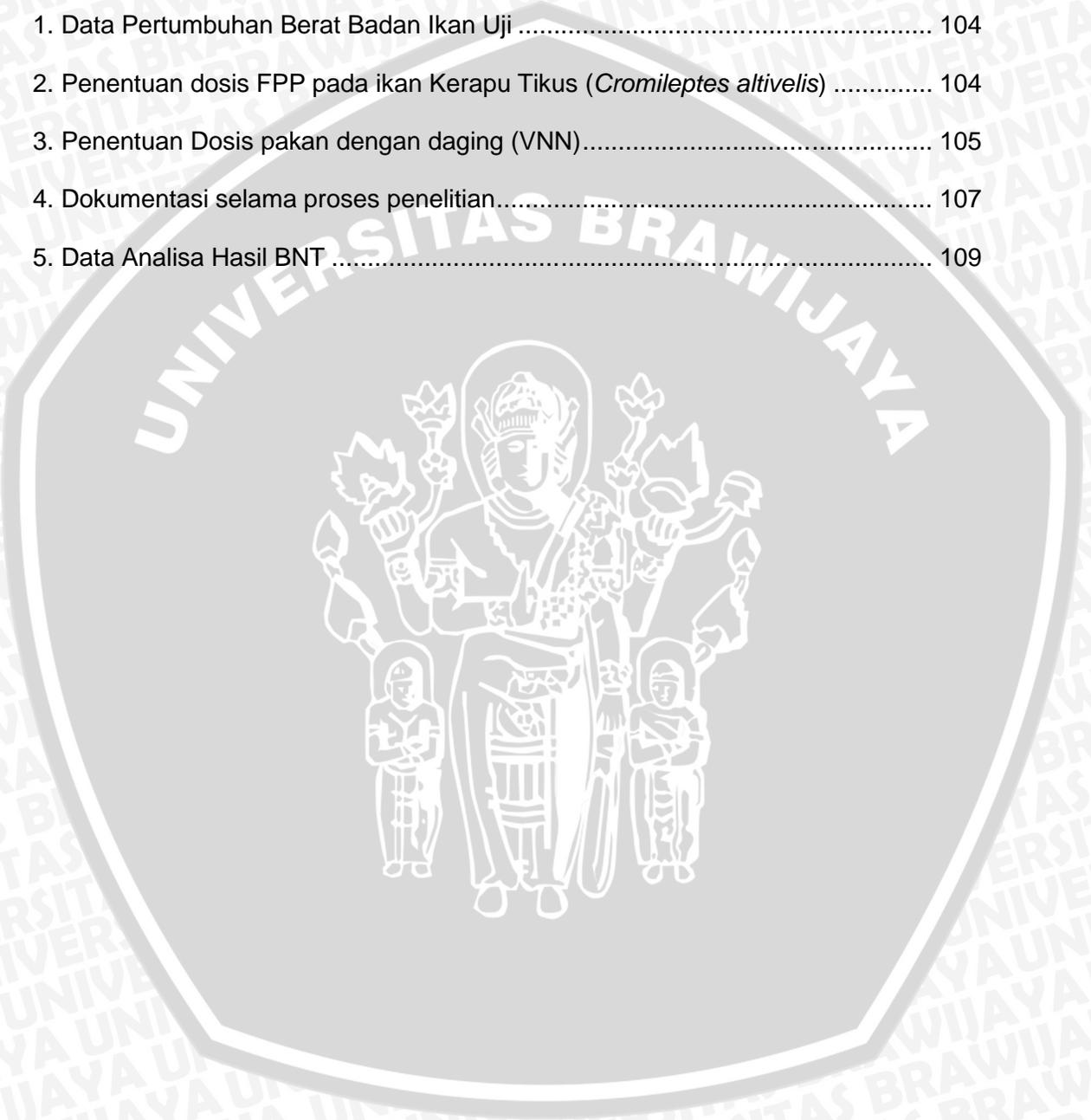
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi laritan staning dan destaning	40
2. Komposisi Pupuk Walne	51
3. Perlakuan atau respon ikan selama pemeliharaan.....	59
4. Data Hasil Penelitian.....	83
5. Analisa Keragaman (ANOVA) DAB -aktin setiap perlakuan	83
6. Hasil Uji BNT	84
7. Hasil pengukuran suhu (⁰ C) pada kolam ikan Kerapu Tikus.....	85
8. Hasil pengukuran salinitas (‰) pada kolam ikan Kerapu Tikus.....	86
9. Hasil Pengukuran pH Pada Kolam Ikan Kerapu Tikus	87
10. Hasil Pengukuran Oksigen Terlarut	89



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Data Pertumbuhan Berat Badan Ikan Uji	104
2. Penentuan dosis FPP pada ikan Kerapu Tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>)	104
3. Penentuan Dosis pakan dengan daging (VNN).....	105
4. Dokumentasi selama proses penelitian.....	107
5. Data Analisa Hasil BNT	109



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Mikroalga adalah organisme yang termasuk tumbuhan bersel tunggal, berkembangbiak sangat cepat dengan daur hidup relatif pendek. Alga mikroskopik biasa disebut dengan fitoplankton yang merupakan sumber makanan di laut. Alga mikroskopis bersintesis seperti tanaman tingkat tinggi (panggabean, 1998). Mikroalga telah banyak di budidayakan di Indonesia, salah satunya *Spirulina sp.*

Spirulina sp. termasuk mikroalga hijau biru (*blue-green*) yang berbentuk multiseluler dan berserabut, dan di Afrika alga ini digunakan sebagai makanan manusia yang diperoleh dari perairan. Selain itu *Food and Agrikultural Organization* (2009), menjelaskan bahwa mikroalga *Spirulina sp* banyak digunakan sebagai makanan dalam bidang kesehatan. Menurut Phang, *et al.* (2002), menyatakan bahwa mikroalga *Spirulina sp* mengandung protein tinggi sekitar 55-70% dan berbagai macam sumber mikronutrien lainnya. Pada tahun 1976 mikroalga *Spirulina sp* dipilih sebagai sumber makanan masa depan oleh *International Association of Applied Microbiology*. adapun Fragmen Pigmen Protein yang terdapat pada *Spirulina sp* salah satunya yaitu Phycocyanin yang merupakan pigmen biru dikenal memiliki daya antioksidan (Chen dan Wong, 2008). sedangkan peran antioksidan yaitu untuk menetralkan radikal bebas (Yuliarti, 2009). Hal inilah yang menyebabkan pemanfaatan *Spirulina sp* luas dalam produk makanan, seperti mie (Zeng, 1995).

Spirulina sp mempunyai kandungan sumber nutrisi dan protein yang lengkap (60-70%), juga mengandung *Phycocyanin* yang merupakan pigmen biru sebagai antioksidan, selain itu terdapat kandungan zat warna lainnya seperti Phycocyanin, - karoten, Asam Amino Esensial, Vitamin A, Niacin dan Mineral (tietze, 2004).

kandungan pigmen yang terdapat pada mikroalga *Spirulina* sp adalah *phycoyanin*, *chlorophyll-a* dan *carotene* (Vonshok, 2008).

Menurut Tongsiri, *et al.* (2010), Caroteneoid merupakan pigmen yang berperan dalam warna pada ikan dan crustacea. Selain sebagai pakan alami *Spirulina* sp digunakan sebagai imunostimulan, obat-obatan, kosmetik dan pewarna alam (Borowitzka, 1998). Adapun manfaat FPP yang terdapat pada mikroalga *Spirulina* sp antara lain, FPP termasuk salah satu penyusun pigmen dari mikroalga *Spirulina* sp yang mengandung protein sebesar 60-71%, lemak 8%, karbohidrat 16%, vitamin 1,6%, *Chlorophyll-a* 1,6%, *Phycocyanin* 18%, dan β -Carotene dan γ -linoleic acid 20-30% (Suminto, 2009). Kandungan tersebut dapat berfungsi sebagai antioksidan, antiviral dan imunomodulator (Food and Agricultural organization 2009). *Phycocyanin* merupakan salah satu kandungan yang dapat berfungsi sebagai antioksidan. *Phycocyanin* adalah antioksidan alami dari kelompok *phytochemical*, golongan *flavonoid* (Hamid, 2010), dan dapat larut dalam air (Eriksen, 2008).

FPP (*Fragmen Pigmen Protein*) yang merupakan salah satu komponen penyusun protein pada alga *Spirulina* sp, dapat digunakan sebagai antioksidan dan anti virus. Impra (2009), mengatakan bahwa FPP merupakan protein dalam bentuk enzim berperan sebagai katalis dalam bermacam proses biokimia. Sebagai alat pelindung seperti antibodi yang terbentuk ketika tubuh kemasukan virus.

FPP dapat digunakan untuk meningkatkan sistem imun pada organisme vertebrata maupun avertebrata. Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) merupakan salah satu organisme vertebrata yang dilaporkan pada proses budidayanya mengalami kendala yaitu terjadinya serangan berbagai macam agen penyakit seperti bakteri jamur, virus, dan parasit. *Viral Nervous Necrosis* (VNN) merupakan virus yang keberadaannya sangat berbahaya pada ikan Kerapu Tikus. Serangan

VNN dapat menimbulkan kematian hingga 100%. Upaya penanggulangan yang dapat dilakukan salah satunya adalah menggunakan imunostimulan.

Pemanfaatan FPP dalam penelitian ini akan digunakan sebagai imunostimulan untuk menanggulangi serangan VNN pada ikan Kerapu Tikus. Indikator peningkatan sistem imun dapat diamati melalui profil atau ekspresi β -aktin pada tubuh ikan.

β -aktin adalah komponen penting dalam sitoskeleton. Peran penting β -aktin adalah membantu proses kerja dalam sel, pembelahan sel, seperti morfologi sel, internalisasi antigen, dan mengatur keluar masuknya vesikel untuk pemrosesan antigen (Yusseff dan Reversat, 2011).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas apakah FPP mikroalga laut *Spirulina* sp mampu meningkatkan sistem imun dalam ekspresi beta aktin pada ikan Kerapu Tikus *Cromileptes altivelis*.

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan *Fragmen Pigmen Protein* yang ada di dalam mikroalga *Spirulina* sp serta manfaatnya untuk antivirus VNN (*Virus Nervous Neural*) pada ikan Kerapu Tikus.

1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat Teoritis

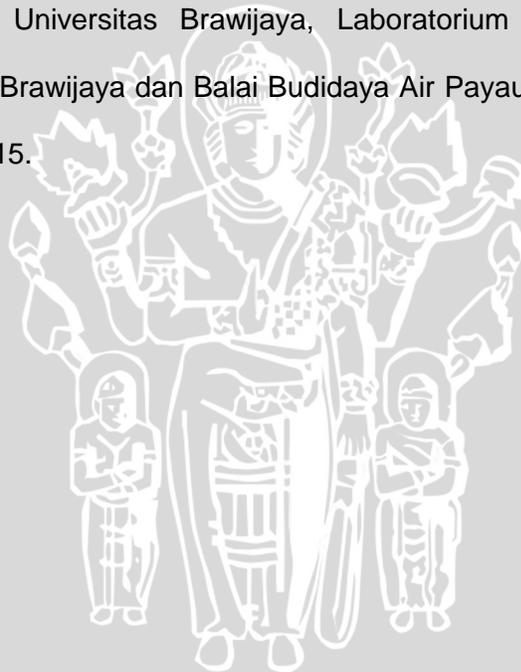
Memberikan informasi mengenai FPP yang diisolasi pada mikroalga laut *Spirulina* sp baik dari segi profil protein maupun dari berat molekul sehingga dapat dilakukan eksplorasi potensi pirenoid sebagai bahan hayati yang berpotensi sebagai antiviral pada penyakit infeksi pada ikan melalui analisa proteomic maupun genomic.

1.4.2 Manfaat Praktis

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

1.5 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Ilmu-Ilmu Perairan dan Laboratorium Bioteknologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Laboratorium Biologi Molekuler FMIPA Universitas Brawijaya, Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Balai Budidaya Air Payau (BBAP) Situbondo, pada bulan April-Juli 2015.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mikroalga *Spirulina* sp

Spirulina sp adalah plankton fotosintetik yang termasuk dalam divisi chyanobakteria yang mempunyai pigmen berwarna biru hijau dan berbentuk seperti filamen, Alga *Spirulina* sp banyak ditemukan diperairan pada pH alkalinitas daerah tropis dan subtropis (Estrada, *et al.*, 2001). *Spirulina* sp banyak dimanfaatkan sebagai bahan tambahan pada makanan untuk pakan ikan (M. Ahsan, *et al.*, 2008). Selain digunakan untuk bahan makanan *Spirulina* sp memiliki kemampuan sebagai bahan nutrasetikal (bahan yang dapat memberi kebaikan pada kesehatan), komposisi kimia *Spirulina* sp menunjukkan kandungan yang tinggi karena kandungan nutrisi esensialnya seperti protein, vitamin, mineral dan asam lemak tak jenuh yaitu *Gamma linoleik acid* memiliki nutrisi yang tinggi (Kabinawa, *et al.*, 1998).

Selain kandungan nutriennya yang tinggi *Spirulina* sp juga memiliki sifat terapeutik seperti efek antioksidan, imunomodulasi, potensi anti kanker, anti virus dan sifat pengaturan kolesterol (Belay, 2002).

2.1.1 Klasifikasi

Menurut Sedjati (2012), *Spirulina* sp merupakan organisme planktonik yang bersifat autotrof dan tidak memiliki inti sel (Prokariotik) berwarna hijau kebiruan yang termasuk dalam kelas *Cyanophyceae*, yang hidupnya tersebar luas di perairan baik air tawar, air payau dan air laut. *Spirulina* sp mampu tumbuh pada suhu 18-40 °C dengan intensitas cahaya rendah sampai tinggi.

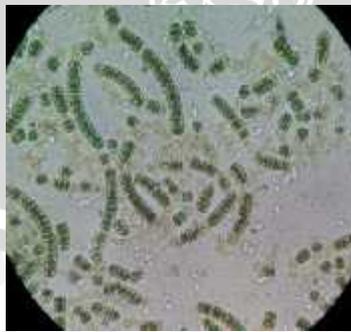
Mikroalga *Spirulina* sp dikelompokkan kedalam organisme *Thallophyta*, yaitu tumbuhan yang tidak memiliki akar, batang dan daun sejati, *Spirulina* termasuk dalam kelas *Chyanophyceae* karena tidak memiliki intisel dan *Cyanobacteria* karena

memiliki pigmen berwarna biru (Kabinawa, 2006). Secara garis besar *Spirulina* sp dapat diklasifikasikan dan dapat dilihat dibawah ini.

Divisi : *Chyanophyta*
Kelas : *Chyanophyceae*
Ordo : *Nostocates*
Famili : *Oscillatoriceae*
Genus : *Spirulina* sp
Spesies : *Spirulina Platensis*

2.1.2 Morfologi

Spirulina sp adalah jenis *Cyanobacteria* atau bakteri yang mengandung klorofil dan dapat bertindak sebagai organisme yang bisa melakukan fotosintesis untuk membuat makanan sendiri. Berbentuk filamen yang tersusun atas sel-sel yang berbentuk silindris, tidak bercabang, berbentuk helik dan mengandung *phycocyanin* tinggi sehingga warna cenderung hijau kebiruan. *Spirulina* sp dapat tumbuh dengan baik di danau, air tawar, air laut, dan *Spirulina* sp juga memiliki kemampuan untuk tumbuh di media yang mempunyai alkalinitas tinggi, (pH 8,5-11), dimana mikroorganisme tidak bisa tumbuh dengan baik dalam kondisi ini (Kebede dan Algren,1996). Suhu terendah untuk *Spirulina* sp adalah 15⁰C, dan pertumbuhan optimal pada suhu 35-40⁰C.



Gambar 1. Sel *Spirulina* sp (dok. Pribadi 2015)

Pada mikroalga *Spirulina* sp mempunyai susunan sel antara lain yaitu butir-butir *cyanophysin*, butir-butir glikogen, badan polifosfat dan vakuola gas dalam kromoplasma. Butir-butir *chyanophysin* terdiri atas butir-butir pati, badan polifosfat merupakan tempat cadangan fosfat sedangkan vakuola gas digunakan untuk menyimpan oksigen, mengambang dan sekaligus mempertahankan berat jenis sel terhadap berat jenis air (Caferri,1983). Tilakoid *Spirulina* sp yang tersebar didalam kromoplasma merupakan tempat melakukan fotosintesis untuk menghasilkan klorofil-a. Pada permukaan tilakoid terdapat granula fikobilisom yang terdiri atas fikobiliprotein yang berfungsi menyerap cahaya dan melindungi pigmen fotosintesis terhadap oksidasi cahaya berintensitas tinggi (Kabinawa, 2006).

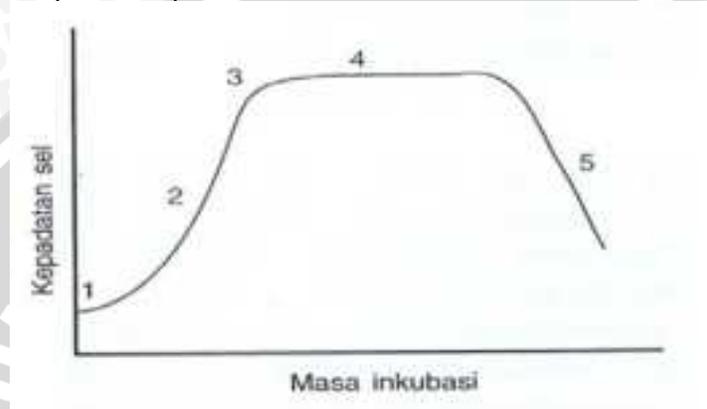
2.1.3 Biologi dan Habitat

Spirulina sp merupakan mikroorganisme autotrof yang termasuk dalam kelas *Chyanobacteria* sehingga mempunyai pigmen hijau kebiruan memiliki bentuk tubuh menyerupai benang yang merupakan rangkaian sel yang berbentuk silindris dengan dinding sel yang tipis, berdiameter 1-12 mikrometer. Alga ini tumbuh baik dan subur diperairan tawar seperti kolam air tawar dan danau air tawar terutama pada kisaran pH 8-11 dan *Spirulina* sp mampu tumbuh subur diperairan hangat yang memiliki temperatur 32°C-45°C (Prasetyo, *et al.*, 2010).

Spirulina sp ditemukan pada air payau dan biasanya di temukan pada tempat-tempat yang lembab atau lahan yang sering terkena air dan terkena cukup sinar matahari (Natasasmita, 2009). Lingkungan yang baik untuk pertumbuhan *Spirulina* sp adalah lingkungan yang terkena sinar matahari, curah hujan sedang, kualitas air baik, dan pH berkisar antara 7-9 (Isnansetyo dan Kurniastuti, 1995).

2.1.4 Fase pertumbuhan *Spirulina* sp

Spirulina sp mengalami beberapa tahapan atau fase selama hidupnya. mempunyai 5 fase pertumbuhan *Spirulina* sp yaitu fase lag (faseperkenalan), fase eksponensial, fase stasioner, fase laju pertumbuhan dan fase kematian adapun grafik pertumbuhan *Spirulina* sp bisa dilihat di bawah ini.



Gambar 2. Grafik Pertumbuhan Fitoplankton. (Inansetyo dan Kurniastuty, 1995)

a. Fase Lag (Fase Perkenalan)

Fase lag ditandai dengan kecilnya peningkatan kepadatan sel. Pertumbuhan pada fase ini merupakan fase adaptasi fisiologis dari metabolisme sel untuk tumbuh, seperti peningkatan enzim serta metabolisme yang melibatkan pada pembelahan sel dan fiksasi karbon. terjadi penambahan inokulum kedalam media kultur yaitu hari ke-0 sampai hari ke 1 saat penebaran bibit *Spirulina* sp

b. Fase Log (Eksponensial)

Fase ini ditandai dengan pembelahan sel dengan laju pertumbuhan biasanya relatif konstan dan nilainya tergantung ukuran sel, iluminasi cahaya dan suhu. Cepat lambatnya pertumbuhan eksponensial pada kultur volume terbatas akhirnya akan terhenti. Faktor-faktor yang menyebabkan hal ini terjadinya adalah habisnya nutrisi, laju penyediaan karbondioksida, perubahan media sebagai hasil dari preferensi penyerapan unsur-unsur tertentu, dan penurunan iluminasi cahaya. Fase

eksponensial terjadi pada hari ke1 hingga hari ke 11, yang mana pertumbuhan terus meningkat hingga mencapai puncak.

c. Fase Berkurangnya Pertumbuhan Relatif

Fase Stasioner (berkurangnya pertumbuhan relatif). Pada hari ke 12 hingga hari ke 13, jumlah sel menurun drastis setelah mencapai puncak. Hal ini dikarenakan berkurangnya salah satu faktor pendukung nutrisi, kecepatan suplai oksigen, berubahnya pH, terbatasnya cahaya yang masuk dalam media.

d. Fase Stasioner

Pada fase ini laju reproduksi sama dengan laju kematian sehingga kepadatannya tetap. Produksi paa fase ini juga tergantung pada kondisi alami dari faktor-faktor yang membatasi pertumbuhan, fase ini terjadi pada hari ke 14 dan hari ke 15.

e. Fase Kematian

Selama fase kematian, merupakan penurunan jumlah organisme kultur setelah melewati fase stasioner. Pada fase ini ditandai dengan laju kematian yang tinggi dari pada laju reproduksi. Pada fase kematian terjadi di hari ke 20.

2.1.5 Faktor Pendukung Pertumbuhan *Spirulina* sp

Spirulina sp berkembang biak dengan cara membelah diri. Pembelahan diawal dengan memutus filament menjadi satuan-satuan sel yang akan membentuk filament baru. Pemutusan filament yang telak masak merupakan awal daur hidup *Spirulina* sp. Pemutusan filament ini akan membentuk bagian-bagian yang disebut dengan necridia, necridia selanjutnya akan membelah membentuk semacam piringan yang terpisah-pisah, hasil pembelahan tersebut akan berkoloni membentuk hormogonia yang dapat memisahkan diri dari filament induk menjadi filament baru

(Isnansyto dan Kurniastuty, 1995). Ada beberapa faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga *Spirulina* sp antara lain:

a. Suhu

Suhu merupakan parameter fisika yang mempengaruhi kehidupan organisme dan kualitas perairan. Secara tidak langsung, suhu akan mempengaruhi metabolisme, daya larut gas-gas termasuk oksigen serta berbagai reaksi kimia dalam perairan (Ghufran, *et al.*, 2007). Secara umum, laju pertumbuhan meningkat sejalan dengan kenaikan suhu, dapat menyebabkan kematian bila peningkatan suhu sampai ekstrim. Tingginya suhu berkaitan dengan tingginya intensitas cahaya yang masuk kedalam perairan, intensitas yang masuk menentukan derajat panas. Semakin banyak sinar matahari yang masuk semakin tinggi suhu di perairan. Untuk memenuhi pertumbuhan *Spirulina* sp. diperlukan suhu kisaran 25^oC-35^oC (Poedjadi, 1994)

b. Cahaya

Cahaya merupakan salah satu faktor lingkungan yang sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroalga *Spirulina* sp, karena cahaya merupakan bagian yang sangat penting dalam pigmen fotosintetik yang menyediakan energi bagi kehidupan mikroalga. Kekurangan cahaya dapat mengakibatkan proses fotosintetik tidak berlangsung normal sehingga akan mempengaruhi pertumbuhan *Spirulina* sp. menggunakan cahaya lampu putih berkisar 1500-2500 Lux. Ekawati (2005) mengatakan bahwa cahaya merupakan sumber energi pada proses fotosintesis, oleh karena itu intensitas cahaya berperan sangat penting, selain itu cahaya dapat berasal dari alam atau dari lampu.

c. pH

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

Menurut Edhy, *et al.* (2003), mengatakan sebagian besar sel, termasuk fitoplankton sangat peka terhadap derajat keasaman cairan yang mengelilinginya. Derajat keasaman diukur pada skala satuan pH. Nilai pH optimal untuk *Spirulina* sp adalah 7,2-9,5 dan maksimal pada pH 11.

d. Salinitas

Salinitas merupakan konsentrasi garam yang terlarut dalam satuan air. Salinitas memiliki peranan penting dalam pertumbuhan karena secara langsung berpengaruh pada tekanan osmotik di dalam sel fitoplankton sehingga fluktuasi salinitas menyebabkan aktivitas sel menjadi terganggu, fitoplankton tumbuh pada air laut dengan salinitas 20-70 ppt. salinitas optimal untuk pertumbuhan *Spirulina* sp adalah 30ppt (Richmond, 1998).

Menurut Hariyati (2008), salinitas yang optimal untuk pertumbuhan *Spirulina* sp adalah berkisar antara 15-20‰. Kebanyakan alga memperlihatkan terjadinya hambatan proses fotosintesis setelah dipindahkan pada medium dengan salinitas yang lebih tinggi atau tekanan osmotik yang lebih tinggi. Dengan adanya salinitas air

medium yang sesuai dengan suhu yang optimal maka pertumbuhan *Spirulina sp* dapat berlaju dengan baik.

e. Nutrien

Nutrient merupakan unsur atau senyawa kimia yang di gunakan mikroalga untuk pertumbuhan. Menurut pendapat Kabinawa (2006), unsur hara makro nutrien di definisikan sebagai unsur hara yang digunakan untuk pertumbuhan dan perbanyakan sel. Mkaro nutrient tersebut terdiri dari kalsium (C), hydrogen (H), nitogen (N), sulfur (S), fosfor (P), kalium (K), dan magnesium (Mg), sedangkan unsur nutrient yang di perlukan dalam jumlah sdikit disebut mikro nutrient. Makro dan mikro nutrien tersebut berperan dalam sintea klorofil, unsur tersbut adalah nitrogen, magnesium, besi. Unsur tersebut akan mencegah terjadinya sintesa klorofil yang disebut chlorosis (Riyono, 2007).

Pada budidaya mikroalga media kultur, digunakan tempat untuk tumbuh dan berkembang biak, sehingga ketersediaan unsur nutrien, baik makro dan mikro nutrient mutlak diperlukan dalam media kultur (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995).

2.2 Fragmen Pigmen Protein Spirulina sp

Fragmen Pigmen Protein merupakan salah satu penyusun pigmen dari mikroalga *Spirulina sp*. Mikroalga tersebut memiliki beberapa kandungan penting, seperti *protein* 60-71%, *lemak* 8%, *karbohidrat* 16%, *vitamin* 1,6%, *kloropill-a* 18%, *Phycocyanin* 17% dan *-carotene* 20-30%. *Spirulina sp* juga mengandung kalium, protein dengan kandungan *Gamma Llinolnic Acid* (GLA) yang tinggi (Tokusoglu dan Unal, 2006) serta *vitamin B1, B2, B12* dan *C* (Brown, *et al.*, 1997) sehingga sangat baik apabila dijadikan pakan ataupun makanan dan obat-obatan. Komposisi yang terdapat pada *Spirulina sp* merupakan komposisi pigmen yang kompleks dan umum

ditemukan pada alga biru-hijau. Komposisi tersebut diantaranya adalah *Klorofil-a*, *xanthophyll*, *Phycocyanin* dan *karotenoid* yang terdiri dari *myxoxanthophyll*, *beta karoten* dan *zeaxantin* (Krisdawana dan Hardiyanto, 2011). *Phycocyanin* merupakan salah satu dari tiga pigmen klorofil dan karotenoid yang mampu menangkap sinar radiasi yang paling efisien (Hall dan Rao, 1999). *Phycocyanin* adalah pigmen yang paling dominan pada *Spirulina* sp dan jumlahnya lebih air 20% berat kering (Browitzka M.A., 1988). *Phycocyanin* sebagai biloprotein diketahui mampu menghambat pembentukan koloni kanker (Adams, 2005).

Kandungan *Phycocyanin* tersebut dapat berfungsi sebagai antioksidan, antiviral dan imunomodulator (Belay, *et al.*, 1993). *Phycocyanin* adalah antioksidan alami atau primer dari kelompok *phytochemical*, golongan *flavonoid* (Hamid, 2010), dan larut dalam air (Eriksen, 2008). Hal ini diperkuat oleh Estrada, *et al.* (2001), yang menyebutkan bahwa *Phycocyanin* memiliki sifat anti malnutrisi, anti amonia, anti viral dan anti tumor atau kanker.

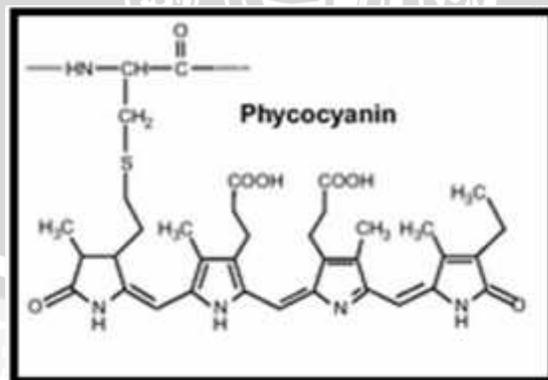
2.2.1 Phycocyanin (C-PC)

Phycocyanin berasal dari kata bahasa Yunani *phyco* yang artinya alga dan *cyan* yang artinya biru, *phycocyanin* digolongkan sebagai mikroalga biru-hijau (*Chyanophyta*) yang berperan membantu klorofil dalam menyerap cahaya pada rentang panjang gelombang 580-620 nm. Karena pada panjang gelombang tersebut klorofil tidak bisa menyerap cahaya, berdasarkan fungsinya *phycocyanin* memiliki struktur kromofor berbentuk rantai cincin tetrapiral terbuka (fikosianobilin) disebut dengan pigmen untuk menyerap cahaya (Pirenantyo, *et al.*, 2008).

Organisme autotrof memiliki satu pigmen utama yaitu pigmen klorofil dan dua pigmen pelengkap yaitu karotenoid dan fikobiliprotein/fikobilin. Karotenoid terbagi lagi menjadi dua kelompok pigmen karoten dan xantofil, sedangkan fikobilin terbagi

menjadi empat yaitu *fikoeritrobin*, *fikosianobilin*, *fikoeritrosianin*, dan *fikourobilin*. 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 organik (metanol, etanol, aseton) sedangkan Pigmen fikobilin merupakan pigmen yang berasosiasi dengan protein dan bersifat polar serta larut dalam air dan dapat di ekstrak dengan menggunakan pelarut air atau buffer (Masojidek, *et al.*, 2004).

Pigmen fikobiliprotein pada *Spirulina* sp terdiri dari pigmen *phycocyanin*, dan *allophycocyanin*. Pigmen fikobiliprotein yang mempunyai struktur mirip dengan bilirubin diketahui mempunyai efek meredam beberapa spesies oksigen reaktif secara *in-vivo*. Oleh karena itu, pigmen fikobiliprotein dapat memiliki aktivitas antioksidan dan adanya suatu kemungkinan bahwa aktivitas ini dapat melindungi sel hidup dari stres oksidatif. pigmen fikobiliprotein pada *Spirulina* sp memiliki aktivitas antioksidan (Hirata, *et.al.*, 2000). *Phycobiliprotein* sendiri merupakan pigmen yang terdapat pada *chyanobacteria*, adapun tiga jenis phycobiiprotein yaitu *phychoerythrin*, *pbyococyanin* dan *allophycocyanin* adapun struktur *phycocyanin* dapat dilihat pada gambar dibawah ini.



Gambar 3. Struktur kimia Pigmen *Phycocyanin* (Hiratta, *et al*, 2000)

Phycobiliprotein adalah istilah yang umum digunakan untuk grup pigmen termasuk dalam divisi *Rhodophyta* (alga merah) dan *Chyanophyta* (alga hijau-biru), *phycobiliprotein* terdiri atas bilin dengan komponen bilin utama disebut *phycosyanobilin*, *phycoeritrobin*, *phychourobilin* dan *phycocriptoviolin*. *Phycobiliprotein* dibedakan menjadi dua grup utama berdasarkan warnanya yaitu *phycocyanin* dan *phycoeritrin* adalah pigmen yang berwarna merah cerah dan memancarkan warna orenge dan *phycocyanin* berwarna biru dan memancarkan merah tua (Heocha, *et al.*, 1976).

Bentuk lain dari *phycocyanin* adalah *allophycocyanin* yang merupakan pelengkap biliprotein dalam jumlah sedikit pada alga merah dan hijau-biru, *allophycocyanin* berfungsi sebagai penyalur energi antara lamella dan *klorofil-a* dan *phycobilisom*. Energi cahaya yang diterima *phycobilisom* siap di transmisikan oleh *allophycocyanin* ke pusat reaksi (Yaron, *et al.*, 1992).

2.2.2 Mekanisme Pigmen Phycocyanin dalam Sel *Spirulina* sp

Proses fotosintesis tumbuhan terjadi tidak hanya menggunakan klorofil dan karetenoid saja seperti diketahui pada umumnya, tetapi terdapat pigmen pelengkap yang juga berperan penting dalam proses fotosintesis tersebut. Salah satunya yaitu pigmen *phycobiliprotein* merupakan pigmen yang mempunyai peran besar sebagai pigmen pelengkap selama proses fotosintesis (Chakdar, *et al.*, 2012). *Phycobiliprotein* membentuk antena di permukaan stromal pada membran tilikoid alga *Spirulina* sp, di dalam sel energi cahaya ditangkap oleh *phycobiliprotein* yang kemudian ditransfer ke klorofil-a, ketika cahaya yang diserap tidak maksimal oleh klorofil maka *phycobiliprotein* akan membantu dalam proses penyerapan cahaya dalam proses fotosintesis pada alga *Spirulina* sp (Kawsar, *et al.*, 2011).

Phycobiliprotein merupakan protein yang mempunyai cincin tetrapirrol dan termasuk dalam gugus kromofor dan menghasilkan warna pada alga. *Phycobiliprotein* terbagi menjadi dua yaitu *phycocyanin* dan *aloficocyanin* masing-masing pigmen tersebut memiliki fungsi yang sama yaitu untuk membantu klorofil dalam penyerapan cahaya ketika gelombang cahaya masuk ke permukaan laut pigmen fikosianin dan alofikosianin akan mentransfer energi cahaya ke klorofil untuk fotosintesis, dari hasil proses fotosintesis tersebut menyerupai glikogen (Pumas, *et al.*, 2012).

2.2.3 Mekanisme Pigmen Phycocyanin Dalam Antioksidan

Spirulina sp mengandung fikobilisom sebagai pigmen protein kompleks penangkap sinar matahari. Fikobilisom utamanya (80-85%) tersusun dari polipeptida berwarna *brilliant* yang dinamakan *fikobiliprotein* (Eriksen 2008). Dua biliprotein penting dalam mikroalga *Spirulina* sp adalah *phycocyanin* dan *aloficocyanin*. Kedua pigmen protein ini memiliki kelompok khromofor yang sama (Richmond, 1979). *Spirulina* sp mengakumulasi *phycocyanin* dan *khlorofil-a* secara intraseluler. *phycocyanin* memiliki fungsi sebagai penyimpan protein dan sebagai antioksidan (Romay, *et al.*, 2003). *Phycocyanin* menstimulasi *hematopoieses*, mempengaruhi hormon *erythropoietin* (EPO) dan juga memproduksi sel-sel darah putih (Henson, *et al.*, 2010).

Menurut Hayashi, *et al.* (2006), mengatakan bahwa Ekstrak *Spirulina* sp untuk memproduksi aktivitas pembentukan sel di sum-sum tulang belakang pada vertebrata dan aktivitas pembentukan sel ini mengisduksi produksi sel darah merah (eritrosit) dan sel darah putih (leukosit).

2.3 Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*)

2.3.1 Klasifikasi

Menurut Evalawati, *et al.* (2001), taksonomi ikan kerapu tikus adalah sebagai berikut :

Phylum	: <i>Chordata</i>
Subphylum	: <i>Vertebrata</i>
Class	: <i>Osteichthyes</i>
Sub class	: <i>Percomorphi</i>
Sub Ordo	: <i>Percoidea</i>
Famili	: <i>Serranidae</i>
Genus	: <i>Cromileptes</i>
Spesies	: <i>Cromilptes altivelis</i>

Ikan Krapu Tikus ini bertubuh agak pipih dan warna dasar tubuhnya abu-abu dengan bintik-bintik hitam diseluruh permukaan tubuh. Kepala berukuran kecil agak moncong meruncing menyerupai moncong tikus. Ikan Kerapu Tikus digolongkan sbagai ikan konsumsi bila boot tubuhnya telah mencapai 0,5-2 kg/ekor (Kordi, 2001).

2.3.2 Morfologi

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



Gambar 4. Ikan Kerapu Tikus *Cromilptes altivelis* (Sumber : dok. Pribadi, 2015)

Sudaryato (2002), bentuk tubuh bagian punggung meninggi dengan bentuk cembung (concave), sementara panjang tubuh maksimalnya mencapai 70 cm. ikan ini tidak memiliki gigi canine (gigi yang terdapat pada geraham ikan). Lubang hidungnya besar berbentuk bulan sabit vertical. Kulitnya berwarna terang abu-abu dengan bintik-bintik hitam di seluruh kepala, badan dan sirip.

2.3.3 Habitat dan Penyebaran

Beberapa spesies ikan Kerapu Tikus dapat di temukan pada kedalaman 100-200 meter, hingga pada kedalaman 500 meter. Tetapi umumnya memiliki habitat pada kedalaman 100 meter. Sebagian besar spesies kerapu di temukan di terumbu karang di daerah dangkal dan beberapa tinggal di kawasan estuary dan berbatu, berpasir dan berlumpur, meskipun juvenile ikan kerapu di temukan pada lamun (Habibi, *et al.*, 2002). Pada kerapu dewasa bermigrasi ke perairan yang lebih dalam antara 7-4- m, biasanya ini perpindahan ini berlangsung pada siang dan sore hari. Telur dan larva bersifat pelagis sedangkan kerapu muda hingga dewasa bersifat demersal. Ikan Kerapu Tikus merupakan organisme yang bersifat nocturnal, dimana pada siang hari lebih banyak bersembunyi di liang-liang karang dan pada malam hari aktif bergerak di kolom air untuk mencari makanan. Ikan Kerapu Tikus tergolong ikan stenohaline (Breet dan Groves, 1979), maka ikan ini hanya mampu beradaptasi pada lingkungan perairan yang mempunyai kadar garam rendah.

Ikan Kerapu Tikus tersebar luas di perairan pantai baik di daerah tropis maupun subtropics, dan termasuk jenis ikan yang hidup di perairan berkarang sehingga sering di kenal sebagai ikan karang (coral reef fish) (Aslianti, 2012). Kerapu Tikus tersebar luas dari wilayah asia Pasifik termasuk laut merah, tetapi dikenal berasal dari teluk persi, Hawaii atau Polinesia. Ikan ini juga terdapat pula di hampir semua perairan pulau tropis hindia dan Samudra pasifik Barat dari pantai Timur Afrika sampai dengan Mozambika.

Di perairan dan Asia sendiri ikan kerapu tersebar di India, Thailand, Pantai tropis Australia, Jepang, Philipina, Papua Neuguinea dan Kaledonia (Evalawati, 2001). Di Indonesia ikan Kerapu Tikus banyak ditemukan di perairan pulau Sumatra, Jawa, Sulawesi dan Ambon. Salah satu indikator adanya Kerapu Tikus adalah perairan karang yang di Indonesia cukup luas (Akbar dan Sudaryanto, 2002).

2.3.4 Reproduksi

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

Amiruddin *et al.*, (2012). Perkembangan embrional ikan kerapu tikus membutuhkan waktu setidaknya 19 jam sejak pembuahan hingga penetasan. Sel

pertama terjadi 40 menit setelah pembuahan, sedangkan sel berikutnya terjadi setiap 15-30 menit atau sampai mencapai tahap multisel selama 2 jam 25 menit. Tahapan embrional selanjutnya adalah gastrula, diikuti tahapan neurula dan embrio.

2.3.5 Kebiasaan Pakan dan Pakan

Kerapu Tikus tergolong dalam ikan nocturnal, aktifitas mencari makan dimulai saat hari mulai gelap. Pada kegiatan budidaya, pemberian pakan dilakukan biasanya pada pagi hari jam 07.00 dan sore 16.00. hal ini karena pada waktu tersebut merupakan waktu paling efektif untuk pemberian pakan.

Menurut Atmirah (2010), ikan Kerapu Tikus mempunyai kebiasaan makan pada siang dan malam hari tetapi lebih aktif pada waktu pagi dan sore hari. Kerapu tikus merupakan hewan karnivora, sebagaimana jenis-jenis ikan Kerapu Tikus lainnya. Kerapu Tikus dewasa adalah ikan-ikan kecil, kepiting dan udang-udangan sedangkan larva ikan Kerapu Tikus adalah pemangsa molusca (trokofor), rotifer, mikro krustasea, kopepoda dan zooplankton. Sebagai karnivora ikan ini cenderung menangkap mangsa yang aktif bergerak di dalam kolom air. Evalawati (2001), menyebutkan bahwa Kerapu Tikus sebenarnya tergolong dalam ikan kanibal. Namun sifat kanibal yang dimiliki oleh ikan Kerapu Tikus macan ataupun ikan kerapu jenis lainnya dikarenakan lebar bukaan mulut Kerapu Tikus lebih kecil.

Pakan merupakan salah satu faktor penting dalam menunjang usaha budidaya. Pakan yang biasanya digunakan pada pembesaran Kerapu Tikus adalah pakan ikan rucah (muniran petek) yang di cacah dengan ukuran sesuai dengan bukaan mulut ikan kerapu. Ikan rucah biasanya di berikan pada ikan kerapu yang telah mempunyai umur di atas 25 hari. Hal ini dikarenakan ikan yang mempunyai umur kurang dari 25 hari masih belum mampu menampung jenis makanan berat sehingga hanya di berikan makanan berupa fitoplankton atau zooplankton.

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

2.3.6 Kualitas Air Ikan Kerapu Tikus

Beberapa persyaratan kualitas air yang perlu diperhatikan antara lain kualitas fisika air yang terdiri dari: suhu. Sedangkan untuk parameter kimia antara lain: salinitas, pH dan DO. Akbar dan Sudaryanto (2002), menjelaskan sebagai berikut:

1. Parameter Fisika

a. Suhu

Menurut Kordi (2002) suhu yang ideal untuk pertumbuhan ikan Kerapu Tikus adalah 27-32^oC. suhu perairan mempunyai peranan sangat penting dalam pengaturan aktivitas, pertumbuhan, nafsu makan, dan dan mempengaruhi proses pencernaan makanan (Hariati,1989).

2. Parameter Kimia

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

a. Salinitas

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

b. Konsentrasi Ion Hidrogen (pH)

Menurut Kordi (2002), bahwa budidaya ikan Kerapu Tikus paling baik dilakukan pada perairan dengan pH 7.6-8.0 yang merupakan kisaran umum pH air laut. Suatu perairan yang ber pH rendah dapat mengakibatkan aktifitas pertumbuhan menurun ikan menjadi lemah serta lebih mudah terinfeksi penyakit dan biasanya diikuti dengan tingginya tingkat kematian ikan (Akbar dan Sudaryanto, 2001).

c. Oksigen Terlarut (Dissolved Oxygen/DO)

Oksigen adalah faktor penting bagi kehidupan makro dan mikro organisme perairan karena diperlukan untuk proses pernafasan. Sumber oksigen terlarut dalam perairan berasal dari proses difusi oksigen yang terdapat di atmosfer kurang lebih 35% dan aktivitas fotosintesis oleh tumbuhan air dan fitoplankton. Fluktuasi oksigen harian dapat mempengaruhi parameter kimia, terutama pada saat kondisi tanpa

oksigen, yang dapat mengakibatkan perubahan sifat kelarutan beberapa unsur kimia di perairan (Apridayanti,2005).

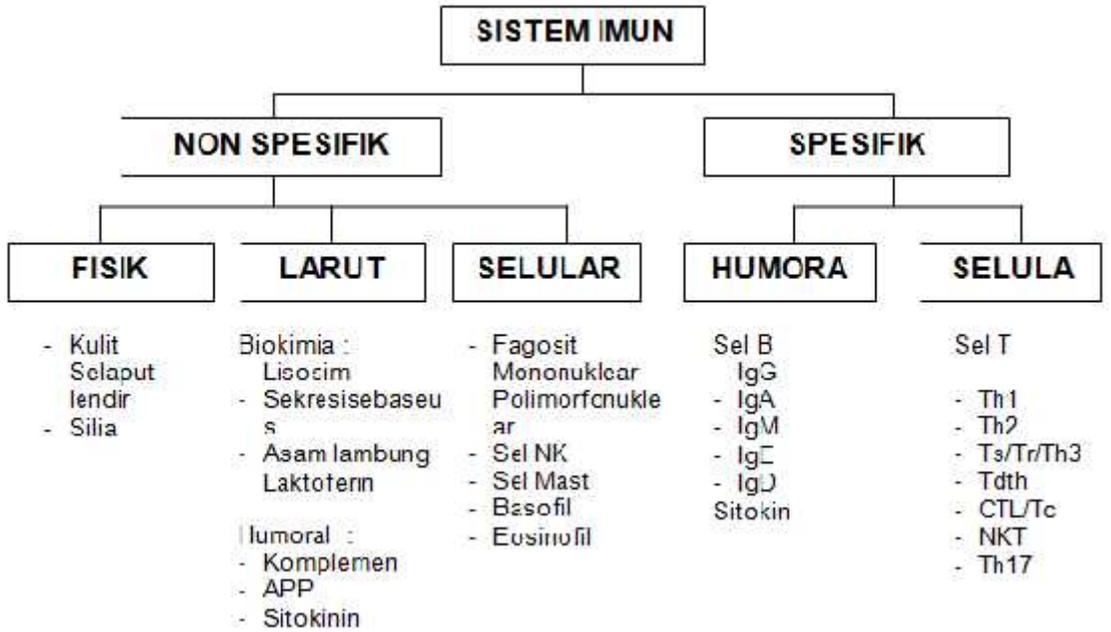
Selain dapat mempengaruhi beberapa unsur kimia, konsentrasi oksigen dalam air dapat mempengaruhi pertumbuhan dan konversi pakan serta mengurangi daya dukung perairan. Kerapu Tikus dapat hidup layak dalam keramba jarring apung dengan konsentrasi oksigen terlarut lebih dari 5 ppm.

2.4 Sistem Pertahanan Tubuh Ikan

Imunitas merupakan resistensi terhadap penyakit terutama infeksi. Sedangkan sistem imun yaitu sebagai gabungan sel, moleku dan jaringan yang berperan dalam resistensi atau perlawanan terhadap infeksi. Reaksi yang di koordinasikan oleh sel-sel, molekul-molekul dan bahan lainnya untuk melawan mikroba disebut dengan respon imun. Sistem imun diperlukan tubuh untuk mempertahankan keutuhannya terhadap bahaya yang di timbulkan berbagai bahan dalam lingkungan hidup (Bratawidjaja dan Rengganis, 2010).

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

infeksi patogen. Pada tahap ini, ikan mudah sekali terserang penyakit. Baratawidjaja dan Rengganis (2012), membagi secara garis besar sistem pertahanan tubuh ada 2 bagian adalah sebagai berikut.



Gambar 5. Gambaran sistem Pertahanan tubuh ikan (Bratawidjaja dan Rengganis, 2010)

2.4.1 Sistem imun Non Spesifik

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

dengan cepat namun selalu siap merespon dan melawan benda asing dengan singkat.

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

2.4.2 Sistem imun Spesifik

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

dikenali untuk kemudian dihancurkan. Oleh karena itu, sistem tersebut disebut spesifik. Sistem imun spesifik dapat menghancurkan benda asing yang masuk dalam tubuh tanpa bantuan sistem imun non spesifik, namun pada umumnya terjalin kerjasama antara sistem imun spesifik dan non spesifik antara komplemen, fagosit, antibodi dan antara makrofag dan sel T dan B.

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

2.4.3 VNN (Viral Nervous Necrosis)

Budidaya perikanan banyak diminati masyarakat untuk meningkatkan pendapatan serta memperoleh keuntungan yang cukup banyak. Salah satu budidaya ikan yang bisa dijadikan usaha oleh masyarakat adalah budidaya Kerapu Tikus atau bisa disebut dengan Kerapu Bebek (*Cormileptes altivelis*). Ikan memiliki potensi untuk dikembangkan di Indonesia serta memiliki nilai ekonomis tinggi. Permasalahan yang muncul dalam kegiatan budidaya adalah adanya penyakit yang menginfeksi organisme budidaya. Penyakit-penyakit dalam kegiatan budidaya biasanya disebabkan oleh parasite, bakteri, jamur, dan virus. Penyakit yang umumnya menginfeksi kerapu tikus adalah *Virus Nervous Necrosis (VNN)*.

Viral Nervous Necrosis (VNN) adalah jenis virus Nodaviridae yang menyerang ikan kerapu, terutama pada stadia larva dan benih. VNN dapat menyebabkan kematian masal hingga mencapai 100% pada stadia larva (Putri et al., 2013).

Prayitno (2002) menyatakan bahwa penyakit *Viral Nervous Necrosis* (VNN) dapat menyebabkan kematian karena virus ini merusak dan saraf sentral pada ikan, sehingga berbagai rangsangan tidak mampu direspon dan keseimbangan dalam bergerak terganggu sehingga sulit untuk berenang dan akhirnya ikan mengalami kematian.

Salah satu cara untuk mengatasi masalah kerapu Tikus yang terinfeksi virus adalah dengan perbaikan nutrisi dengan memanfaatkan respon imun yang terdapat pada tubuh ikan (Suprayudi, 2006). Salah satunya Dengan menggunakan FPP mikroalga *Spirulina* sp untuk meningkatkan sistem kekebalan tubuh (imun). Karena didalam kandungan FPP *Spirulina* sp terdapat komposisi yang kompleks dan umun ditemukan pada alga biru-hijau komposisi tersebut diantaranya adalah *Klorofil-a*, *xanthophyll*, *Phycocyanin* dan *karatenoid* yang terdiri dari *myxoxanthophyll*, *beta karoten* dan *zeaxantin* (Krisdawana dan Hardiyanto, 2011). *Phycocyanin* adalah pigmen yang paling dominan pada *Spirulina* sp dan jumlahnya lebih ari 20% berat kering (Browitzka M.A., 1988). *Phycocyanin* sebagai biloprotein diketahui mampu menghambat pembentukan koloni kanker (Adams, 2005).

2.5 Reaksi Inflamasi Jaringan HSP70 Dan -Aktin

-*aktin* merupakan komponen sitoskeleton yang memiliki peran penting dalam imunitas dan berbagai proses seluler lainnya, seperti migrasi sel, pembelahan sel dan regulasi ekspresi gen. Dalam migrasi sel, terjadi pemasangan aktin yang membuat tonjolan pada bagian terkemuka yang mendorong membran sel ke depan

(Pollard dan Borisy, 2003). Peckham *et al.*, (2001) juga mengungkapkan bahwa peningkatan ekspresi *-aktin* berdampak terhadap peningkatan tonjolan dan peningkatan migrasi sel.

-aktin Berperan sebagai polimerisasi secara heliks untuk membentuk filament aktin (mikrofilamen), yang membentuk sitoskeleton, salah satunya adalah jaringan tiga dimensi dalam sel eukariotik, dan membantu dalam pembentukan sel. Selain itu, *-aktin* juga berperan dalam proses seluler yaitu adhesi sel, migrasi sel / gerakan, sitokinesis, endositosis / eksositosis, pembelahan sel, transduksi sinyal, interalisasi mRNA, dan transkripsi (Pantaloni *et al.*, 2001).

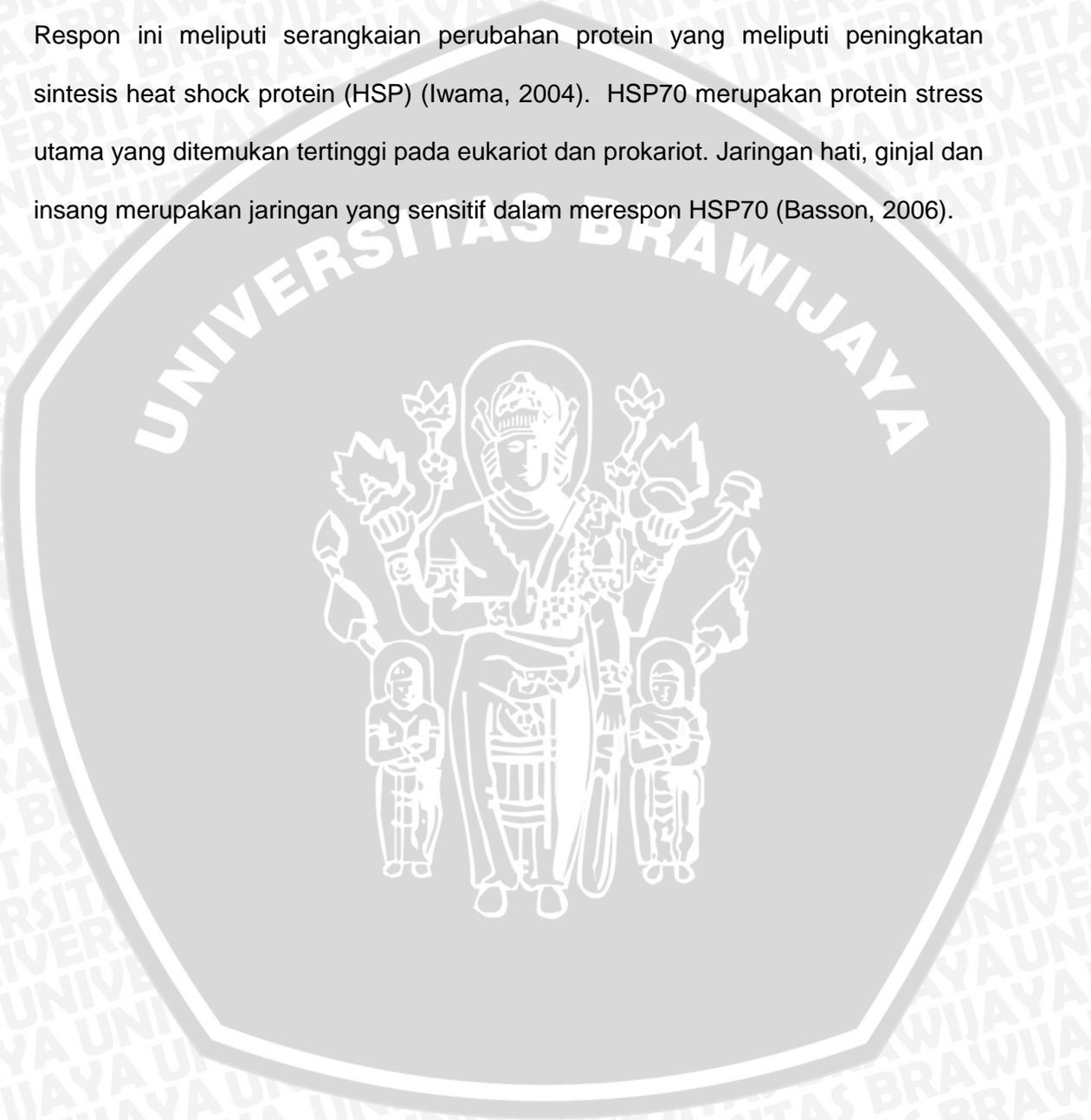
Aktin adalah salah satu protein yang paling banyak berada dalam sel eukariotik vertebrata tingkat tinggi. Aktin memegang peran penting dalam mempertahankan struktur sitoskeleton, motility sel, pembelahan sel, intraseluler, perpindahan dan *contractile processes* (Barallo *et al.*, 1999).

Aktin adalah komponen penting dari sitoskeleton, yang berperan penting dalam berbagai proses seluler, termasuk migrasi sel, pembelahan sel, dan regulasi ekspresi gen. Fungsi aktin yaitu untuk membentuk filamen yang cepat, membentuk dan membongkar sesuai dengan kebutuhan sel (Rubenstein, 1990).

Menurut Santoso (2010), HSP70 merupakan protein utama yang diekspresi sebagai respon terhadap stress lingkungan. Berdasarkan pola sintesisnya, HSP dibagi menjadi HSP *konstitutif* (HSC70) dan HSP *inducible* HSP70 *konstitutif* terdapat dalam sel yang tidak stress, dan penting untuk fungsi *chaperon*. HSP konstitutif ditemukan pada eukariot, termasuk ikan. Transkripsi gen HSP70 menghasilkan mRNA HSP70 yang kemudian keluar dari inti sel dan menuju ribosom untuk menjalankan proses sintesis HSP70. Mekanisme molekuler ini menyebabkan

peningkatan HSP70 pada ikan sebagai respon terhadap paparan stressor lingkungan.

Ikan seperti vertebrata lainnya merespon stressor pada tingkat seluler. Respon ini meliputi serangkaian perubahan protein yang meliputi peningkatan sintesis heat shock protein (HSP) (Iwama, 2004). HSP70 merupakan protein stress utama yang ditemukan tertinggi pada eukariot dan prokariot. Jaringan hati, ginjal dan insang merupakan jaringan yang sensitif dalam merespon HSP70 (Basson, 2006).



3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

Materi dari penelitian ini adalah FPP mikroalga *Spirulina* sp yang diujikan secara klinis pada ikan Kerapu Tikus. Hal ini dilakukan untuk mengetahui efek dari pemberian materi nabati sebagai *imunostimulan* dalam menginduksi system imun pada ikan Kerapu Tikus. FPP didapatkan dari isolasi protein mikroalga *Spirulina* sp menggunakan metode dialisa dan dipurifikasi serta dibuktikan dengan SDS-PAGE. Ikan Kerapu Tikus yang digunakan sebagai hewan uji adalah berukuran \pm 13-15 cm sebanyak 12 ekor yang berasal dari BBAP Situbondo.

3.2 Alat dan Bahan

Beberapa alat yang digunakan untuk menunjang keberhasilan dalam penelitian sangat penting digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: autoklaf, inkubator, timbangan analitik, tabung reaksi, cawan petri, magnetik stirrer, dissecting 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, western blot, thermocycler, 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 ⁿX26G, sarung tangan karet (gloves), masker, aluminium foil, hot stirrer plate, aquarium, heater, aerasi, baki/nampan.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: Mikroalga laut (*Spirulina* sp), ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*), air kolam, tissue, aluminium 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 brilliant blue*) dan *destaining* (methanol: asam asetat glasial aquades 1:2:7), *Ethylendiamine tetraacetate* (EDTA), nitrocelulosa (membran selovan), aquades, alkohol 70%, Sukrosa, DTT (dithiotreitol), Tris-HCl, aquabidest, es batu, Bradford konsentrat, NaCl 0,9%, ethanol, buffer fosfat, buffer ekstrak, PBS Tween, PBS skim, larutan NOG 0,005%, larutan pouncou, Marker (PRO-STAIN™ Prestained Protein Marker).

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Darmono dan Hasan (2002), menyebutkan bahwa metode eksperimen adalah hasil kajian empiris dan menggunakan analisis dengan bantuan statistik untuk menguji hipotesis. Metode eksperimen dalam penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan pengaruh FPP pada *Spirulina* sp dalam menginduksi sistem imun pada ikan Kerapu Tikus.

Metode penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan memberikan FPP dengan dosis yang berbeda pada ikan Kerapu Tikus dengan sebanyak 6 kali pengulangan.

3.4 Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan data yang digunakan dalam penelitian ini mencakup 2 macam data, yaitu data primer dan data skunder.

A. Data Primer

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

- **Metode Survey**

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

- **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 mtode ini menggunakan bantuan alat-alat pemotret, alat perekam suara, pencatat kecepatan dan sebagainya.

- **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 memberi jawaban seperti apa yang ditemukan pada metode survey. Pada metode ini, peneliti dapat mengatur atau memberikan perlakuan tertentu pada suatu variable.

B. Data Skunder

Data sekunder adalah data yang bukan diusahakan sendiri pengumpulannya oleh peneliti atau bersal dari tangan kedua, ketiga dan seterusnya. Misalnya dari biro statistik, majalah, keterangan-keterangan atau publikasi lainnya (Marzuki, 1993). Widi (2010), mengatakan pengumpulan data skunder dapat dibagi menjadi beberapa kategori, antara lain: (1) publikasi lembaga pemerintahan atau non pemerintahan seperti: data sensus, data statistic, survey pkerja, laporan kesehatan, informasi ekonomi, informasi demografi. (2) penelitian terdahulu (3) laporan atau catatan pribadi (4) media massa. Permasalahan dalam menggunakan data skunder adalah ketersediaan data tersebut, format serta kualitas data. Yang harus diperhatikan sebelum menggunakan data sekunder adalah kebenaran data yang valid tidaknya suatu data jangan sampai peneliti terjebak pada opini pribadi atau bias dari data sekunder yang didapatkan. Data sekunder dalam penelitian ini didapatkan dari jurnal, majalah, internet, buku-buku serta instansi pemerintahan yang terkait guna menunjang keberhasilan penelitian.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Sterilisasi Alat

Sterilisasi dilakukan pada alat dan 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 \pm 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.

3.5.2 Kultur Mikroalga *Spirulina sp*

Pelaksanaan kultur mikroalga laut *Spirulina sp* 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 Murni 1 pembuatan media agar pada peptidish steril $\frac{3}{4}$ bagian

- Kultur agar diawali dengan sterilisasi alat dan pembuatan media agar yang sudah diberi pupuk PA (*Pro Analis*)
- disterilisasi menggunakan *Autoclave* kemudian dituang ke petridish steril $\frac{3}{4}$ 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).
- Kulturan agar yang sudah tumbuh dapat dipindahkan ke kulturan 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 $\frac{3}{4}$ bagian kemudian diberi bibit satu koloni. Mikroalga akan tumbuh minimal 7 hari (seminggu)
- 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 *Spirulina sp* dan 3-4 hari untuk species *Chlorophyceae*.

2. Kultur Murni 2 pada Erlenmeyer 1-2 liter (aerasi)

- Sterilisasi media dengan cara direbus hingga mendidih kemudian dituang ke dalam wadah dan ditutup rapat.
- Setelah dingin dilengkapi peralatan aerasi kemudian sterilisasi media dengan menggunakan kaporit 10 ppm an di netralkan dengan thiosulfat 5
- Setelah netral 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

3. Kultur intermediate pada wadah ukuran

- Air laut disterilisi menggunakan kaporit 10 ppm dan dinetralkan dengan thiosulfat 5 ppm, lama sterilisasi min 24 jam.
- Sebelum dilakukan pemberian bibit terlebih dahulu diberi pupuk TG (*Tehcnical 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. Kultur massal

- Bak semen untuk kultur harus dalam kondisi bersih (steril)
- air laut disterilisi menggunakan kaporit 10 ppm dan dinetralkan menggunakan thiosulfat 5 ppm, lama sterilisasi min 24 jam.

- Sebelum ditebari bibit terlebih dahulu diberi pupuk Pertanian dengan dosis Urea 40 ppm, ZA 30 ppm, EDTA 0,5 - 1 ppm, FeCL3 0,5 - 1 ppm, TSP 20 ppm.
- Untuk species diatom pupuknya ditambah silikat. Perbandingan penggunaan bibit dan media adalah 3 :7

3.5.3 Proses Isolasi Protein *Spirulina sp*

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

A. Penggerusan sampel

Adapun proses penggerusan sampel, diantaranya :

- Menimbang *Spirulina sp* sebanyak 80 gr
- Menghaluskan sampel dengan mortar dan alu selama 15 menit
- Menambahkan nitrogen cair \pm 5 ml
- Menghaluskan sampel dengan menggunakan mortar dan alu selama 12 jam
- Menambahkan larutan glisyn dan KCl 15 ml secara bertahap
- Memasukkan glisyn 10 ml kemudian menghaluskan sampel menggunakan mortar dan alu selama 12 jam
- Hasil

B. Sentrifuge

Adapun yahan penggunaan sentrifuge, diantaranya :

- Menimbang hasil penggerusan sampel sebanyak 2 gr
- Memasukkan kedalam eppendoft steril
- Mensentrifuge pada 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4^oC

- Mengambil supernatant
- Memasukkan dalam falcon 50 ml
- Hasil

3.5.4 Elektroforesis Protein dengan Metode SDS-PAGE

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

A. Menyiapkan sampel

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

B. Pembuatan Media/gel elektroforeisi SDS-PAGE

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

- Susunan plate pembentuk gel.
- Buat separating gel 12,5%. Dengan cara:
 - Siapkan tabung polipropilen 50 ml
 - Masukkan 3,125 ml stok akrilamida dalam tabung
 - Masukkan 2,75 ml 1M Tris pH 8,8. Tabung di tutup, lalu tabung digoyang secara perlahan.
 - Masukkan aquabids 1,505ml. tabung ditutup, lalu tabung di goyang secara perlahan
 - Masukkan 75 µl TEMED. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan
 - Masukkan 75 µl APS 10%. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan

- Masukkan 6,25 μ l TEMED. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan
- Segera tuang larutan ke dalam plate pembentuk gel menggunakan mikropipet 1 ml (jaga jangan sampai terbentuk gelembung udara) sampai batas yang terdapat pada plate
- Secara perlahan, tambahkan aquades di atas larutan gel dalam plate agar permukaan gel tidak bergelombang
- 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 menutupi separating gel.
- Sesudah separating gel memadat, siapkan stacking gel 3%. Dengan cara:
 - Siapkan tabung polipropilen 50 ml
 - Masukkan 0,45 ml stok akrilamida dalam tabung
 - Masukkan 0,38 ml 1 M Tris pH 6,8. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan
 - Masukkan aquabides 2,11 ml. tabung ditutup, lalu di goyang-goyang secara perlahan
 - Masukkan 30 μ l SDS 10%. Tabung ditutup, lalu di goyang-goyang secara perlahan
 - Masukkan 5 μ l TEMED. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan

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

Tahapan proses SDS-PAGE ini, diantaranya:

- Memasukkan palte yang sudah berisi gel ke dalam chamber elektroforesis.
- Tuang running buffer sampai bagian atas dan bawah gel terendam.

- Bila terbentuk gelembung udara pada dasar gel atau diantara sumur sampel, maka gelembung tersebut harus dihilangkan.
- Masukkan sampel sebanyak 10-20 μ l (yang kandungan proteinnya minimal 0,1 g dan maksimal 20-40 g) secara hati-hati kedalam dasar sumur gel menggunakan Syringe Hamilton.
- Bilas syringe samapai 3x dengan air atau dengan running buffer sebelum dipakai untuk memasukkan sampel yang berbeda pada sumur gel berikutnya.

D. Running Sampel

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

E. Pewarna (Staining) Media/Gel hasil Elektroforesis sodium Dodesil Polisakarida (SDS-PAGE)

a. Pewarnaan Commasie Brilliant Blue

- Tahap ini diperlukan larutan staining untuk mewarnai protein pada gel dan larutan destaining untuk menghilangkan warna pada gel dan memperjelas pita protein yang terbentuk. Komposisi larutan Staining dan Destaining adalah sebagai berikut :

Tabel 1. Komposisi larutan staining dan destaining

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

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

b. Pewarnaan Perak Nitrat (Silver Stain)

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

- Rendam gel dalam larutan fiksasi selama 30 menit.
- Larutan fiksasi. Di tuang dan gel kemudian direndam dalam larutan sensitizing selama 30 menit.
- Selanjutnya gel di cuci dengan cara direndam dalam aquades selama 5 menit dan di lakukan sebanyak tiga kali
- Gel di rendam dalam pereaksi perak.
- Gel di cuci dengan cara di rendam dalam aquades selama 5 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 warna gelap.
- Reaksi yang berlangsung pada tahap 7 dihentikan dngan cara merendam gel dalam larutan stopping selama 10 menit.
- Gel di cuci dengan cara di rendam dalam aquades selama 5 menit dan di lakukan sebanyak tiga kali.
- Gel direndam dalam larutan pengawet selama 30 menit dan dilakukan sebanyak 2 kali dan gel siap diamati.

3.5.5 Pengukuran Berat Molekul Protein Sampel

- Mengambil setiap sampel protein dan diamati 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 table.

3.5.5 Aklimatisasi Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*)

Ikan uji yang digunakan yaitu ikan Kerapu Tikus yang pengujiannya di lakukan di BBAP Situbondo. Ikan kerapu tikus digunakan berukuran antara 13-15 cm. sumber data penelitian unggulan PT-BOPTN Yanuhar (2013), mengatakan bahwa benih ikan Kerapu Tikus yang baru datang tidak langsung diberikan pakan, karena memerlukan adaptasi terhadap media pemeliharaannya yang baru. Pakan diberikan setelah ikan terlihat sehat dan agresif. Pakan yang digunakan brupa ikan kembung segar yang dicacah hingga ukurannya kecil yang disesuaikan dengan bukaan mulut ikan. Pemberian pakan dilakukan 2-3 hari setelah ikan pertama kali di masukkan di kolam, karena ikan masih di puasakan terlebih dahulu agar nafsu makan terjaga.

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

Pemberian FPP pada ikan Kerapu Tikus dilakukan secara bertahap. Metode penelitian ini mengacu pada Alifudin (2001), yaitu pemberian Crude Fragmen Pigmen Protein pada ikan Kerapu Tikus dilakukan dengan cara *in-vivo*. Proses pengujian dilakukan secara oral yaitu dengan metode sonde. Yanuhar (2009), metode sonde yaitu pemberian pakan kedalam tubuh ikan dengan cara memasukkan makanan tersebut langsung kedalam mulut ikan. Proses penyondean dilakukan sebanyak 6 kali yang berfungsi sebagai imunostimulator selama masa pemeliharaan ikan kerapu tikus pada proses penyondean dilakukan pada hari ke-0, ke-6, ke-9, ke-14, ke-19 dan ke-24. Dosis yang digunakan tiap proses penyondean berbeda disesuaikan dengan berat ikan pada ikan perlakuan.

3.5.6 Uji in-vivo Fragmen Pigmen Protein pada kerapu Tikus

Pengujian dilakukan dengan metode sonde dengan bantuan selang feeding tube sebanyak 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 kepada yanuhar (2011).

Dosis FPP yang diberikan berbeda pada setiap penyondean, yaitu dengan menghitung dosis stok FPP disesuaikan dengan berat badan ikan. Perhitungan dosis ini dilakukan untuk mendapatkan hasil yang optimal dalam melakukan penelitian, diharapkan ikan yang digunakan 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.

3.5.7 Uji in-vivo VNN pada kerapu tikus

Pengeinfeksiian pada Kerapu Tikus menggunakan metode oral, yaitu pakan berupa ikan rucah yang sisipi daging ikan yang sebelumnya sudah positif VNN. Penginfeksiian 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 badan ikan. pengamatan dilakukan setiap jam untuk melihat perubahan tingkah laku mulai dari normal sampai abnormal atau gejala spesifik seperti berenang yang tidak beraturan.

3.5.8 Isolasi Protein Organ Ikan

Ikan Kerapu Tikus yang sudah diberi perlakuan, lalu dilakukan pembelahan. 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 (pH8), 20 mM EDTA, 14 M NaCl) sebanyak 500 μ l. kemudian digerus lagi selama 5 menit, dan disentrifuse 12.000 rpm selama 10 menit engan kondisi suhu 4 $^{\circ}$ C. setelah selesai supernatant diambil dan disimpan pada suhu 4 $^{\circ}$ C sampai dilakukan analisa berikutnya.

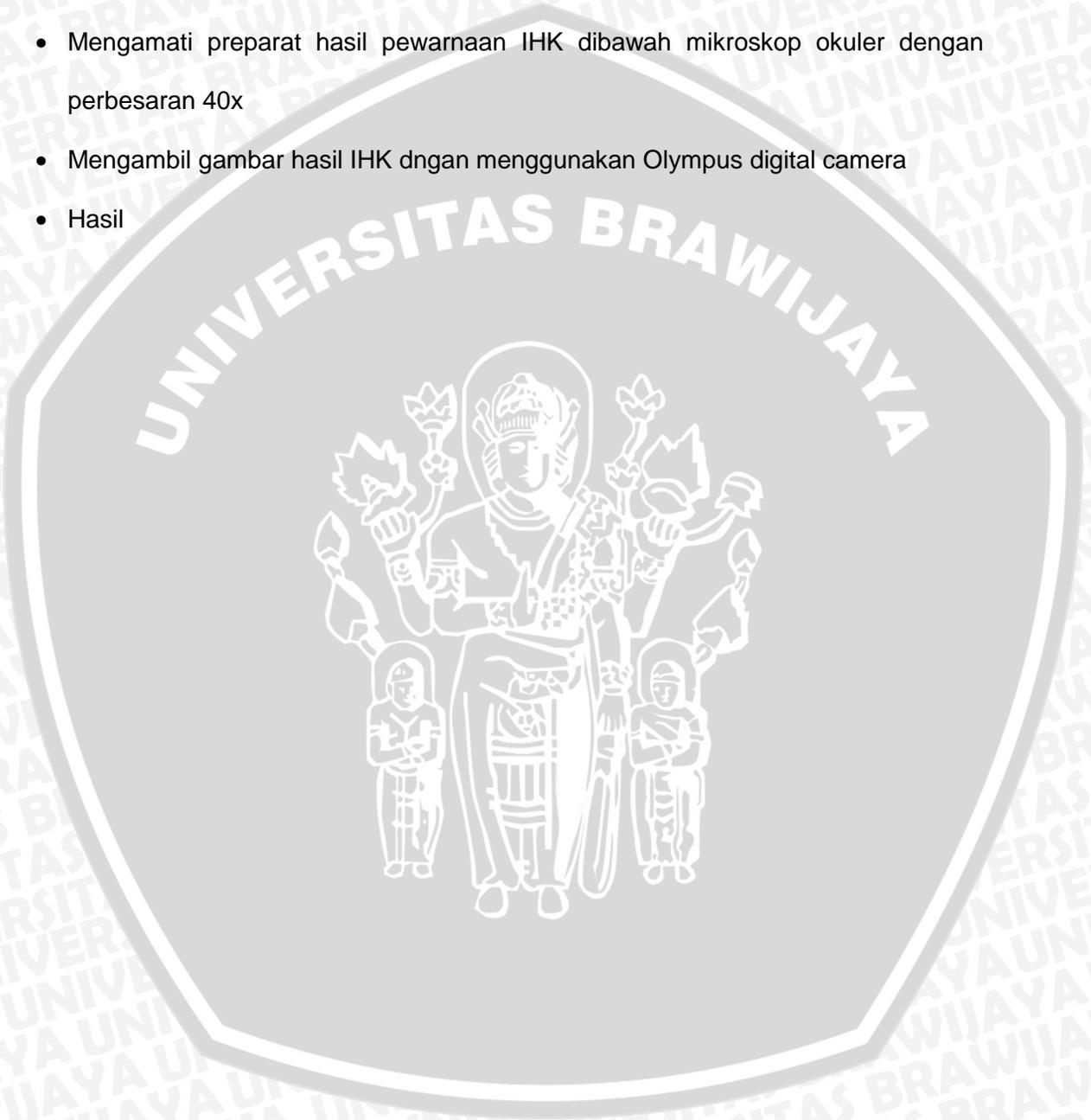
3.5.9 Imunohistokimia (IHC)

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

- Melakukan preparasi jaringan organ yang dipapar imunogenik
- Melakukan deparafinasi preparat dengan xilol 20 μ m selama \pm 5 menit
- Melakukan dehidrasi dengan alkohol absolut sebanyak 2 kali pada konsentrasi 90%, dan 70% masing-masing selama 5 menit.

- Membilas preparasi dengan dionize water 20 µm sebanyak 3 kali ulangan, masing-masing 5 menit
- Menyimpan preparasi dengan refrigerator (Overnight)
- Membilas preparat dengan PBS pH 7,4 20 µm sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit
- Menginkubasi preparat dengan H₂O₂3% selama 10 menit
- Blokin unspezifik protein dan inkubasi dalam 5% PBS dengan 1-2% BSA
- Menyiapkan antibodi primer yang dilarutkan dalam larutan blotto dengan perbandingan 1:1000
- Mencuci dengan antibodi primer antibody monoclonal -aktin (AC 15), (1:100) Overnight 4 °C
- Preparat kemudian dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit
- Keringkan kembali sisa-sisa PBS yang masih menempel dan siapkan antibodi sekunder yang dilarutkan dalam larutan blotto dengan perbandingan 1:200
- Preparat kemudian ditetesi dengan larutan antibody sekunder anti mouseconjugate pajojin dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang
- 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 DH_2O sebanyak 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 dngan menggunakan Olympus digital camera
- Hasil



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kultur mikroalga *Spirulina sp*

Kultur *Spirulina sp* dilakukan di sekala Laboraturium dan masal di BBAP situbondo adapun beberapa tahap yaitu antara lain:

a. Kultur Murni 1

Pembuatan media agar pada wadah peptridish $\frac{3}{4}$ bagian (tanpa aerasi). Kultur awal atau disebut dengan kultur agar dilakukan dengan sterilisasi alat terlebih dahulu, kemudian pembuatan media agar yang sudah diberi pupuk PA (*Pro Analis*) kemudian disterilisasi menggunakan *Autoclave* kemudian dituang ke petridish steril $\frac{3}{4}$ bagian, dilakukan dengan metode gores, lamaya proses pertumbuhan biasanya 1-2 minggu tergantung pemberian pupuk sebagai penyuplai makanan mikroalga *Spirulina sp*. Pupuk yang digunakan adalah pupuk walne yang berfungsi untuk menghasilkan nutrisi serta kepadatan sel yang tinggi. Selanjutnya kulturan alga yang sudah tumbuh pada media dapat diambil satu coloni agar dan diberi air laut steril untuk diamati dibawah mikroskop apabila tidak ada terkontaminasi dengan bakteri atau jamur maka media agar tersebut siap ditanam di petridish steril $\frac{3}{4}$ bagian. Hasil dari pengkulturan tahap awal akan digunakan sebagai bibit (stater) lama pengkulturanya yaitu 6-7 hari.



Gambar 6. Pembuatan media agar (Dokumentasi pribadi, 2015)

b. Kultur Murni 2 erlenmeyer/stoples 1-2 liter

Proses selanjutnya melalui Kultur erlenmeyer/ stoples 1-2 liter atau disebut dengan kultur murni 2, proses ini dilakukan pada media dengan cara direbus hingga mendidih kemudian dituang ke dalam wadah dan ditutup rapat untuk menghindari parasite, bakteri, dan jamur yang melekat pada dinding toples. Setelah dingin dilengkapi peralatan aerasi, kemudian disterilisasi media menggunakan kaporit 10 ppm dan dinetralkan dengan thiosulfat 5 ppm Setelah netral dipupuk dengan dosis 1ml/liter (PA) yaitu pupuk walne dengan 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.



Gambar 7. Kultur Murni 2 stoples 2 liter (Dokumentasi Pribadi, 2015)

Menurut Taw (1990), kisaran nilai pH yang baik untuk pertumbuhan *Spirulina* sp, skala laboratorium adalah 25-35°C, untuk penyinaran menggunakan lampu TL 40 watt 2 buah dan lamaya inkubasi 5-7 hari.

c. Kultur intermediate (kultur semi massal)

Setelah proses kultur murni 2 selanjutnya dilakukan dengan kultur intermedied, proses ini dilakukan dengan menggunakan Air laut disterilisasi menggunakan kaporit 10 ppm dan dinetralkan dengan thiosufat 5 ppm, lama sterilisasi minimal 24 jam. Sebelum dilakukan pemberian bibit terlebih dahulu diberi pupuk TG (*Tehnical*

Growth) dengan dosis 1 ml/l. 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 dengan rata-rata intensitas cahaya matahari 1500-3000 lux dan lama pencahayaan selama 12 jam, pada kultur intermediet lamaya pertumbuhan inkubasi 5-7 hari.



Gambar 8. Kultur Intermediet (Dokumentasi Pribadi, 2015)

Menurut Suminto (2009), pada sistem semi terbuka dengan skala semi massal memerlukan perhatian yang cukup serius, terutama dalam penyediaan unsur hara, di dalam media hidup mikroalga *Spirulina* sp. Unsur hara/nutrien dalam media kultur ini sangat penting untuk menjaga kuantitas, kualitas dan kestabilan produksi sel. Pemilihan pupuk komposisi bahan nutrient dalam media kultur *Spirulina* sp diperlukan untuk memperkaya kandungan nutrisi, disamping itu untuk menjaga kestabilan produksi sel tersebut. Produktivitas sel *Spirulina* sp dipengaruhi oleh delapan komponen besar faktor media, antara lain adalah intensitas cahaya, temperature, ukuran inokulasi, muatan padatan terlarut, salinitas, ketersediaan makro dan mikronutrien (C, N, P, K, S, Mg, Na, Cl, Ca, dan Fe, Zn, Cu, Ni, Co, dan W).

d. Kultur Massal

Setelah proses kultur intermediet selanjutnya dilakukan dengan kultur massal (kultur terakhir), proses ini dilakukan dengan menggunakan Bak semen yang dalam kondisi bersih (steril), selanjutnya air laut disterilisi dengan menggunakan kaporit 10 ppm dan dinetralkan menggunakan thiosulfat 5 ppm, agar bak semen tersebut terhindar dari bakteri dan jamur yang menempel pada dinding bak, lama sterilisasi minimal 24 jam. Sebelum ditebari bibit terlebih dahulu diberi pupuk Pertanian dengan dosis Urea 40 ppm (untuk pembelahan sel), ZA 30 ppm, EDTA 0,5 - 1 ppm (untuk menstabilkan pH), FeCL₃ 0,5 - 1 ppm (penyangga pH dan pembentukan klorofil), TSP 20 ppm. Yang bertujuan untuk memperbanyak sel, Untuk species diatom pupuknya ditambah silikat. Perbandingan penggunaan bibit dan media adalah 3 :7 pada kultur masal lamaya inkubasi selama 5-7 hari



Gambar 9. Pembuatan kultur masal *Spirulina* sp (Dokumentasi Pribadi, 2015)

Menurut Wijaseno, (2011) Pada kultur masal pertumbuhan mikroalga *Spirulina* sp membutuhkan unsur makronutrien dan mikronutrien untuk menunjang kehidupan dan pertumbuhan *Spirulina* sp, tetapi unsur mikronutrien pada pertumbuhan mikroalga dibutuhkan dalam jumlah yang sedikit. Sedangkan untuk mencegah perubahan pH media dalam kultur alga maka perlu ditambahkan EDTA (*Ethyl Diamine Tetra Acetat*) yang berfungsi sebagai *buffer* sehingga pH menjadi stabil.

4.2 Kandungan Pupuk Walne dalam Pertumbuhan *Spirulina* sp

Pupuk anorganik merupakan unsur-unsur esensial bagi pertumbuhan tanaman baik tingkat tinggi maupun rendah. Istilah pupuk umumnya berhubungan dengan pupuk buatan. Yang tidak hanya berisi unsur hara tanaman dalam bentuk unsur nitrogen, tetapi juga dapat berbentuk campuran yang memebrikan bentuk-bentuk ion dari unsur hara yang dapat diabsorbpsi oleh tanaman. Untuk menunjang pertumbuhan tanaman secara normal diperlukan minimal 16 unsur didalamnya dan harus ada 3 unsur mutlak yaitu nitrogen, fosfor, dan kalium (Adikhari, 2004).

Berdasarkan asalnya pupuk dapat dibedakan menjadi pupuk organik (pupuk alami) yang dikenal dengan pupuk kandang, pupuk hijau dan pupuk gambut. Sedangkan pupuk anorganik (pupuk buatan) merupakan semua jenis pupuk yang berasal dari bahan kimia anorganik yang dibuat oleh pabrik. Salah satunya yaitu pupuk walne yang merupakan pupuk yang memiliki komposisi nutrien yang lengkap (syamdid, 2006).

Adapun komponen yang tersusun dalam pupuk walne pada pengkulturan mikroalga *Spirulina* sp dapat dilihat pada tabel dibawah ini adalah sebagai berikut:

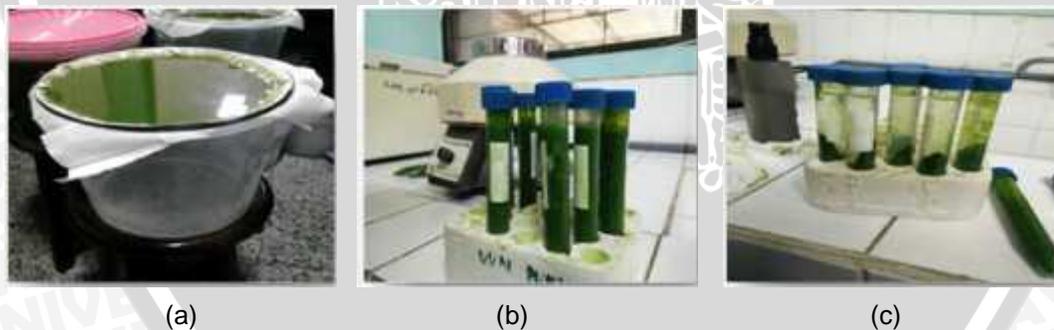
Tabel 2. Tabel Komposisi Pupuk Walne

Komposisi pupuk walne dan vitamin	Jumlah
FeCl ₂ 6H ₂ O	1,3 g
MnCl ₄ H ₂ O	0,36 g
H ₃ BO ₃	33,60 g
NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	20 g
NaNO ₃	100 g
Na ₂ .EDTA	45 g
Aquadest	100 ml
B ₁	100 mg
B ₁₂	5 mg

Pada pertumbuhan mikroalga *Spirulina* sp membutuhkan pupuk dan vitamin sebagai media utama untuk menunjang kehidupan dan pertumbuhan, vitamin yang digunakan untuk pertumbuhan sel *Spirulina* sp yaitu vitamin B.

4.3 Isolasi FPP *Spirulina* sp

Endapan *Spirulina* sp yang diperoleh dari proses kultur massal di BBAP Situbondo adalah sebanyak \pm 2400 gram basah. proses isolasi ini mengacu pada Laporan Penelitian Unggulan PT-BOPTN Yanuhar (2013) dan mengacu pada metode Yanuhar (2015). *Spirulina* sp disaring dengan menggunakan kertas saring yang tipis setelah selesai disaring terdapat padatan mikroalga *Spirulina* sp dipindahkan kedalam falkon steril, yang masing-masing falcon memiliki volume 45 ml. padatan *Spirulina* sp yang telah di masukkan kedalam falcon, di sentrifugase dengan kecepatan 4000 rpm, untuk memisahkan kadar air yang terdapat pada bubuk *Spirulina* sp. selanjutnya disimpan kedalam deep freezer -80°C , agar kualitas dari padatan *Spirulina* sp tetap terjaga.



Gambar 10. (a) penyaringan mikroalga, (b) endapan *Spirulina* yang didalam valkon ukuran 50 ml, (c) endapan dari hasil sentrifugase 4000 rpm (dok. Pribadi, 2015)

Isolasi protein dimulai dengan 2 tahapan larutan yang berbeda yaitu gysin dan buffer, masing-masing larutan tersebut untuk mengetahui hasil supernatant protein

Spirulina sp. Isolasi protein dimulai dengan mengambil sampel *Spirulina* sp sebanyak 5 gram basah untuk larutan gysin dan buffer.

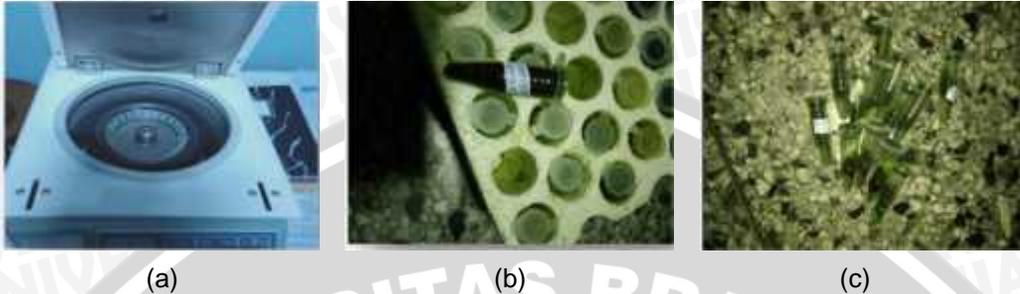
Penggerusan padatan *Spirulina* sp sebanyak 5 gram basah yang dituangkan ke mortar di gerus dengan menggunakan alu dengan dituangkan nitrogen cair sebanyak kurang lebih 5 ml, nitrogen cair mempunyai sifat yang dingin sehingga dapat membekukan sampel, tujuannya adalah ketika sampel dihaluskan kembali menggunakan alu, dinding sel akan ikut terpecah dan protein akan keluar. dan selama proses penggerusan, di tambahkan gysin dan buffer sebanyak 6 kali secara bertahap, Pemberian gysin dan bufer adalah sebagai pelarut, setelah di beri larutan gysin dan buffer Sampel dihaluskan kembali hingga mengeluarkan gelembung pada permukaan sampel *Spirulina* sp yang digerus dan berubah warna menjadi hijau kebiruan agak terang atau struktur sampel menjadi encer. Yang menunjukkan sampel tersebut mengeluarkan FPP, dan siap untuk di sentrifugase.



Gambar 11. (a) mikroalga yang ditimbang sebanyak 5 gr, (b) pemberian nitrogen cair, (c) penggerusan mikroalga *Spirulina* sp (dok. Pribadi, 2015).

Selanjutnya sampel yang telah selesai digerus adalah berupa isolate sebanyak 5 appendorf berukuran 2 ml hasil tersebut kemudian dimasukkan kedalam appendorf steril berukuran 2 ml yang di sentrifugase dengan kecepatan 12.000 rpm, suhu 4°C selama 10 menit yaitu untuk memisahkan supernatan larutan yang berwarna bening yang terdapat pada bagian atas dengan pelet yaitu pada bagian

yang menggumpal dan mengendap di bawah efendorf, selanjutnya pemisahan supernatan dan pelet bisa dilihat pada gambar di bawah ini



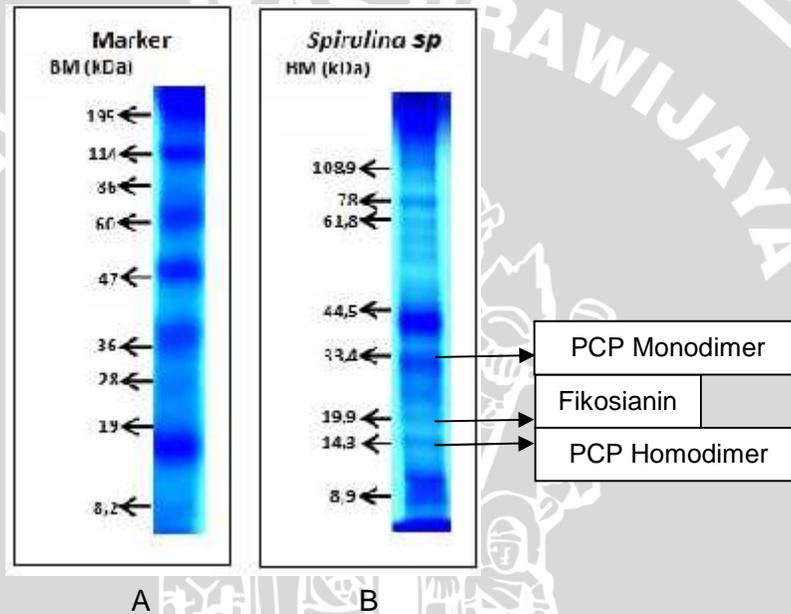
Gambar 12. (a) proses sentrifugase dingin, (b) hasil pengerusan di masukan ke avendoft 2 ml, (c) hasil supernatant dan pellet (dok. Pribadi, 2015)

Hasil supernatant dan pelet di pindahkan kedalam kantong selofon yang bertujuan untuk menyaring protein murni yang terdapat pada supernatant tersebut. Proses tersebut untuk merubah hasil isolate menjadi FPP murni.

4.4 Profil FPP *Spirulina sp* Menggunakan Metode SDS-PAGE

Analisis SDS-PAGE merupakan prosedur dasar dalam analisis protein, SDS-PAGE berfungsi untuk menilai tingkat kemurnian protein (widiyarti, 2011). Analisis FPP pada mikroalga *Spirulina sp* 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 *Spirulina sp* dengan Fragmen Pigmen Proteinnya. Metode *Sodium Dodesyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)* digunakan untuk membuktikan bahwa hasil dari ekstraksi mikroalga laut *Spirulina sp* 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. Dari hasil SDS-PAGE protein *Spirulina* sp menggunakan pewarnaan *Comasion Brilliant Blue*, terdapat 9 pita protein pada marker yang dimulai dari 8,2 kDa, 19 kDa, 28 kDa, 36 kDa, 47 kDa, 60 kDa, 86 kDa, 114 kDa, dan 195 kDa pengamatan profil FPP mikroalga laut *Spirulina* sp dapat dilihat pada gambar dibawah ini.



Gambar 13. A. Marker (PRO-STAIN™) B. Hasil elektroforesis pita crude protein *Spirulina* sp dengan SDS-PAGE dengan pewarnaan comasion Brilliant Blue (Sumber: Laporan Penelitian Unggulan PT-BOPTN, 2015).

Marker yang digunakan dalam perhitungan pita protein FPP *Spirulina* sp adalah pewarnaan comasion Brilliant Blue, dari hasil elektroforesis SDS-PAGE didapatkan 8 pita protein dengan berat molekul masing-masing berkisar antara 108,9 kDa, 78 kDa, 61,8 kDa, 44,5 kDa, 33,4 kDa, 19,7 kDa, 14,3 kDa dan 8,9 kDa. Dari hasil di atas menyatakan bahwa ada 2 jenis pita protein FPP *Spirulina* sp, yaitu *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) berat molekul 14,3 kDa dan 33,4 kDa pita

protein berbentuk pendek (homodimer) dengan berat molekul 14,3 kDa dan pita protein berbentuk panjang (monomer) dengan berat molekul 33,4 kDa indikasi tersebut didasarkan pada penelitian protein mikroalga bahwa protein dengan berat molekul 14,3 kDa dan 33,4 kDa merupakan PCP (Weis *et al.*, 2002).

. Menurut 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.

Menurut Junita 2003, menyebutkan bahwa PCP berfungsi sebagai antigen permukaan yang menstimulan respon kekebalan fisik dan non fisik pada organisme vertebrata salah satunya adalah ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes alvitelis*).

Sedangkan *Phycocyanin* (PC) dengan berat molekul 19,9 kDa hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Satyantini, *et al.* (2013) dan Minkofa, *et al.* (2003) yang menyebutkan pada masing-masing penelitian dengan berat molekul 19,23 kDa dan 19,5 kDa. Adapun komposisi FPP diantaranya adalah khlorofil-a, *Xanthophyll*, *Phycoocyanin* dan *Karetenoid* (Krisdawana dan Hardiyanto, 2011). Kandungan karetenoid terdiri dari *-karoten*, *Astaxantin*, *Lutein*, *zeaxantin* dan *Kriptoxantin* (Hanna *et al.*, 2003).

Phycocyanin merupakan salah satu dari tiga pigmen klorofil dan karetenoid yang mampu menangkap sinar radiasi yang paling efisien (Hall dan Rao, 1999). Kandungan *Phycocyanin* tersebut dapat berfungsi sebagai antioksidan, antiviral dan imunimodulator (Belay *et al.*, 1993). Imunostimulan memiliki fungsi meningkatkan sistem imun non spesifik sehingga dapat melindungi dari serangan penyakit (Jha *et al.*, 2007). Menurut Suwanto *et al.* (2009), *ficocyanin* juga mampu menghambat

pertumbuhan sel carcinoma, sehingga mampu memberi efek antioksidan dan mencegah tumor.

Ikan lele *Chanel cettfish* yang di beri pigmen spirulina dapat meningkatkan sistem imun non spesifik seluler seperti kemotaksis dan fagositosis (Duncan dan klaseus, 1996). Nilai aktivitas fagositosis yang tinggi menunjukkan bahwa ikan memiliki kemampuan memproduksi sel-sel fagosit lebih banyak dalam darah, sehingga ketika terjadi serangan mikroorganisme patogen, sel fagosit siap melakukan proses fagositosis. Fagositosis yang efektif pada invasi kuman dini akan mencegah timbulnya infeksi penyakit.

Dari studi sebelumnya, beberapa peneliti telah menggunakan tepung *Spirulina* sp atau ekstrak air panas *Spirulina* sp untuk mempelajari pengaruhnya terhadap sistem imun. Bioaktif fikosianin dan polisakarida larut air dari *Spirulina* sp bertanggung jawab untuk meningkatkan aktivitas pertahanan biologi melawan infeksi penyakit dan menurunkan inflamasi alergi melalui fungsi-fungsi sistem imun mukosa (Balachandran *et al.*, 2006). Dengan pemberian FPP berupa Fikosianin dan PCP pada ikan Kerapu Tikus ini akan meningkatkan sistem imun melalui mekanisme imunostimulan seperti yang dijelaskan diatas.

4.5 Uji In Vivo pada Ikan Kerapu Tikus (*Cormileptes altivelis*)

Pemeliharaan ikan Kerapu Tikus dilakukan di BBAP Situbondo selama 23 hari. Panjang tubuh ikan rata-rata 13-15 cm pada ukuran tersebut ikan tergolong dalam fase larva, dimana ikan belum mempunyai sistem imun yang lengkap. Pengujian in-vivo FPP pada ikan kerapu tikus dilakukan selama 27 hari. Ikan kerapu tikus dengan berat tubuh rata-rata 46 gr. Isolat FPP yang didapatkan melalui proses isolasi selanjutnya diujikan pada ikan Kerapu Tikus sebanyak 6 kali dengan pemberian

dosis masing-masing 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).

Pemberian FPP dilakukan dengan metode sonde. Menurut Yanuhar (2009), metode sonde merupakan pemberian makanan kedalam tubuh ikan dengan cara memasukkan makanan tersebut langsung kedalam mulut ikan.

Sudarsono (2013) mengatakan bahwa selama pemeliharaan ikan kerapu tikus ikan diberi pakan rucah yang disesuaikan dengan bukaan mulut ikan yang masih berusia larva, PCP diberikan ketubuh ikan sebagai materi hayati untuk meningkatkan respon kekebalan tubuh, apabila PCP masuk kedalam tubuh ikan maka imunitas akan merangsang makrofak untuk memproduksi interleukin yang akan meningkatkan sel limfosit yang kemudian akan membelah menjadi sel limfosit T dan B.

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 3. Perlakuan atau respon ikan selama pemeliharaan

Perlakuan	Aktivitas	Warna Tubuh	Respon	Pertumbuhan	Keterangan
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 cenderung lebih kecil karena infeksi virus

Pada tabel 3 mengatakan bahwa terjadi perbedaan respon ikan pada setiap perlakuan, pada ikan kontrol dalam kondisi normal ditandai dengan aktivitas berenang diseluruh kolom aquarium terkadang bergerombol di aerasi, warna tubuh cerah respon baik terhadap gerakan dan pakan, pertumbuhannya normal di tandai dengan berat badan perhariya 0, 97 gr. Berbeda dengan perlakuan ikan yang di beri FPP Aktifitasnya sama dengan ikan kontrol warna cenderung putih cerah keabu-abuan responya sama dengan ikan kontrol pertumbuhannya sedikit menurun ditandai dengan berat badan perhariya 0,50 gr dibandingkan dengan ikan kontrol Hal ini dinyatakan 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.

Menurut Rachmawati, *et al.* (2010) stres merupakan respon bertahan pada hewan terhadap penyebab stres (stressor). Berbagai sumber stres baik berupa faktor lingkungan (suhu, cahaya, pemeliharaan, penangkapan dan transport) maupun faktor biotik seperti infeksi mikroorganisme akan mempunyai dampak negatif terhadap perubahan fisiologis tubuh hewan. Perubahan tersebut meliputi, gangguan pertumbuhan, produktivitas dan semua aktivitas yang merupakan akibat dari mekanisme homeostasis dalam tubuh yang terganggu.

Menurut Santoso (2010), HSP70 merupakan protein utama yang diekspresi sebagai respon terhadap stress lingkungan. Berdasarkan pola sintesisnya, HSP dibagi menjadi HSP konstitutif (HSC70) dan HSP *inducible* HSP70 konstitutif terdapat dalam sel yang tidak stress, dan penting untuk fungsi *chaperon*. HSP konstitutif ditemukan pada eukariot, termasuk ikan. Transkripsi gen HSP70 menghasilkan mRNA HSP70 yang kemudian keluar dari inti sel dan menuju ribosom untuk menjalankan proses sintesis HSP70. Mekanisme molekuler ini menyebabkan peningkatan HSP70 pada ikan sebagai respon terhadap paparan stressor lingkungan.

Pada perlakuan ikan dengan penginfeksi VNN memberikan perubahan yang cukup signifikan. Hal tersebut dapat dilihat dari aktifitas berenang didasar aquarium dan sering bergerombol diaerasi, warna tubuh cenderung coklat tua agak hitam, responnya menurun pada gerakan maupun pakan, pertumbuhannya mati pada minggu ke 2 selama pemeliharaan. Perubahan 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 tingkah laku 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 ini dilihat dengan aktifitas aktif berenang hampir diseluruh kolom aquarium, terkadang bergerombol di aerasi, warna tubuh putih keabu-abuan, respon terhadap gerakan kurang baik tetapi respon pakan normal. Hal ini diindikasikan bahwa meskipun ikan diinfeksi VNN ikan bisa bertahan sampai akhir masa pemeliharaan. Kondisi ini diasumsikan pemberian FPP mampu membentuk 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. Hal 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).

Dari semua perlakuan terlihat beda nyata pada perkembangan dan pertumbuhan berat ikan Kerapu Tikus terutama pada pembeian FPP yang membuat pertumbuhan ikan lebih tinggi jika dibandingkan dengan ikan dengan perlakuan VNN dan ikan dengan perlakuan VNN + FPP. Hal tersebut diduga karena penambahan fikosianin pada pakan mampu memberikan kebutuhan protein yang optimum

(46,59%) dan kualitas protein yang lebih baik dengan adanya penambahan *phyco cyanin*. Beberapa ikan karnivora seperti ikan salmon, *percid*, dan ikan pipih (*flatfish*) air laut menunjukkan pertumbuhan optimum ketika separuh energi pakannya berasal dari protein. Untuk spesies ini umumnya protein harus disediakan sekitar 40-50% untuk energi pakan (Jobling 1994).

Ikan kerapu termasuk jenis ikan karnivora laut yang juga membutuhkan protein tinggi dalam pakannya. Hal tersebut senada dengan laporan Williams, *et al.* (2004) bahwa kandungan protein pakan untuk ikan kerapu bebek adalah tidak kurang dari 44% untuk pertumbuhan optimum. Pada penelitian ini kebutuhan protein ikan kerapu bebek telah terpenuhi. Namun, dengan adanya penambahan *phyco cyanin* memberikan pertumbuhan yang lebih baik dibandingkan tanpa penambahan *phyco cyanin*.

Pada kegiatan budidaya ikan, metode yang sering digunakan untuk menangani infeksi patogen adalah penggunaan antibiotik dan kemoterapeutik secara terbatas. Namun, selain memiliki efektivitas rendah dan mahal, penggunaan bahan-bahan kimia dapat menyebabkan akumulasi di lingkungan dan atau dalam tubuh ikan yang secara potensial dapat mengancam kesehatan konsumen serta lingkungan. Dampak yang akan ditimbulkan dari akumulasi pada tubuh ikan secara langsung akan menimbulkan akumulasi juga pada tubuh konsumen ikan tersebut yang tidak lain adalah manusia. Strategi alternatif yang dapat diterapkan adalah pengaturan nutrisi dengan memanfaatkan respon imun dan resistensi penyakit yang terdapat pada tubuh ikan. Beberapa bahan imunostimulan seperti FPP Mikroalga laut *Spirulina* sp secara positif mampu memberikan pengaruh terhadap respon non spesifik pada sistem imun beberapa jenis ikan (Suprayudi, *et al.*, 2006). Hal ini dibuktikan dengan ikan kerapu setelah penginfeksi VNN ikan langsung mengalami

kematian pada minggu ke 2 sedangkan ikan dengan perlakuan pemberian VNN dan FPP masih mampu bertahan hidup dan mengalami penambahan berat badan. Hal ini membuktikan bahwa pemberian FPP dalam tubuh ikan yang terserang VNN mampu memberikan dampak dalam pertumbuhan tubuh ikan.



4.6 Hasil Uji Imunohistokimia (IHC) PCP *Spirulina sp* Terhadap Organ Ikan

Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*)

Analisa histopatologi merupakan metode yang dapat digunakan sebagai biomarker untuk mengetahui kondisi kesehatan ikan melalui perubahan struktur yang terjadi pada organ-organ yang menjadi sasaran utama dari penyakit infeksi dan pengobatan dengan antibiotik seperti insang, hati, ginjal dan sebagainya. Selain itu, penggunaan biomarker histopatologi dapat digunakan dalam memonitoring perubahan pada jaringan organ dengan mengamati organ-organ tersebut yang memiliki fungsi penting dalam metabolisme tubuh sehingga dapat digunakan sebagai diagnosis awal terjadinya gangguan kesehatan pada suatu organisme (Sukarni, *et al.*, 2012).

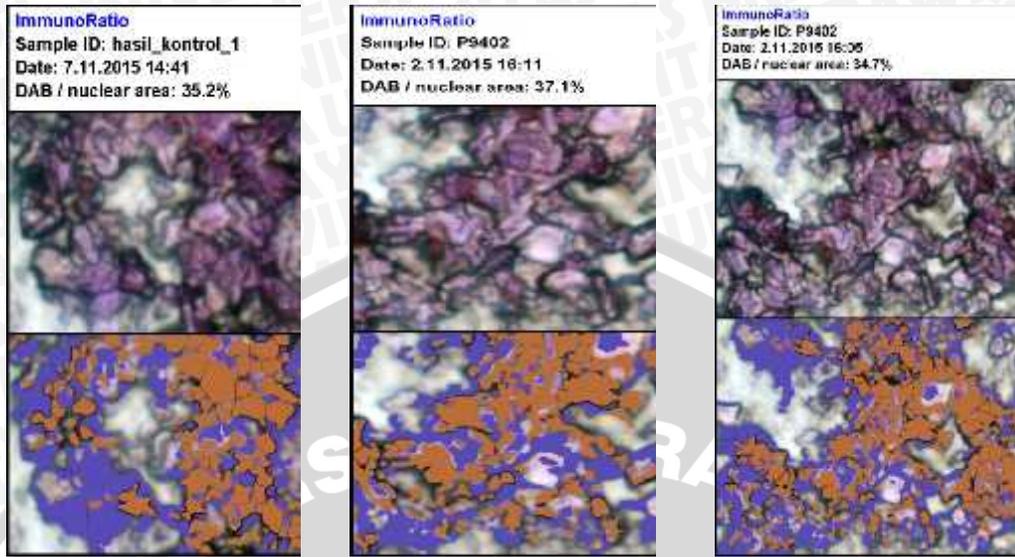
Imunohistokimia adalah metode untuk mendeteksi protein di dalam sel suatu jaringan dengan menggunakan prinsip pengikatan antara antibodi dan antigen pada jaringan hidup. Dalam penelitian ini menggunakan metode IHC tidak langsung, atau disebut *indirect method* yang menggunakan dua jenis antibodi yaitu primer dan sekunder. Antibodi primer (tidak berlabel) berfungsi untuk mengenali antigen yang diidentifikasi pada jaringan antibodi primer yang digunakan adalah antibody monoklonal *-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), IHC digunakan untuk mendeteksi keberadaan antigen spesifik didalam suatu sel jaringan dengan menggunakan 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 antigen-antibodi

dapat dilihat dengan munculnya warna coklat 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 salah satu organ kerapu tikus pada uji imunohistokimia yaitu metode untuk mendeteksi protein di dalam sel suatu jaringan dengan menggunakan prinsip pengikatan antara antibodi dan antigen pada jaringan hidup. Untuk perlakuan ada 4 macam yaitu Organ tanpa perlakuan (Kontrol). Organ perlakuan FPP, Organ perlakuan VNN 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 *-aktin* pada ikan normal pada umumnya. Berikut ini hasil IHK dari organ tanpa perlakuan atau kontrol bisa dilihat pada gambar dibawah ini.



A. DAB 35,2 % B. DAB 37,1% C. DAB 34,7%

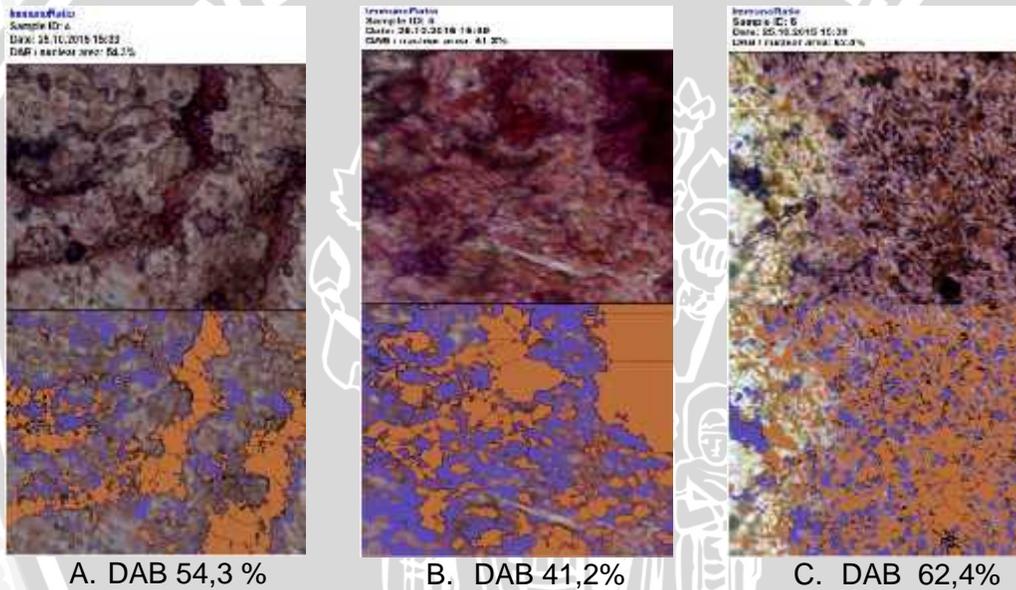
Gambar 14. Hasil pengamatan organ hati tanpa perlakuan (control), Pengulangan A. *ImmunoRatio* I, B. *ImmunoRatio* II B. *ImmunoRatio* III

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 35,2 %, *ImmunoRatio* II prosentase DAB sebesar 37,1% dan *ImmunoRatio* III adalah 34,7 %. Nilai DAB menunjukkan bahwa keberadaan gen target β -aktin pada ikan kontrol rata-rata sebesar 35,66 % 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.

melihat kerapatan pixelnya, semakin kecil angka semakin pekat. Penilaian histogram disini didasarkan pada intensitas pixel, angka 0 mewakili angka paling gelap/pekat, sedangkan 255 menunjukkan angka rendah terbagi dalam 4 zona, yaitu 0-60 positif kuat, 61-120 positif, 121-180 positif lemah, dan 181-235 negatif, sedangkan zona 235-255 tidak berlabel karena pada zona tersebut merupakan jaringan lemak yang tidak dapat menunjukkan terjadinya ekspresi tertinggi.

Perlakuan yang kedua adalah Organ hati perlakuan FPP. Berikut ini adalah hasil IHC yang bisa dilihat pada gambar dibawah ini.

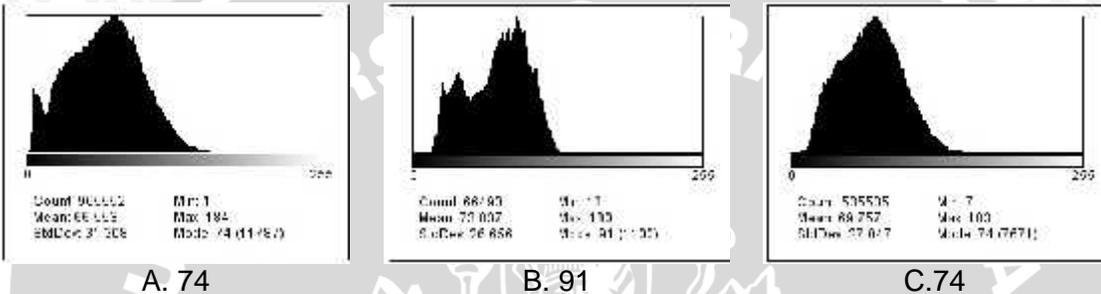


Gambar 17. Hasil pengamatan organ hati perlakuan FPP, Pengulangan A. *ImmunoRatio* I, B. *ImmunoRatio* II B. *ImmunoRatio* III

Pada organ hati ikan perlakuan pemberian *crude protein* FPP mikroalga *Spirulina* sp. dapat dilihat bahwa tampak terdapat perbedaan jika dibandingkan dengan hasil profil organ hati ikan tanpa perlakuan (kontrol). Pada gambar 16 diatas terlihat bahwa hasil DAB *ImmunoRatio* I sebesar 54,3 %, *ImmunoRatio* II sebesar 41,2 % dan *ImmunoRatio* III sebesar 62,4 %. Pada gambar diatas terlihat adanya warna kuning kecoklatan atau warna orange yang cukup banyak, yang menandakan

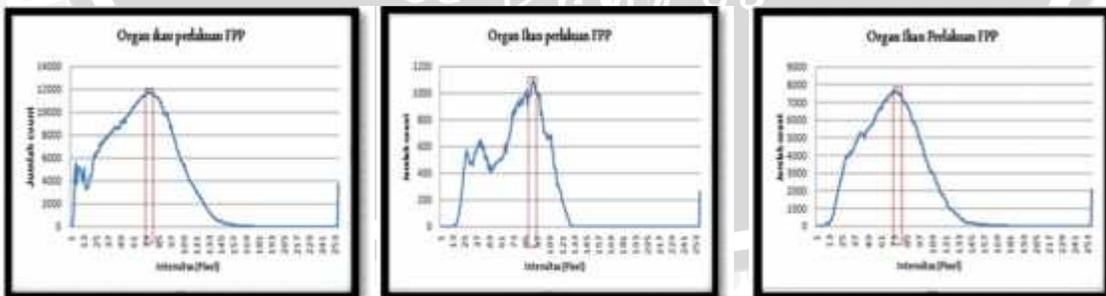
peningkatan dari ikatan antara antigen dengan antibodi yang diberikan. Hal tersebut menyatakan bahwa pada organ hati perlakuan pemberian *crude protein* FPP mikroalga *Spirulina* sp terdapat ekspresi *-aktin* rata-rata sebesar 31,36%.

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



A. 74 B. 91 C.74
Gambar 18. Histogram menggunakan software image J pada organ hati perakuan (FPP)

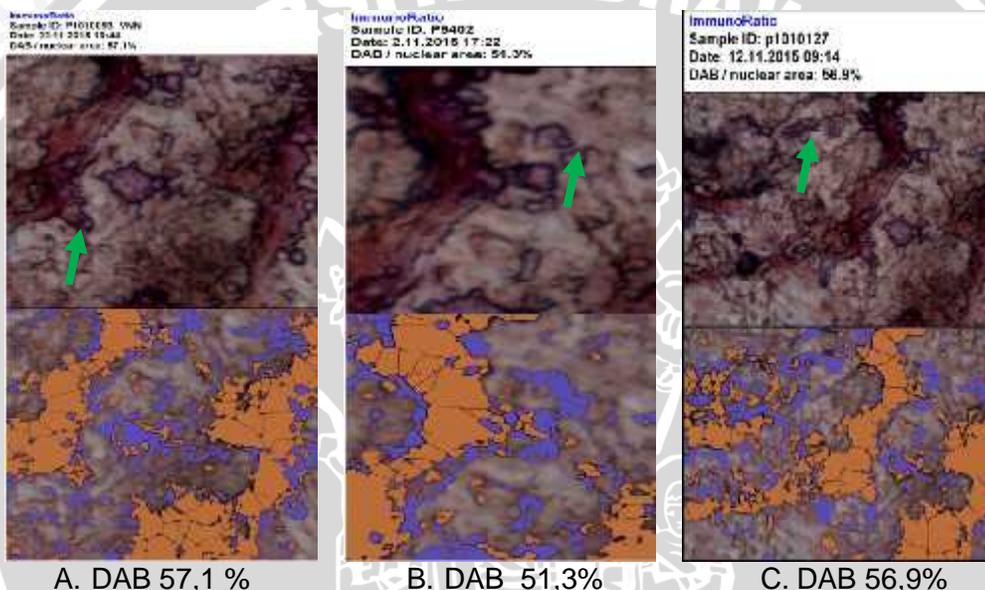
Gambar 17 diatas merupakan hasil image J dari organ hati perlakuan (FPP) yang menunjukkan data secara kuantitatif melalui nilai mean yang muncul pada histogram gambar diatas. Gambar 17a Pengulangan I menunjukkan nilai mean sebesar 74, gambar 17b pengulangan II nilai mean 91, dan gambar 17c pengulangan III nilai mean sebesar 74, gambar intensitas ekspresi gen target *-aktin* pada organ hati tanpa perlakuan (FPP) disajikan dalam bentuk grafik:



A. Awal B. Pengulangan I C. Pengulangan II
Gambar 19. Grafik histogram menggunakan software image J pada organ hati tanpa perakuan (FPP)

Grafik diatas menggambarkan aktifitas gen target *-aktin* pada organ hati perlakuan FPP pada grafik 1 54,3%, pada grafik 2 pengulang I dengan nilai 41,2%, dan pada grafik 3 pengulangan II dengan nilai 62,4% dari nilai tersebut nilai modenyanya berkisar antara 41,2 – 62,4. Dengan demikian ikatan antara antigen dengan antibodi termasuk dalam kategori positif.

Perlakuan yang ketiga adalah Organ hati perlakuan VNN. Berikut ini adalah hasil IHK yang bisa dilihat pada gambar dibawah ini.



A. DAB 57,1 %

B. DAB 51,3%

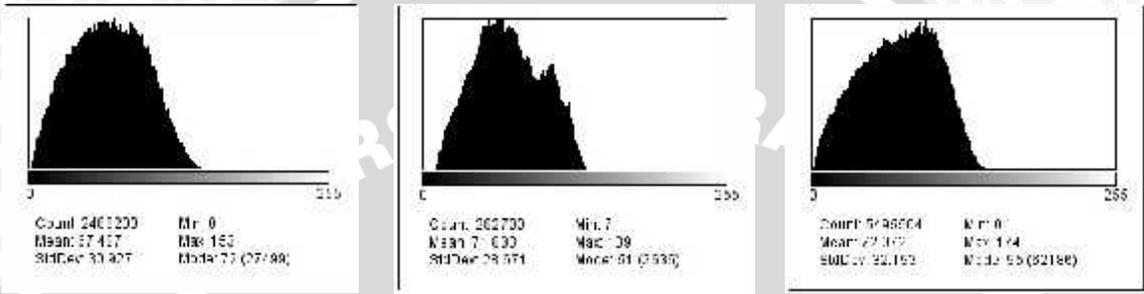
C. DAB 56,9%

Gambar 20. Hasil pengamatan organ hati perlakuan VNN, Pengulangan A. *ImmunoRatio* I, B. *ImmunoRatio* II B. *ImmunoRatio* III

Kerusakan sel dan jaringan terlihat pada organ hati ikan uji yang diinfeksi VNN. Dilihat dari sel-sel hepatosit mengalami degenerasi yang diikuti piknotik yang merupakan tahap awal terjadinya nekrosis. Sel piknotik memiliki ciri yang berkerut dan berwarna gelap akibat teriveksinya VNN (Panah hiau). Hasil analisa menggunakan immuratio menunjukkan presentasi *-aktin* pada gambar 19a 57,1%, pada gambar 19b 51,3%, dan pada gambar 19c 56,9%. Hal tersebut menunjukkan bahwa, tubuh ikan merespon kehadiran VNN dengan meningkatkan ekspresi *-aktin*.

Peningkatan tersebut ditujukan untuk mengorganisir dan meningkatkan sistem imun pada tubuh ikan.

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



A. 72%

B. 51%

C.95%

Gambar 21. Histogram menggunakan software image J pada organ hati perakuan (VNN)

Gambar 21 diatas merupakan hasil image J dari organ hati perlakuan (VNN) yang menunjukkan data secara kuantitatif melalui nilai mean yang muncul pada histogram gambar diatas. Gambar 20a Pengulangan I menunjukkan nilai mean sebesar 72, gambar 20b pengulangan II nilai mean 51, dan gambar 20c pengulangan III nilai mean sebesar 55, keberadaan gen target *-aktin* juga dalam kategori positif karena berdatap pada kisaran mean sekitar 51-95.

Berikut ini gambar intensitas ekspresi gen target *-aktin* pada organ hati VNN:



A. Awal

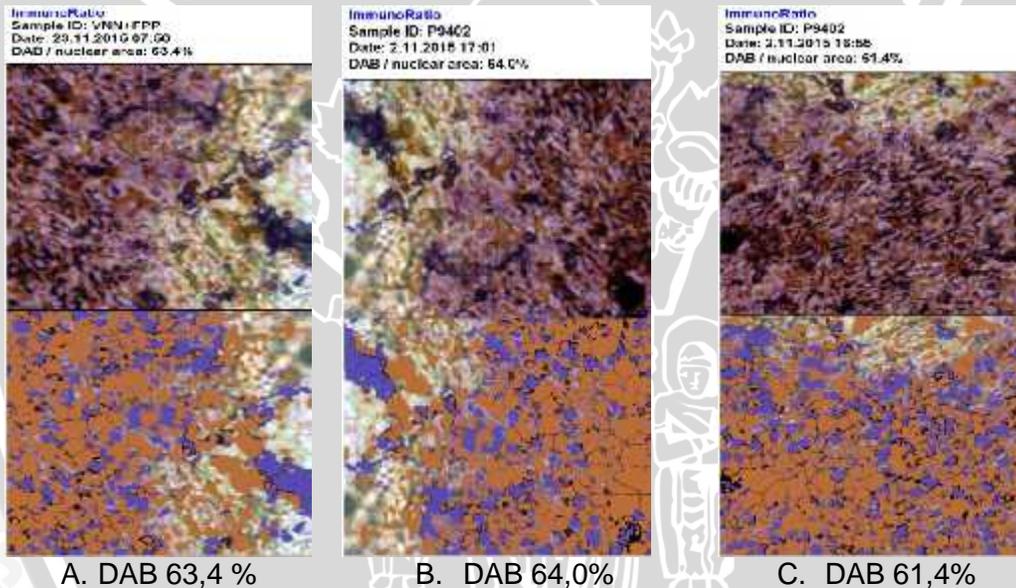
B. Pengulangan I

C. Pengulangan II

Gambar 22. Grafik histogram menggunakan software image J pada organ hati perakuan (VNN).

Grafik diatas menggambarkan aktifitas gen target *-aktin* pada organ hati perlakuan VNN pada grafik 1 72%, pada grafik 2 pengulang I dengan nilai 51%, dan pada grafik 3 pengulangan II dengan nilai 95% dari nilai tersebut nilai modenya berkisar antara 51-95. Dengan demikian ikatan antara antigen dengan antibodi termasuk dalam kategori positif.

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



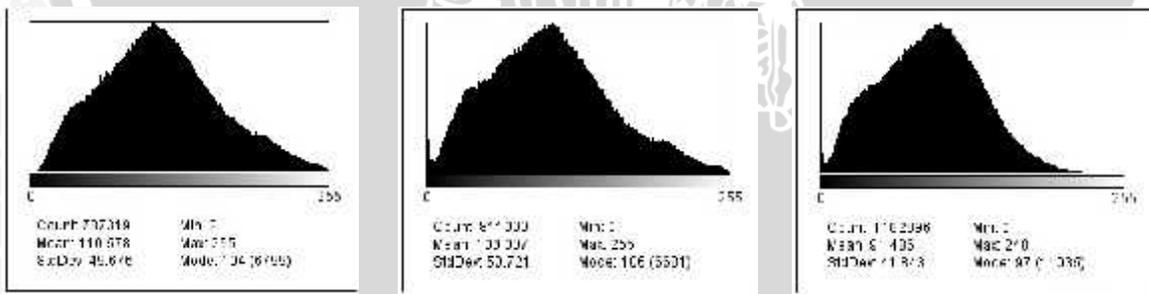
Gambar 23. Hasil pengamatan organ hati perlakuan VNN+FPP, Pengulangan A. *ImmunoRatio* I, B. *ImmunoRatio* II B. *ImmunoRatio* III

Pada penelitian ini FPP diberikan sejak hari pertama pemeliharaan, sedangkan penginfeksi VNN dilakukan pada hari ke-14. Tujuan dari perlakuan disini adalah untuk melihat aktivitas FPP dalam membentuk sistem imun pada tubuh ikan. Diharapkan pada saat penginfeksi ikan uji dengan VNN sistem imun dalam tubuh ikan sudah siap untuk menghadapi serangan virus. Berbeda halnya pada

perlakuan ikan yang hanya diinfeksi virus, dimana ikan uji mati pada minggu ke-2. Ikan pada perlakuan dengan pemberian FPP sebelum diinfeksi VNN ini mampu bertahan sampai akhir masa pemeliharaan. Hal ini menunjukkan bentuk dari pertahanan ikan yang cukup kuat dalam menghadapi serangan virus. Disini juga dapat dikatakan bahwa pembentukan sistem imun dengan pemberian FPP berhasil. Kinerja FPP sebagai biokatalisator pada pembentukan sistem imun berjalan dengan baik.

Pada gambar diatas menunjukkan organ hati dengan perlakuan VNN + FPP mengalami peningkatan prosentase pada setiap *ImmunoRatio*. untuk gambar 22a dengan *ImmunoRatio* I menghasilkan 63,4%, gambar 22b *ImmunoRatio* II menghasilkan prosentase 64,0%, dan gambar 28c *ImmunoRatio* III menghasilkan prosentase 61,4%. Dengan demikian ikatan antara antigen dengan antibodi termasuk dalam kategori positif.

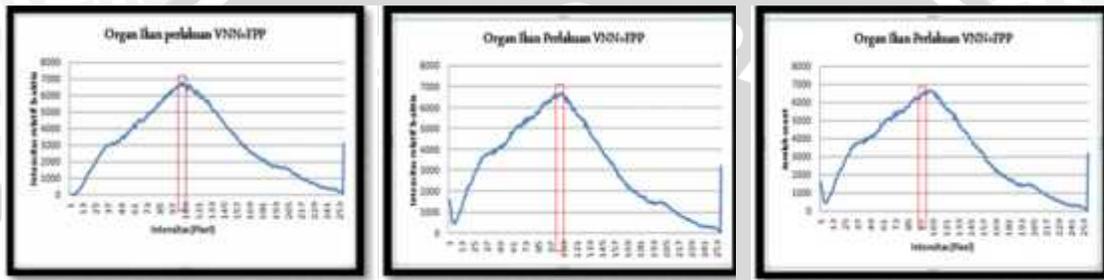
Berikut ini gambar yang menunjukkan untuk grafik histogram dengan menggunakan *software imageJ* pada organ perlakuan pemberian VNN + FPP dapat dilihat pada gambar dibawah ini.



A. 104% B. 106% C.97%
Gambar 24. Histogram menggunakan software image J pada organ hati perlakuan (VNN+FPP)

Gambar 24 diatas merupakan hasil image J dari organ hati perlakuan (VNN+FPP) yang menunjukkan data secara kuantitatif melalui nilai mean yang

muncul pada histogram gambar diatas. Gambar 23a Pengulangan I menunjukkan nilai mean sebesar 104, gambar 23b pengulangan II nilai mean 106, dan gambar 23c pengulangan III nilai mean sebesar 97, keberadaan gen target *-aktin* juga dalam kategori positif karena terdapat pada kisaran mean sekitar 97-106. Berikut ini gambar intensitas ekspresi gen target *-aktin* pada organ hati perlakuan (VNN+FPP) menggunakan image J jika disajikan dalam bentuk grafik:



A. Awal

B. Pengulangan I

C. Pengulangan II

Gambar 25. Grafik histogram menggunakan software image J pada organ hati perlakuan (VNN+FPP).

Grafik diatas menggambarkan aktifitas gen target *-aktin* pada organ hati perlakuan VNN+FPP pada grafik 1 104%, pada grafik 2 pengulang I dengan nilai 106%, dan pada grafik 3 pengulangan II dengan nilai 97% dari nilai tersebut nilai modenyanya berkisar antara 97-106. Dengan demikian ikatan antara antigen dengan antibodi termasuk dalam kategori positif.

Sitoskeleton tersusun dari tiga macam filamen yang terstruktur dengan baik, disebut mikrotubulus (*microtubules*), mikrofilamen(*microfilament*) yang disebut juga sebagai filamen aktin (*actin filament = F-actin*), dan filamen antara (*intermediate fillament= IF*) Ketiga macam filamen menyusun suatu jaringan kerjasama yang sangat rumit. Modulasi jaringan sitoskeleton akan merubah fungsi mekanika sel yang mempunyai peran penting pada sitokinesis (*cytokinesis*), ataupun pergerakan sel, mengemukakan adanya empat fungsi sitoskeleton, seperti: penyangga struktur

sel, transportasi dalam sel, kontraktilitas dan pergerakan sel, serta pembelahan sel (Rudijanto, *et al.*, 2006).

-*aktin* merupakan komponen sitoskeleton yang memiliki peran penting dalam imunitas dan berbagai proses seluler lainnya, seperti migrasi sel, pembelahan sel dan regulasi ekspresi gen. Dalam migrasi sel, terjadi pemasangan aktin yang membuat tonjolan pada bagian terkemuka yang mendorong membran sel ke depan (Pollard dan Borisy, 2003). Peckham, *et al.* (2001) juga mengungkapkan bahwa peningkatan ekspresi -*aktin* berdampak terhadap peningkatan tonjolan dan peningkatan migrasi sel.

-*aktin* Berperan sebagai polimerisasi secara heliks untuk membentuk filament aktin (mikrofilamen), yang membentuk sitoskeleton, salah satunya adalah jaringan tiga dimensi dalam sel eukariotik, dan membantu dalam pembentukan sel. Selain itu, -*aktin* juga berperan dalam proses seluler yaitu adhesi sel, migrasi sel / gerakan, sitokinesis, endositosis / eksositosis, pembelahan sel, transduksi sinyal, internalisasi mRNA, dan transkripsi (Pantaloni, *et al.*, 2001).

Kurangnya ekspresi -*aktin* akan mengakibatkan berkurangnya efektifitas presentasi MHC yang akhirnya akan berdampak pada berkurangnya presentasi antigen ke sel T. Hal ini ditandai dengan kerusakan sel pada organ ikan kerapu tikus di tandai dengan adanya Atropi yaitu penyusutan sel-sel penyusun lamela primer pada insang akibat adanya zat toksik yang masuk ke dalam insang. Selain itu insang juga mengalami edema disebabkan oleh infiltrasi virus ke dalam insang yang mengakibatkan sel bersifat iritatif sehingga sel membengkak. Akibatnya adalah perubahan morfologis yang disebut dengan edema atau pembengkakan sel. Edema yang berlanjut mengakibatkan sel-sel epitel mengalami nekrosis atau kematian sel.

Sel yang mengalami nekrosis dapat dikenali dari bentuk intinya yang mengecil (piknotik), membesar, dan hilang (karyolisis). (Sukarni, *et al.*, 2012).

Menurut Sudaryatma (2012), virus penyebab VNN dapat menginfeksi ikan melalui tiga cara yaitu: 1. Melalui sel-sel epitelia saluran pencernaan, 2. Melalui axon yang ada di permukaan sel dan 3. Melalui peredaran darah Imunositokimia Ikan yang diinfeksi virus penyebab VNN melalui injeksi intra muskular menginfeksi ikan dengan cara mereplikasikan diri di dalam sitoplasma atau nukleus serabut otot skeleton kemudian menyebar dan bereplikasi di sistem saraf perifer dan selanjutnya virus akan langsung masuk ke dalam sistem saraf pusat. Ikan yang dikohabitasi dapat terinfeksi VNN akibat masuknya virus yang ada di air melalui kontak dengan permukaan tubuh (lendir, sirip dan otot), termasuk via oral sehingga akan dapat menginfeksi sel-sel epitelia epiteliasistem saluran pencernaan. Kejadian ini yang disebut "*water borne disease*". Virus yang masuk melalui permukaan tubuh dapat langsung bereplikasi di epitel permukaan saluran pencernaan dan masuk ke dalam sistem saraf pusat melalui sistem saraf perifer (nervus Vagus) (Korsnes, 2008).

Menurut Dina sari, *et al.* (2014), organ otak ikan yang terserang VNN mengalami pelemahan saraf sehingga mengakibatkan gerakan renang ikan berputar-putar. Pada organ otak kerapu tikus terinfeksi VNN karena adanya vakuolisis yang terbentuk terjadinya degenarasi yang merupakan perubahan jaringan menjadi bentuk yang kurang aktif. Sedangkan pada organ mata ikan yang terserang VNN juga mengalami pelemahan saraf sehingga mengakibatkan ikan menjadi buta dan berenang abnormal, karena adanya kerusakan Vakuolisasi pada lapisan *inner nuclea* Vakuola yang terbentuk kemungkinan karena mengalami oedem. Oedem merupakan keadaan abnormal pada jaringan yang bercirikan

adanya rongga diantara sel atau karena penumpukan cairan di jaringan interestisial (Putri *et al.*, 2013).

Organ ginjal yang terserang VNN mengalami kerusakan nirifitis kronis (peradangan pada glomerulus) ditandai dengan adanya infiltrasi sel limfosit. Infiltrasi limfosit merupakan penimbunan bahan patologis dalam jaringan atau sel yang tidak normal atau dalam jumlah yang berlebihan yang mengakibatkan inflamasi atau reaksi peradangan. Sedangkan organ Hati merupakan organ yang memiliki banyak fungsi diantaranya adalah pembentukan dan sekresi empedu, metabolisme zat-zat penting bagi tubuh, pertahanan tubuh, serta fungsi vaskuler. Berdasarkan banyaknya fungsi hati maka dengan adanya kerusakan atau kelainan pada hati akan mempengaruhi fungsi jaringan tubuh lainnya, karena sel-sel hepatosit mengalami degenerasi yang diikuti piknotik yang merupakan tahap awal terjadinya nekrosis. Sel piknotik memiliki ciri yang berkerut dan berwarna gelap akibat paparan radiasi (Yanuhar, 2013).

Ikan yang terinfeksi oleh virus VNN dikenali oleh reseptor seluler yang memicu sel untuk melakukan tindakan untuk membatasi penyebaran virus tersebut. Tindakan pencegahan ini meliputi sintesis protein efektor yang berfungsi di dalam sel dan sitokin yang disekresikan sebagai sinyal "alarm" untuk mengingatkan sel tetangga akan adanya bahaya. Selain itu, sistem kekebalan tubuh memiliki spesialisasi sel efektor (misalnya sel dendritik (DC), sel-sel pembunuh alami (NK) dan makrofag) yang siap untuk memerangi virus. Sel efektor ini merupakan sebagian kecil dari jumlah sel dalam darah. Akan tetapi meskipun jumlahnya hanya sedikit, sel-sel ini mengitari jaringan perifer tempat mereka menfagositosis partikel asing atau sel yang terinfeksi untuk mencari virus.

Keberadaan virus ekstraseluler dan efek racunnya serta protein terlarut menjadi sasaran respon kekebalan humoral yang dimediasi oleh antibodi yang disekresi oleh reseptor sel B. Sebaliknya, infeksi virus intraseluler dibersihkan oleh sel T, yang merupakan mediator dari respon imun yang diperantarai sel. Berbeda dengan reseptor sel B, reseptor sel T hanya mengakui peptida antigenik yang diproses oleh molekul *major histocompatibility complex* (MHC) yang diekspresikan oleh *antigen presenting cell* (APC). Setelah aktivasi, limfosit B dan T berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel efektor, yang akan membersihkan infeksi. Respon imun adaptif terlibat dalam pembentukan memori imunologi yang berumur panjang, dan dapat memastikan respon imun antigen spesifik secara cepat dan kuat ketika bertemu kembali dengan virus. Ikan yang terinfeksi oleh VNN di induksi oleh HSP70 yang berperan untuk merespon stressor pada tingkat seluler dimana respon ini meliputi serangkaian perubahan protein yang meliputi peningkatan sintesis heat shock protein (HSP70) yang merupakan protein stress utama yang ditemukan tertinggi pada eukariot dan prokariot. Jaringan hati, ginjal dan insang merupakan jaringan yang sensitif dalam merespon HSP70 (Basson, 2006).

HSP70 menginduksi adanya tingkat stress pada ikan yang terinfeksi oleh VNN selain itu ekspresi *-aktin* berperan penting dalam imunitas dan respon tubuh terhadap kehadiran benda asing dan antigen ketika tubuh ikan terinfeksi oleh virus (Borisy, 2003). Peckham, *et al.* (2001) juga mengungkapkan bahwa peningkatan ekspresi *-aktin* berdampak terhadap peningkatan tonjolan dan peningkatan migrasi sel. Adapun gambar proses terjadinya pembentukan antibodi pada sistem imun ikan.



gambar 26. Proses Pembentukan Antibodi Pada Sistem Imun Ikan (Yahya, 2005)

Suatu respon imun dapat terjadi karena adanya suatu antigen yang merupakan molekul yang dapat bereaksi dengan antibodi dan sel T (Roitt, 2003). Selain antigen terdapat immunogen yang juga merupakan molekul yang dapat menimbulkan adanya suatu respon imun, akan tetapi immunogen dan antigen berbeda. Immunogen merupakan senyawa yang menyebabkan terjadinya suatu respon imun sedangkan antigen merupakan target terjadinya suatu respon imun. Antigen dapat berupa immunogen. Contoh antigen adalah lipid dan asam nukleat (Campbell, 2003). Suatu antigen dapat dikenali karena memiliki suatu daerah yang disebut epitop yang bersifat spesifik. Epitop akan bereaksi dengan daerah pada antibodi yang disebut dengan paratop yang bersifat hipervariabel. Pembentukan antibodi merupakan salah satu bentuk respon imun karena adanya antigen (Wegrzyn, 2003).

Saat terdapat antigen masuk ke dalam tubuh maka sel B dan sel T akan mengenali antigen yang terikat pada reseptor membrane plasmanya yang biasa disebut dengan immunoglobulin. Perbedaan reseptor pada sel B dan sel T adalah pada kemampuannya memproduksi antibodi. Sel T reseptornya tidak dapat memproduksi limfoid sekunder, yang bertugas untuk mengontrol kualitas dari respon imun yang merupakan tempat pertama kalinya antigen diekspos. Organ-organ limfoid tersebut antara lain adalah kelenjar limfa, *spleen*, tonsil, dan *peyer patches* (Davis, 2010).

4.6 Profil Protein Organ Hati *C. altivelis*

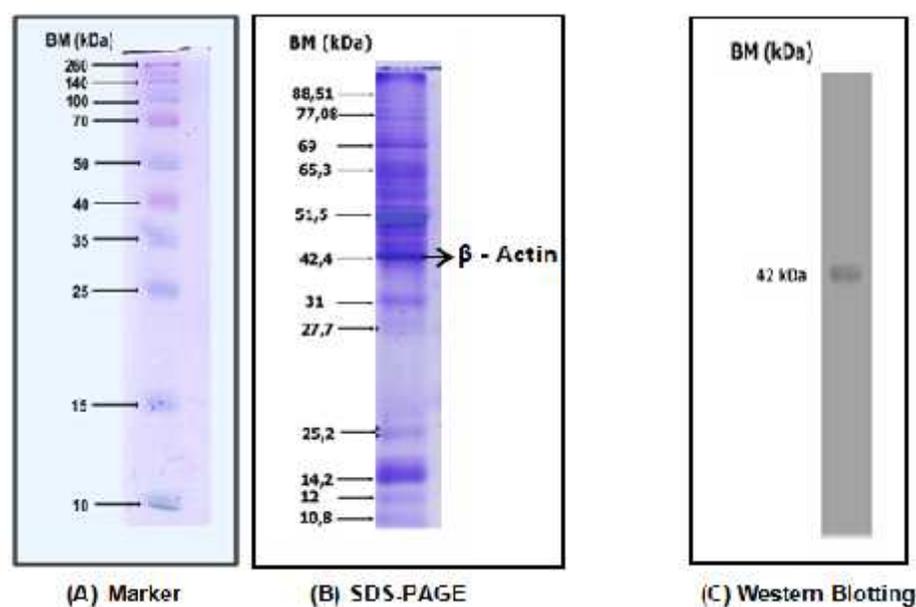
Pengamatan respon FPP+VNN yang diberikan pada ikan uji juga dilakukan pengamatan secara mikroskopis menggunakan metode SDS-PAGE, Westernblot, dan Imunohistokimia (IHK). Pengamatan tersebut dilakukan pada organ ikan uji. Pengambilan organ dilakukan pada hari ke-24 dengan pembedahan untuk mengambil organ target, yaitu Hati.

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).

Organ hati kemudian dipisahkan dengan semua organ yang lain kemudian dicacah hingga halus menggunakan mortar dan alu. Setelah halus hasil cacahan organ hati dimasukkan kedalam appendorf dan ditambahkan tris HCL kurang dari 5 ml. Kemudian hasil gerusan organ hati dibuat gel running yang telah diberi perlakuan pewarnaan (staining) dengan *Cromassive Brialiant Blue* (CBB) yang

berfungsi untuk memberi warna pita protein sehingga dapat diamati. Selanjutnya dilakukan proses pencucian (*destaining*), untuk memudahkan pewarna yang digunakan pada gel sehingga dapat dibaca dengan jelas.

Hati ikan uji diisolasi dan diamati profil proteinnya menggunakan metode SDS-PAGE. Menurut Al-Tubully (2000), analisa protein bisa dilakukan menggunakan metode SDS-PAGE, dimana metode ini mampu memisahkan protein berdasarkan ukuran dan berat molekul protein. Hasil pengamatan tersebut dapat dilihat pada gambar dibawah ini



Gambar 27. Profil protein Hati ikan uji menggunakan SDS-PAGE (A) Marker (PRO-STAIN™), (B) Hasil Elektroforesis Pita *Crude Protein Spirulina sp.* dengan SDS-PAGE (C) Profil -aktin menggunakan metode Westernblot (Sumber : Laporan Penelitian Unggulan PT-BOPTN, 2015)

Gambar 27 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan profil protein pada perlakuan FPP+VNN. Target protein dalam penelitian ini adalah *-aktin*. Farina, *et al.* (2003) menyatakan bahwa berat molekul *-aktin* yaitu 42 kDa. Pada gambar 27, terlihat pada semua perlakuan terdapat band protein dengan berat molekul 42,4. Hal

tersebut menjadi indikasi awal bahwa pada organ hati ikan uji di semua perlakuan terdapat ekspresi *-aktin*.

Analisa lebih lanjut dilakukan untuk memastikan bahwa *-aktin* terekspresi pada organ hati ikan uji, yaitu menggunakan metode Westernblot. Menurut Blancher dan Jones (2001), penggunaan metode westernblot adalah untuk mengidentifikasi dengan menggunakan antibodi spesifik. Dalam penelitian ini antibodi spesifik yaitu anti- *-aktin* yang digunakan untuk mengkonfirmasi keberadaan gen atau protein target (*-aktin*) dalam sampel tersebut.

Berdasarkan hasil pada gambar 25, dapat dinyatakan bahwa *-aktin* terekspresi pada setiap perlakuan. Hasil ini menunjukkan bahwa dalam kondisi normal ikan uji juga mengekspresikan *-aktin*. Hal ini dikarenakan protein ini merupakan pengendali utama pada sel eukariotik. Xu, *et al.* (2010) mengungkapkan protein ini keberadaannya berlimpah pada sel eukariotik, dan memiliki fungsi penting seperti motilitas, pertumbuhan, sitokinesis, endositosis dan transport intraseluler.

4.7 Analisa 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 aktin pada setiap perlakuan. Setelah didapatkan data tersebut, selanjutnya data dianalisa dengan menggunakan cara statistik yaitu analisa keragaman (ANOVA), dengan tujuan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan pemberian perlakuan. Berikut adalah tabel data hasil penelitian.

Tabel 4. Data Hasil Penelitian

Ulangan	Perlakuan				TOTAL
	Kontrol	FPP (A)	VNN (B)	FPP+VNN (C)	
1	35,2	54,3	57,1	63,4	210
2	37,1	41,2	51,3	64,0	193,6
3	34,7	62,4	56,9	61,4	215,4
Total	107	157,9	160,7	188,8	619

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

Tabel 5. Analisa Keragaman (ANOVA) DAB *-aktin* setiap perlakuan

SK	DB	JK	KT	FHIT	F tabel 5%
A	3	1186,90	395,63	12,29	0.11
Galat	8	257,48	32,18		
Total	11	1444,38			

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

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

Uji BNT (beda nyata terkecil) perlu dilakukan untuk mengetahui bagaimana pengaruh dari pemberian perlakuan yang berbeda terhadap ekspresi *-aktin*. Hasil uji BNT pengaruh pemberian perlakuan yang berbeda terhadap ekspresi *-aktin* disajikan pada tabel dibawah ini.

Tabel 6. Hasil Uji BNT pengaruh pemberian perlakuan yang berbeda terhadap ekspresi *-aktin*.

Prosentase B Aktin tiap perlakuan		K	F	V	FV	Notasi	BNT 5%
		35,67	52,63	55,10	62,93		
K	35,67	-	-	-	-	A	4,63
F	52,63	16,97*	-	-	-	B	
V	55,10	19,44*	2,47*	-	-	C	
FV	62,93	27,27*	10,30*	7,83*	-	D	

Ket : K = Kontrol
 F = 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 yaitu pemberian FPP, pemberian VNN dan pemberian FPP+VNN berbeda nyata terhadap jumlah prosentase DAB ekspresi *-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.

4.8 Kualitas Air Pemeliharaan 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 keseluruhan 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).

4.8.1 Suhu

Suhu tergolong dalam parameter fisika yang mempengaruhi kehidupan organisme dan kualitas perairan. Tingginya suhu perairan berhubungan dengan besarnya intensitas cahaya yang masuk kedalam badan air. Cahaya yang masuk tersebut akan menentukan derajat panas. Semakin banyak sinar matahari yang masuk kedalam badan air, akan menyebabkan tingginya suhu pada perairan. Sebaliknya jika peningkatan kedalaman dalam perairan terjadi, maka akan menyebabkan rendahnya suhu perairan (Nurhaidah, 2013). Secara umum, laju pertumbuhan akan meningkat seiring dengan kenaikan suhu, tetapi kenaikan suhu yang terlalu ekstrem akan menyebabkan kematian. Hasil pengukuran suhu selama pemeliharaan pada kolam ikan kerapu ini dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil pengukuran suhu ($^{\circ}\text{C}$) 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 Penelitian pada kolam ikan Kerapu Tikus yang diberi *Spirulina* sp berkisar 29°C sampai 31°C . hal ini sesuai dengan penelitian Kordi (2002), suhu yang ideal untuk pertumbuhan ikan Kerapu Tikus adalah $27-32^{\circ}\text{C}$. suhu perairan mempunyai peranan sangat penting dalam

pengaturan aktivitas, pertumbuhan, nafsu makan, dan dan mempengaruhi proses pencernaan makanan. Sedangkan Ikan Kerapu Tikus yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan Kerapu Tikus muda yang memiliki panjang tubuh kurang lebih 15 cm. Menurut 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.

4.8.2 Salinitas

Pada pengukuran kualitas air salinitas juga perlu diperhatikan. Salinitas sendiri dapat didefinisikan sebagai total konsentrasi ion-ion terlarut dalam air. Dalam budidaya perairan salinitas dinyatakan dalam satuan permil (‰) atau ppt (*Part per thousand*) atau g/l. 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 8.

Tabel 8. Hasil pengukuran salinitas (‰) pada kolam ikan Kerapu Tikus

Hari penyondean	Aquarium dengan perlakuan			
	Ikan 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 8 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. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang menunjukkan nilai salinitas sesuai untuk pertumbuhan dan keberlangsungan hidup ikan kerapu tikus.

4.8.3 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 9.

Tabel 9. Hasil Pengukuran pH Pada Kolam Ikan Kerapu Tikus

Hari penyondean	Aquarium dengan perlakuan			
	Ikan 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

Berdasarkan tabel diatas hasil pengukuran pH pada kolam ikan Kerapu Tikus yang telah diinduksi dengan protein *Spirulina* sp 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. Ghufuran, *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.

4.8.4 Oksigen Terlarut (DO)

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 10. Sebagai berikut.

Tabel 10. Hasil Pengukuran Oksigen Terlarut (mg/l) Pada Kolam Ikan Kerapu Tikus

Hari penyondean	Aquarium dengan perlakuan			
	Ikan 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 10 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 kisaran DO yang optimum.

5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah analisa pada *crude protein* berupa FPP dari mikroalga yang ditemukan dalam Mikroalga laut *Spirulina* sp berupa PCP (Homodimer), pada berat molekul 14,3 kDa, PCP (Monodimer) pada berat molekul 33,4 kDa dan CPC pada berat molekul 19,9 kDa. Pemberian Fragmen pigmen protein (FPP) mikroalga *Spirulina* sp mampu meningkatkan ekspresi *-aktin* dilihat dari Dab Pada ikan kontrol ekspresi *-aktin* 35,2%, ikan dengan pemberian FPP 54,3%, ikan dengan penginfeksi VNN 57,1%, dan ikan dengan penginduksian FPP dan penginfeksi VNN sebesar 63,4%. *Phycocyanin* (CPC) dan *Peridinin chlorophyll protein* (PCP) yang terkandung dalam *Spirulina* sp mampu menjadi biokatalisator terekpresinya *-aktin*. Peningkatan ekspresi *-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 memanfaatkan Fragmen Pigmen Protein mikroalga laut *Spirulina* sp sebagai peningkatan sistem imun Humoral dan Seluler. Dan pengkajian secara biologi molekuler.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams M. 2005. **Superfood for optimum Health: Chlorella and Spirulina**. New York: Truth Publishing International, Ltd. Hal 26.
- Adhikari, M., S. Nagata, and M. Adhikari. 2004. **Rural household and forest: an evaluation of household's dependency on community forest in Nepal**. J. Of Forest research 9:33-44.
- AgusJaya. 2011. **Peningkatan respon Imun adaptif pada Asosiasi dengan Infeksi Laten Wucheria bancrofti**. Program Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia
- Akbar, S. Dan Sudaryanto. 2001. **Pembenihan dan Pembesaran Kerapu Bebek**. Penebar Swadaya. Jakarta
- Akbar, syamsul dan Sudaryanto. 2002. **Pembenihan dan Pembesaran Kerapu Bebek**. Penebar Swadaya Jogjakarta.
- Alifuddin, M. 2001. **Imunostimulasi pada Hewan Akuatik**. Jurnal Akuakultur Indonesia 1(2) : 87-92 (2002).
- Amiruddin, H, R.K Dongaran, R. Nurhadi dan L. Darto. 2012. **Manajemen Induk Ikan kerapu Tikus (Cromileptes altivelis) sebagai upaya Optimalisasi Produksi telur Berkualitas**. Balai Budidaya Laut Ambon.
- Apridayanti, Eka. 2005. **Evaluasi Pengelolaan Lingkungan Perairan Waduk Lahor** Kabupaten Malang, Jawa Timur. Tesis. Universitas Diponegoro. Semarang
- Arina, Yuliana, M.D. 2003. **Pengaruh aging Terhadap Sistem imun**. Fakultas kedokteran gigi, Universitas Jember

Aslianti, Titiék, Bedjo Slamet dan Gegar Sapta Prasetya. 2012. **Aplikasi Budidaya Kerapu Bebek, *Cormileptes altivelis* di Teluk Ekas Kabupaten Lombok Timur. Bali.**

Atmirah, Septinawati dan Wahyu Tjahjaningsih. 2010. **Manajemen Pembesaran kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) di Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau (BBAP) jepara Jawa Tengah.** Jurnal Ilmiah Prikanan dan Kelautan Vol.2, No. 1 April. 2010

Balachandran P, Pugh ND, Guoyi Ma, Pasco DS. 2006. **Toll-like receptor 2-dependent activation of monocytes by *Spirulina* polysaccharide and its immune enhancing action in mice.** International Immunopharmacology 6 : 1808-1814.

Barallo. 1999. **Viral encephalopathy and retinopathy of farmed marine fish species in Italy.** Virus Res. 63:143–146.

Basson, R. 2006. **Heat Shock Protein 70 and Cortisol as Biomarkers for Cadmium, Chromium and Nickel Contamination in *Oreochromis mossambicus*.** Disertasi dipublikasi. Faculty of Science. University of Johannesburg. South Africa.

Baratawidjaja, Karnen Garna dan Iris Rengganis. 2010. **Imunologi Dasar.** Edisi ke-10. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Baratawijaya K.G. Rengganis 2012. **Imunologi Dasar.** Edisi 10. Jakarta

Belay A. 2000. **The potensial application of *Spirulina* (*Arthospira*) as a nutritional and therapeutic supplement in health managemant** (review), J. Am. Nutraceutical Assoc. (JANA) 5 (2) 26-48.

Belay, A. And Y. Ota. 1993. **Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*.** *Publ. In Journal of Appl Phycology*, 5;235-241. USA.

Blancher, Jones PM, Persaud SJ. 2001. **Prtoein kinases, protein phosphorylation, and the regulation of insulin secretion from pancreatic -cells.** *Endocr Rev*; 19:429-61.

Brett, J. R. Dan T.D.D. Grovest. 1979. **Physiological energetics dalam W.S. Hoar, D.J. Randall dan J.R. Brett: Fish Physiology** Vol VIII. Academic Press, New York.

Borowitzka, M.A. 1988. **Alga growth media and sources of cultural.** In: **Borowitzka M.A. & Borowitzka L.J. (eds)**, Microalgae Biotechnology. Cambridge University Press: Cambridga. Pp. 456-465.

Borowitzka, M. A and L. J. Borowitzka. 1998. **Microalgal Biotechnology.** Cambridge University press. Cambridge. New York USA.

Brown, M.R., jeffrey, S.W., Volkman, J.K., & Dunstan, G.A. 1997. **Nutritional properties of microalgae for mariculture.** Aquaculture. 151: 315-331.

Bovo, G., Nishizawa, T., Maltese, C., Borghesan, F., Mutinelli, F., Montesi, F., De Mas, S. 1999. **Viral encephalopathy and retinopathy of farmed marine fish species in Italy.** Virus Res. 63:143–146.

Campbell, N.A., Reece, J.B., Mitchell, L.G. 2003. **Biology Fifth Edition.** Benjamin Cummings. New York.

Carra and Heocha. 1976. **The Photosyntetic Pigment.** In: **Pigmen Microbiology, Margalith P.z. (Ed)** Cambridge England. P 84-88.

Chakdar H., S. Pabbi. 2012. **Extraction and purification of phycoerythrin from Anabaena variabilis (CCC421).** Phytos. 42 (10 : 25-31.

Chen, Y.-M., Wang, T.-Y. & Chen, T.-Y., 2008. **Immunity to betanodavirus infections of marine fish.** *Developmental and comparative immunology*, 43(2), pp.174–83.

Ciferri, O. 1983. **Spirulina The Edible Microorganisme.** Microbial Review american Society

Darmono dan Hasan A. M. 2002. **Menyelesaikan Skripsi dalam satu Semester.** PT Grasindo. Jakarta

Davis, H. 2010. **Introductory Immunobiology.** Chapman and Hall. London. 394 p.

Dina Wardiyanto, Agus Setyawan. (2014) **PROFIL HISTOPATOLOGI KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*) YANG DISTIMULASI JINTN HITAM (*Nigella sativa*) DAN DIINFEKSI Viral Nervous Necrosis (VNN).** (Jurnal Ilmu Perikanan dan Sumberdaya Perairan).

Duncan PL, Klesius PH. 1996. **Effects of feeding *Spirulina* on specific and nonspecific immune responses of channel catfish.** *Journal of Aquatic Animal Health* 8 : 308313.

Edhy, W.A., dan Kurniawan. 2003. **Plankton di Lingkungan PT. Centralpertiwi Bahari. Suatu pendekatan Biologi dan Manajemen Plankton dalam Budidaya Udang.** Mitra Bahari: Lampung. Hal. 3-29.

Ekawati, A. W. 2005. **Diktat Kuliah Budidaya Pakan Alami.** Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang.

Eriksen, N.T. 2008. **Production of phycocyanin pigment wiyh aplication in biology. Food and medicine (abstract).** *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80 (1): 1-14.

Ernest, Prima 2012, **pengaruh kandungan ion nitrat terhadap pertumbuhan *Nannochloropsis Oculata*.** Fakultas Teknik, Univesitas Indonesia. Depok, Jakarta

Estrada, J,E.P., P.B. Bescos, & A.M. V. Fresno. 2001. **Antioxidant activity of different fractions *Spirulina platensis* protean extract.** *11 Farmaco* 56: 497-500.

Evalawati., M, Meiyana dan Aditya. 2001. **Biologi kerapu, Pembesran Kerapu bebek dan Kerapu Macan di Kramba Jring Apung.** Ditjenkan. Jakarta

Farina KL, Huttelmaier S, Musunuru K, Darnell R, Singer RH (2003). **Two ZBP1 KH domains facilitate beta-actin mRNA localization, granule formation, and cytoskeletal attachment.** *J Cell Biol* 160, 77–87.

Fasya, Arif Habib. 2013. **Efek Inhibitory VNN (Viral Nervous Necrotic) pada Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) yang diinduksi PCP (Peridinin Chlorofil Protein) *Halimeda sp* melalui Ekspresi MHC I.** Tesis. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

Fatchiyah; estri L. Arumingtyas; sri Widayati dan Sri Rahayu. 2011. **Biologi Molekuler.** Erlangga: Jakarta.

FAO. Food Agricultural Organization. 2004. **Yearbook on Fisheries Statistic,** Romey. Italy (IT).

Fujaya, Yushinta. 2008. Fisiologi ikan, **Dasar Pengembangan Teknologi Perikanan.** RinekaCipta. Yogyakarta

Ghufron, M, H. Kordi, A. B. Tanjung. 2007. **Pengelolaan Kualitas Air dalam Budidaya Perairan.** Rineka Cipta. Jakarta.

Habibi, Sugianto dan andhika Yusuf. 2011. **Panduan Penangkapan dan Penanganan Perikanan Kerapu dan Kakap.** Versi 1 Oktober.

Hall, D.O. and K.K. Rao, 1999. **Photosynthesis.** Sixth Edition. Cambridge University Press.

Hamid. 2010. **Sistem Koordinasi Organisme.** Diambil dari www.zaifbio.wordpress.com pada 25 November 2010.

Hanaa, H., El Baky, A., Farauk, K., El Baz, Gamal, S., dan El Baraty. 2003. **Spirulina Spesies as a source of Carotenoids and B-Thocoperol and its Anticarcinoma Factors.** Biotechnology, Vol 2 November 3:222-240.

Hariyati, R. 2008. **Pertumbuhan spirulina sp dalam Skala Laboratoris.** Universitas Diponegoro. Semarang. Bioma. 10 (1) : 19-22.

Hariyati, A.M. 1989. **Makanan Ikan.** LUW/UNIBRAW/Fish Fisheries Project Malang. 99 Hal.

Hasdianah; Prisma Dewi; Yuli Peristiawati dan Sentot Iman. 2014. **Imunologi, Diagnosa dan Teknik Biologi Molekuler**. Muha Medika. Yogyakarta

Hayashi O, ono S, Ishii K, Shi YH, Hirahashi T, Katoh T. 2006. **Enhancement of proliferation and defferentiation in bone marrow hematopoietic cells by Spirulina (Artrospira) platensis in mice**. Journal of Applied Phycology 18 : 47-56.

Heidari, Z., Tinsley, J., Bickerdike, R., McLoughlin, M. F., Zou, J., Martin, S.A. 2015. **Antiviral and metabolic gene expression responses to viral infection in Atlantic salmon (Salmo salar)**. Fish Shellfish Immunol., 42 (2), pp. 297–305

Hensen. 2010. **Latast Scientific research on Spirulina: Effects on the Aids Virus, Cancer, and the Immune system**.

Hirata, T., Tanaka, M., Ooike, M., Tsunomura, T., Sakaguchi, M. (2000). **Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from Spirulina platensis**. Journal of Applied Phycology. 12:435-9.

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

Inansetyo, A dan Kurniastuty. 1995. **Teknik Kulrur Phytoplankton dan Zooplankton**. Kanisius. Yogyakarta.

Iwama, G.K.; L.O.B. Afonso dan M.M. Vijayan, 2004. **Stress in Fish**. AquaNet Workshop on Fish Welfare.

Jha AK, Pal AK, Sahu NP, Kumar S, Mukherjee SC. 2007. **Haemato-immunological responses to dietary yeast RNA, ù-3 fatty acid and â-carotene in Catla catla juveniles**. Fish & Shellfish Immunology 23 : 917-927.

Jobling M. 1994. **Fish Bioenergetics**. London. Chapman & Hall. p. 309.

Kabinawa, K. 2006. **Spirulina Ganggang Penggempur Segala macam Penyakit** Depok: PT ArgoMedia Pustaka.

Kabinawa I.N.K. 1988. **Kandungan nutrisi Spirulina platensis dalam Medium Kultur Teknik Komersial**. Prosiding Seminar Nasional Kimia dalam Industri Jasa KIAI. Yogyakarta.

Korsnes, K. 2008. **Nervous Necrosis virus (VNN) in farmed Norwegian fish species**. Thesis of Philosophiae Doctor (PhD) University of Bergen. Norway: Bergen.

Kawsar s., Yuki F., Ryo M., Hidetaro Y., & Yasuhiro O. 2011. **Protein R-phycoerythrin from marine red alga Amphiroa anceps: extraction, purification and characterization**. PHYTOLOGIA BALCANICA. 17 (3):347-354.

Kebede dan Ahlgren, G. 1996. **Optimum Growth Conditions and Light Utilization Efficiency of Spirulina platensis (Arhospira fusiformis) from lake Chitu, Ethiopia**. Hydrobiol., 332: 99-109.

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

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

Kurniastuty. 1995. **Teknik Kultur Phytoplankton dan Zooplankton**. Kanisius, Yogyakarta

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

Masokidek, J., M. Koblizek, & G. Torzillo. 2004. **Photosynthesis in Microalgae In:A. Richmond (Ed). Handbook of Microalgae Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Blakwell Science Ltd., Iowa.P.20-39.

Mcloughlin, M. F., Graham, D. A. 2007. **Alphavirus infections in salmonids – a review**. J Fish Dis, 30 (9), pp. 511–531.

Minkova KM, Tchernov AA, Tchorbadjieva MI, Fournadjieva ST, Antova RE, Busheva MC (2003) **Purification of C-phycoerythrin from Spirulina (Arthrospira) fusiformis**. J Biotechnol 102:55–59

- Muhammad Ahsan, Habiba, B., and Parvin, Mahsuda (2008). **A Review On Culture, Production And Use Of Spirulina As Food For Hummans And Feeds For Domestic Animals And Fish**, FAO Fisheries and Aquaculture Circular, Rome
- Munazir, Zaikudin. 2001. **Respon Imun terhadap Infeksi Bakteri**. Sari Pediatri, Vol. 2, No. 4 (193-197)
- Nurhaidah, Christin. 2013. **Kandungan Nitrat dan Orthofosfat pada Tambak Udang Vaname di Desa Dalegan Kecamatan Panceng Kabupaten Gresik Jawa Timur. Praktek Kerja Lapang**. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.
- Panggabean, Lily G. M. 1998. Mikroalgae: **Alternatif Pangan dan Bahan Industri di Masa Mendatang**. Oseana Volume XXIII No. 1:19-26.
- Peckham, M., Miller, G., Wells C., Zicha, D., Dunn, G. A. 2001. **Specific changes to the mechanism of cell locomotion induced by overexpression of beta-actin**. J Cell Sci 114:1367–1377.
- Phang, S.M., M. S. Miah, W. L. Chu, and M. Hashim. 2002. **Spirulina Culture in Digested Sago Starch Factory Waste Water**. J.Appl.Phycol., 12:395-400
- Pirenantyo. P.L. Limantara. 2008. **Pigmen Spirulina Sebagai Senyawa Antikanker**. Megister Biology. Universitas Kristen Satya Wacana.
- Poedjiadi, A. 1994. **Dasar-Dasar Biokimia**. Universitas Indonesia Press. Jakarta
- Pollard, T. D., Borisy, G. G. 2003. **Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments**. Cell 112:453–465.
- Prasetyo, Heryanto, Tatas, H.P.,L. Limantara. 2010. **Estimasi Produk Degradasi Ekstrak Kasar Pigmen Alga Merah Kappaphycus alvurazil (Doty) Doty Varian Merah, Coklat, dan Hijau: Telaan Perbedaan Spektrum Serapan**. Jurnal Ilmu Kelautan, Undip.
- Prayitno. 2002. **Pengaruh ekstrak daun jambu biji (esidium guajava) Untuk mengaktifkan Viral Nervous Necrosis (VNN) pada ikan kerapu bebek**

- (Ephinephelus fuscoguttatus).** Journal of Aquakultur Management and Tecnology.
- Pumas C., Y. Peerapornpisal, P. Vacharapiyasophon, P. Leelapornpisid, W. Boonchum, M. Ishii, C. Khanongnuch. 2012. **Purification and characterizational of a thermostable phycoerythrin from hot spring cyanobacterium leptolyngbya sp.** International Journal of Agriculture & Biology. Vol 14: 121-125.
- Putri F.M. 2013. **The Effect of Spirulina sp. Addition to Artificial Diet on the Total Hoemocyte count and Phagocytosis activity of white Shrimp (Litopenaeus vannamei).** Program studi Budidaya Perairan. Jurusan Perikanan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Diponegoro.
- Richmond A. 1998. **Spirulina. Di dalam: Borowitzka MA< Borowitzka LJ (Ed) Microalgae Biotechnology**
- Richmond A. 1979. **Isolation and Purification of Phycocyanin from the Blue Green Alga Spirulina platensis.** Arch. Microbiol 120:155-159
- Rinoyo, S. H. 2007. **Beberapa Sifat Umum Klorofil Fitoplankton.** Jurnal Oseana Volume XXXII, No. 1, Hal. 23-31
- Romay, Ch., Gonzales, R., Lendon, N., remirez, D., & Rimbau, V. (2003). **C-phycoyanin: A bilipotein with antioxidant, Anti-Inflamatory and Neuroprotective Effects.** 4, 207-216.
- Roza, D., F. Johnny, S. Kawahara, dan A. Hanafi. 2002a. **Penyakit pada budidaya ikan kerapu dan upaya penanggu langannya.** Kumpulan Makalah Seminar Pengembangan Teknologi Budidaya Kerapu. Balai Budidaya Laut Lampung - JICA: 75-86.
- Roza, D., Johnny dan Yuasa K. 2003. **Viral diseases of grouper in Indonesia. Makalah pada Training on Grouper Hatchery Seed Production.** Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol – NACA Bangkok. Gondol 1 – 21 Mei 2003. 12 p.
- Roitt, I.M. 2003. **Essential Immunology.** Blackwell Science Limited. Oxford.

Rubenstein PA (1990). **The functional importance of multiple actin isoforms.**
Bioessays 12, 309–315.

Rudijanto, A., Handono.K. 2006. **PENGARUH HIPERGLEMI TERHADAP PERAN SITOSKELETON (CYTOSKELETON) SEBAGAI JALUR TRANSDUKSI SIGNAL (SIGNAL TRANSDUCTION).** Bagian Ilmu Penyakit Dalam FK. Universitas Brawijaya Malang

Santoso. (2010). **Studi Heat Shock Protein 70 (HSP70) dalam Ginjal Cranial Ikan Mas (Cyprinus carpio L.) Setelah 24 Jam Paparan Linear AlkylBenzene Sulfonate (LAS).** Staf Pengajar Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian-UNDANA.

Saputra, Hari Marta; netti Marusin dan Putra Santoso. 2013. **Struktur Histologis Insang dan kadar Kemoglobin Ikan Asang (Osteochilus hasseltii C.V) di Danau Singkarak dan Maninjau, Sumatra Barat.** Jurnal Biologi Universitas Andalas (J. Bio. UA) ISSN: 2303-2163

Satyantini. 2014 **pemberian fikosianin Spirulina meningkatkan jumlah sel darah, aktifitas fagositosis, dan pertumbuhan ikan kerapu bebek juvenil.** Departemen Manajemen Kesehatan Ikan dan Budidaya Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Klautan. Universitas Airlangga.

Sedjati, Ervia Yudiati, Suryono. 2012. **Profil Pigmen Polar dan Non Polar Mikroalga Laut Spirulina sp dan Potensinya sebagai Pewarna Alami.** Jurusan Ilmu kelautan . Fakultas perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Diponegoro.

Sudaryanto, 2002. **Pembenihan dan Pembesaran Kerapu Bebek.** Penebar Swadaya. Jakarta

Sudarsono, Afik. 2013. **Studi in Vivo TREATMENT CRUDE PYRENOID MIKROALGA LAUT Nannochloropsis oculata TERHADAP EKSPRESI TNF-a IKAN KERAPU TIKUS (Cromileptes altivelis).** Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Barwijaya Malang.

Sudaryatma, P.E., Artanti, T.L., Sunarsih, N.L., Widiarti, K.S. dan Nurhidayah, S.N. 2012. **Imunositokimia Streptavidin Biotin: Deteksi Dini Viral Nervous Necrosis Pada Lendir Ikan Kerapu Macan.** J. Sain Vet. 1: 99-109.

Sukarni, Maftuch, Happy Nursam .2012. **Kajian Penggunaan Ciprofloxacin terhadap Histologi Insang dan Hati Ikan Botia (*Botia macracanthus*, Bleeker) yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila***. Stasiun Karantina Ikan Sulthan Thaha Jambi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya

Suminto. 2009. **Penggunaan Jenis Media Kultur Teknis terhadap Produksi dan kandungan Nutisi Sel *Spirulina Platensis***. Jurnal Saintek Perikanan 4 (2) : 53-61.

Suprayudi, M.A., L. Indriastuti dan M. Setiawati. 2006. **Pengaruh Penambahan BahanBahanImunostimulandalamFormulasiPakan Buatan terhadap Respon Imunitas dan Pertumbuhan Ikan Kerapu Bebek, *Cromileptes altivelis***. Jurnal Akuakultur Indonesia 5: 7786.

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

Taw Nyan,DR. 1990. **Petunjuk Pemeliharaan Kultur Murni dan massal Mikroalga. Proyek Pengembangan Budidaya Udang: United Nations Development programme Food ang agriculture organization of the Unite Nations**. US. 34 hal.

Tietze, H.W. (2004). ***Spirulina Micro Food Macro Blessing***. Ed ke-4. Australia: Harald W. Tietze publishing.

Tokusoglu, O., M.K. uunal. 2006. **Biomass nutrient profile of three microlagae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* and *Isochrisis galbana***. *Journal Food Sci.* Vol. 86 (4): 1144-1148.

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. 96801.

Vonshak, A., 2008. **Recent advances in microalgal biotechnology, Biotech, Adv.** 8: 709-727

Wegrzyn, A.N. 2003. **Future Approaches to Food Allergy**. Pediatrics 2003;111;1672-1680. www.pediatrics.org. Diakses 29 September 2012.

Weis, V.M., Verde, E.A., & Reynold, W.S. 2002. **Characterization of a Short Form Peridinin-Chlorophyll-Protein (PCP) cDNA and Protein From the Symbiotic Dinoflagellate Symbiodinium muscatinei (Dinophyceae) From the Sea Anemone Anthopleura elegantissima (Cnidaria)**. J.Phycol. 38, 157 – 163

Widi, restu kartiko. 2010. **Asas Metodologi Penelitian**. Graha Ilmu. Yogyakarta

Wijaseno 2011. **Uji Pengaruh Variasi Media Kultur terhadap Tingkat Pertumbuhan Kandungan Protein, Lipid, Klorofil dan Karetinoid pada Mikroalga Chlorella vulgaris**. Departemen Teknik Kimia. Fakultas Teknik. Universitas Indonesia. Depok.

Williams KC, Irvin S, Barclay M. 2004. **Polka dot grouper Cromileptes altivelis fingerlings require high protein and moderate lipid diets for optimal growth and nutrient retention**. Aquaculture Nutrition 10 : 125-134.

Xu, C.W. 1993. **An instant algal noodle and its production method, Chinese patent CN1077857A**.

Yakoyama, T. (2006). **Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection**. Nat Rev Immunol 6, 127–135.

Yanuhar, Uun. 2009. **Pengaruh Pemberian Bahan aktif Ekstrak Nannochloropsis oculata terhadap Kadar Radikal Bebas pada Ikan Kerapu Tikus (Cromileptes altivelis) yang terinfeksi bakteri Vibrio alginoliticus**. Unpublished.

Yanuhar, Uun. 2012. **Laporan Eksplorasi Karakter Molekuler Peridinin Chlorophyll Cell Pigmen Alga Laut Nannochloropsis oculata dan Halimeda sp: Upaya Pengendalian Penyakit Virus Pada Ikan berbasis Bahan Hayati**. Unpublished

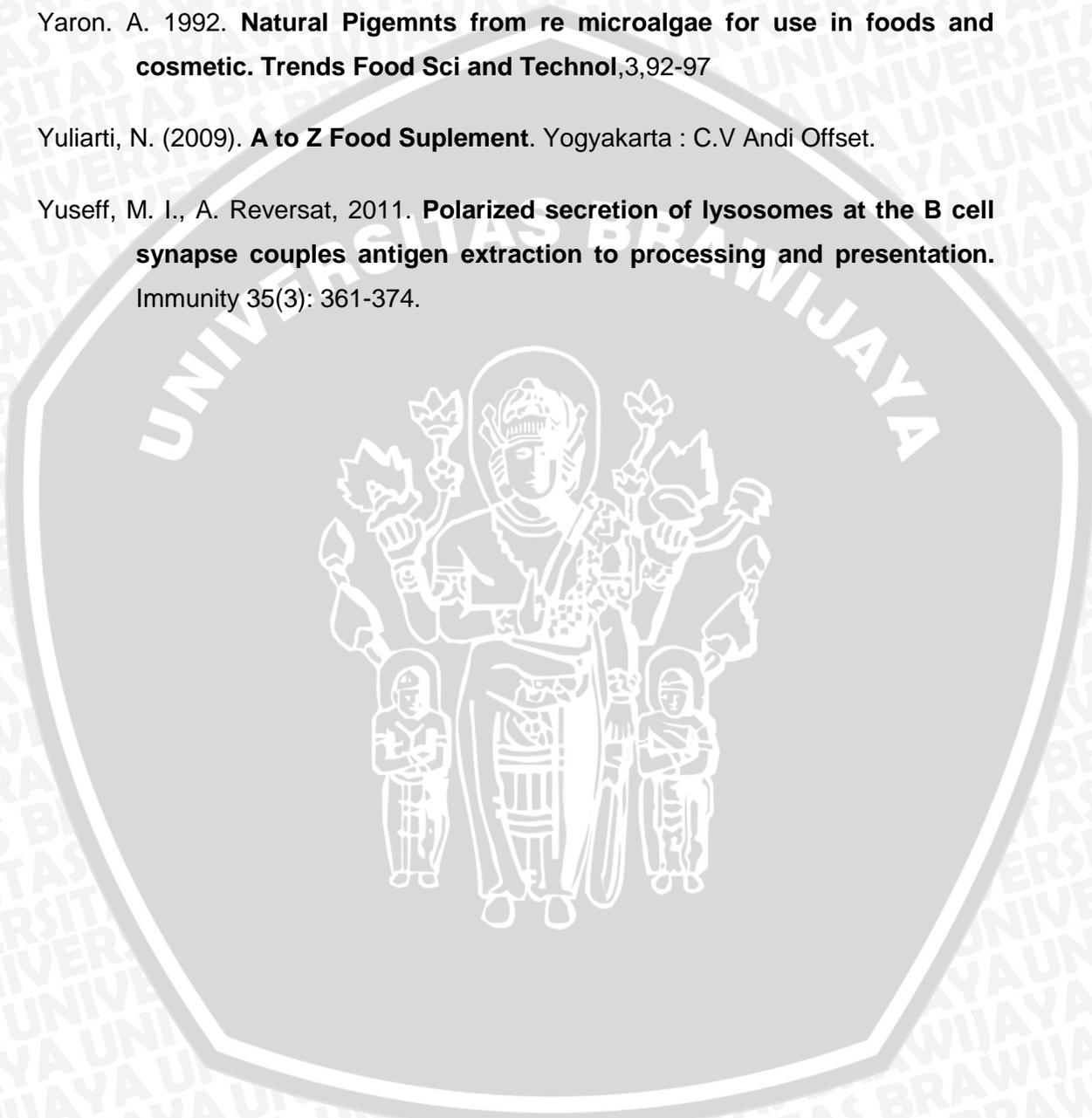
Yanuhar, Uun. 2013. **Laporan Penelitian Unggulan PT-BOPTN**. Direktorat jendral Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan, Melalui

DIPA Universitas brawijaya Nomor: DIPA-023.04.2.424989/2013, Tanggal 5 desember 2012 dan berdasarkan SK Rektor Universitas Brawijaya Nomor: 295/SK/2013 Tanggal 12 Juni 2013. Unpublished.

Yaron. A. 1992. **Natural Pigemnts from re microalgae for use in foods and cosmetic.** Trends Food Sci and Technol,3,92-97

Yuliarti, N. (2009). **A to Z Food Supplement.** Yogyakarta : C.V Andi Offset.

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.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Pertumbuhan Berat Badan Ikan Uji

Perlakuan	Hari Ke- (gr)							Pertumbuhan Total	Rata-rata Per-hari
	0	4	8	12	16	20	24		
Ikan Kontrol	46,0	48,6	50,2	52	56,7	66,8	69,2	23,2	0,97
Ikan + FPP	46,0	48,9	50	51,8	52,5	54,6	58	12,0	0,50
Ikan + VNN	46,0	48,2	49	49,7	-	-	-	-	-
Ikan + FPP + VNN	46,0	47,3	48,4	49	51,8	52,7	54,8	8,8	0,37

Lampiran 2. Penentuan dosis FPP untuk perlakuan pada ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*)

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

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

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

- Dosis yang diberikan pada setiap penyondean :

$$\begin{aligned}
 \text{Penyondean ke-1} \quad 1000 \mu\text{l} / 150 \text{ gr} &= V_2 / 46 \\
 6,66666667 &= V_2 / 46 \\
 6,66 \times 46 &= V_2 \\
 306 &= V_2
 \end{aligned}$$

$$\text{Penyondean ke-2} \quad 1000 \mu\text{l} / 150 \text{ gr} = V_2 / 47,3$$

$$\begin{aligned} 6,666666667 &= V2 / 47,3 \\ 6,66 \times 47,3 &= V2 \\ 315 &= V2 \end{aligned}$$

Penyondean ke-3

$$\begin{aligned} 1000 \mu\text{l} / 150 \text{ gr} &= V2 / 48,4 \\ 6,666666667 &= V2 / 48,4 \\ 6,66 \times 48,4 &= V2 \\ 322 &= V2 \end{aligned}$$

Penyondean ke-4

$$\begin{aligned} 1000 \mu\text{l} / 150 \text{ gr} &= V2 / 49 \\ 6,666666667 &= V2 / 49 \\ 6,66 \times 49 &= V2 \\ 326 &= V2 \end{aligned}$$

Penyondean ke-5

$$\begin{aligned} 1000 \mu\text{l} / 150 \text{ gr} &= V2 / 51,8 \\ 6,666666667 &= V2 / 51,8 \\ 6,66 \times 51,8 &= V2 \\ 345 &= V2 \end{aligned}$$

Penyondean ke-6

$$\begin{aligned} 1000 \mu\text{l} / 150 \text{ gr} &= V2 / 52,7 \\ 6,666666667 &= V2 / 52,7 \\ 6,66 \times 52,7 &= V2 \\ 351 &= V2 \end{aligned}$$

Lampiran 3. 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-12 Berat badan ikan 49 g.

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

Jadi, pada hari ke-12 pemberian pakannya sebanyak **1,04 g**.

Hari ke-16 Berat badan ikan 51,8 g.

$$= 510 / (150 / 51,8)$$

$$= 176,12$$

$$= 176 / 160 \mu\text{g/ml}$$

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

Pada hari ke-16 pemberian pakannya sebanyak **1,10 g**

Hari ke-20 Berat badan ikan 51,8 g.

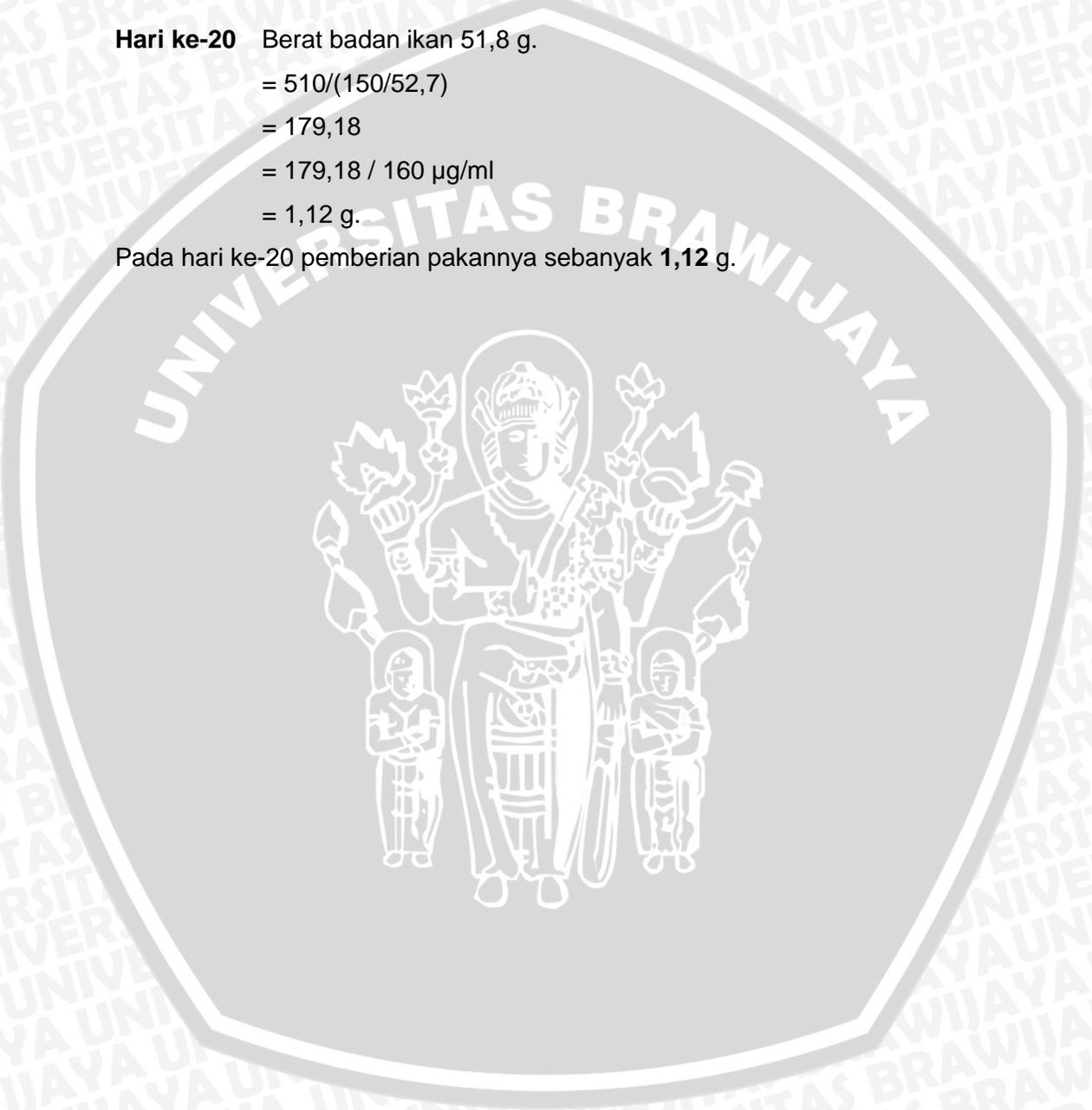
$$= 510 / (150 / 52,7)$$

$$= 179,18$$

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

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

Pada hari ke-20 pemberian pakannya sebanyak **1,12 g.**



Lampiran 4. Dokumentasi selama proses penelitian

Gambar	Keterangan
	<p>Proses pemanenan <i>Spirulina sp</i></p>
	<p>Proses Penyaringan <i>Spirulina sp</i></p>
	<p>Proses sentrifuge untuk menghilangkan kadar air <i>Spirulina sp</i></p>
	<p>Proses Penimbangan bubuk <i>Spirulina sp</i></p>



Proses penggerusan *Spirulina* sp dan pemberian nitrogen cair



Proses sentrifugasi untuk memisahkan pelet dan supernatant



Hasil supernatan dan pelet yang di sentrifugasi



Penginduksia FPP dengan metode sonde

Lampiran 5. Data Analisa Hasil BNT

Tabel analisa sidik ragam

Ulangan	Perlakuan				TOTAL
	Kontrol	FPP	VNN	FPP+VNN	
1	35,2	54.3	57.1	63.4	210
2	37.1	41.2	51.3	64.0	193.6
3	34.7	62.4	56.9	61.4	215.4
Total	107	157.9	160.7	188.8	619

$a = 4$ *db dbp = t-1 dbg = t (r-1)
 $n = 3$ dbt = n-1 = 4-1 = 4(3-1)
 $an = 12$ = 12-1 = 3 = 8
 kuadrat =2

a. $FK = \frac{Y_{ij}^2}{r.t}$
 $= (619)^2 / 3.4$
 $= 38316.1 / 12$
 $= 31930,08$

d) $JKG = JKT - JKP$
 $= 1444,38 - 1186,90$
 $= 257,48$

b. $JKT = (y_{ij})^2 - FK$
 $= 33374,46 - 31930,08$
 $= 1444,38$

e) KT (Kuadrat Tengah)
 $KTP = JKP / dbp = 1186,90 / 3$
 $= 395,63$

c. $JKP = ((y_{ij})^2 / r) - FK$
 $= (99350,94 / 3) - 31930,08$
 $= 33116,98 - 31930,09$
 $= 1186,90$

$KTG = JKG / dbg = 257,48 / 8$
 $= 32,18$

Tabel anova

SK	DB	JK	KT	FHIT	F tabel 5%
A	3	1186,90	395,63	12,29	0.11
Galat	8	257,48	32,18		
Total	11	1444,38			

Perhitungan Nilai BNT Perlakuan :

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

$$= \frac{\sqrt{2 \times 31,40}}{4}$$

$$= 2,01$$

BNT 5% = T Tabel 5%. SED

$$= 2,31 \cdot 2,01$$

$$= 4,63$$

Tabel BNT

Rata-rata B Aktin	35.67	52.63	55.10	62.93	notasi
35.67	-	-	-	-	a
52.63	16.97	-	-	-	b
55.10	19.44	2.47	-	-	c
62.93	27.27	10.30	7.83	-	d