EKSPRESI TNF-α (Tumor Necrosis Factor Alpha) MATA IKAN KERAPU CANTANG (Epinephelus fuscoguttatus x Epinephelus lanceolatus) YANG DIINFEKSI VNN (Viral Nervous Necrosis) DENGAN PEMBERIAN EKSTRAK Dunaliella salina

SKRIPSI

Oleh:

GERALDINE ANGGI PUTRI NIM. 155080501111027



PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG 2019 EKSPRESI TNF-α (Tumor Necrosis Factor Alpha) MATA IKAN KERAPU CANTANG (Epinephelus fuscoguttatus x Epinephelus lanceolatus) YANG DIINFEKSI VNN (Viral Nervous Necrosis) DENGAN PEMBERIAN EKSTRAK Dunaliella salina

SKRIPSI

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

Oleh:

GERALDINE ANGGI PUTRI NIM. 155080501111027



PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG 2019

SKRIPSI

EKSPRESI TNF-α (Tumor Necrosis Factor Alpha) MATA IKAN KERAPU CANTANG (Epinephelus fuscoguttatus x Epinephelus lanceolatus) YANG DIINFEKSI VNN (Viral Nervous Necrosis) DENGAN PEMBERIAN EKSTRAK Dunaliella salina

> Oleh: **GERALDINE ANGGI PUTRI** NIM. 155080501111027

telah dipertahankan didepan penguji pada tanggal 18 Juni 2019 dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui, Dosen Pembimbing 1 Menyetujui, Dosen Pembimbing 2

(Dr. Ating Yuniarti, S.Pi., M.Aqua.) NIP. 19750604 199903 2 002

Tanggal:

0 4 JUL 2019

(Rani Yuwanita, S.Pi., MP.) NIK. 201506 860612 2 001

Tanggal: 04 JUL 2019

Mengetahui,

Ketua Jurusan Manajemen

umberdaya Perairan

BRAWIJAY

IDENTITAS TIM PENGUJI

Judul : Ekspresi TNF-α (*Tumor Necrosis Factor Alpha*) Mata

Ikan Kerapu Cantang (Epinephelus fuscoguttatus x

Epinephelus lanceolatus) yang Diinfeksi VNN (Viral

Nervous Necrosis) Dengan Pemberian Ekstrak

Dunaliella salina

Nama Mahasiswa : Geraldine Anggi Putri

NIM : 155080501111027

Program Studi : Budidaya Perairan

Penguji Pembimbing:

Dosen Pembimbing 1: Dr. Ating Yuniarti, S.Pi., M.Aqua.

Dosen Pembimbing 2: Rani Yuwanita, S.Pi., MP.

Penguji Bukan Pembimbing:

Dosen Penguji 1 : Qurrota A'yunin, S.Pi., MP., M.Sc.

Dosen Penguji 2 : M. Fakhri, S.Pi., MP., M.Sc.

Tanggal Ujian : 18 Juni 2019

UCAPAN TERIMA KASIH

Al-hamdu lillahi rabbil 'alamin. Penulis mengucapkan terima kasih kepada seluruh pihak yang telah berperan dalam membantu kelancaran penelitian hingga penulisan laporan Skripsi ini. Terima kasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada:

- Allah SWT. karna atas segala rahmat dan hidayah-Nya hingga laporan Skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik. Penulis memanjatkan syukur kepada Allah SWT. yang telah memudahkan segala urusan penulis.
- Yunita Siahaan dan Eko Tjiptojuwono selaku orang tua penulis, Natasya Ekaputri dan Jason Dimas Ekoputra selaku saudara kandung penulis yang tiada henti memberikan dukungan moral, mental, materiil, doa, serta nasehat kepada penulis hingga penelitian ini dapat terselesaikan.
- 3. Ibu Dr. Ating Yuniarti, S.Pi., M.Aqua. dan Ibu Rani Yuwanita, S.Pi., MP. selaku dosen pembimbing atas kesediaan waktunya untuk membimbing penulis hingga penelitian dan laporan skripsi ini selesai.
- Ibu Qurrota A'yunin, S.Pi., MP., M.Sc. dan Bapak M. Fakhri, S.Pi., MP.,
 M.Sc. sebagai dosen penguji atas kritik dan sarannya serta kesediaan waktunya dalam menghadiri ujian akhir skripsi penulis.
- 5. Ibu Fatma sebagai pembimbing lapang di BPBAP Situbondo yang telah membantu penulis dalam mengerjakan penelitian.
- 6. Tim Dunaliella (Alma, Cam, Vio, Ojan, Uda) selaku teman seperjuangan penelitian yang saling membantu dan menunggu hingga seminar, ujian dan lulus bersama-sama.
- 7. Octopus (Maura, Bella, Pipit, Tita, Amini, Dima, Ina) selaku teman perkuliahan dan teman main yang selalu memberi dukungan dan semangat terhadap penulis.

RINGKASAN

GERALDINE ANGGI PUTRI. Skripsi Tentang Ekspresi TNF-α (*Tumor Necrosis Factor Alpha*) Mata Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus lanceolatus*) yang Diinfeksi VNN (*Viral Nervous Necrosis*) Dengan Pemberian Ekstrak *Dunaliella salina* (dibawah bimbingan **Dr. Ating Yuniarti, S.Pi., M.Aqua.** dan **Rani Yuwanita, S.Pi., MP.**)

Virus *Viral Nervous Necrosis* (VNN) merupakan salah satu patogen yang sering ditemukan menginfeksi ikan kerapu cantang dan menyebabkan kematian masal hingga 100% dalam waktu singkat. VNN disebabkan oleh infeksi *Nodavirus* yang menginfeksi sistem saraf dan penglihatan ikan. Pencegahan VNN pada ikan kerapu cantang dapat dilakukan dengan menggunakan mikroalga *Dunaliella salina* yang memiliki kandungan β -karoten, *nephtalene*, tetradekana dan fenol yang berperan sebagai anti virus, anti mikroba dan anti inflamasi. Fungsi anti virus pada *D. salina* dapat mempengaruhi jumlah VNN dan respon imun ikan seperti TNF- α . Tujuan penelitian untuk mengetahui ekspresi TNF- α mata ikan kerapu cantang yang diinfeksi VNN dengan pemberian ekstrak *D. salina* pada pakan.

Metode yang digunakan adalah deskriptif kuantitatif dengan membandingkan persentase ekspresi TNF-α tiap perlakuan yang dianalisa menggunakan software ImmunoRatio. Perlakuan pada penelitian ini yaitu pemberian ekstrak *D. salina* pada pakan secara *repelleting* menggunakan dosis 250, 300, 350 dan 400 mg/kg pellet dan 0 mg/kg atau tanpa pemberian *D. salina* yang dipelihara selama 10 hari. Ikan kerapu cantang ukuran 7-9 cm sebanyak 50 ekor diuji tantang dengan menyuntikkan VNN sebanyak 0,2 ml/ekor.

Gejala klinis ikan kerapu cantang yang diinfeksi VNN yaitu pada 12 jam, 24 jam dan 36 jam pasca infeksi ikan belum menunjukkan gejala yang tidak normal dengan gerakan renang yang masih aktif, nafsu makan normal dan warna tubuh yang normal; pada 48 jam dan 60 jam pasca infeksi ikan mulai menunjukkan gejala tidak normal seperti bergerak pasif, sering berdiam dan bergerombol di dasar bak, berenang miring, nafsu makan menurun dan warna tubuh menggelap pada perlakuan dosis 0 mg/kg, 250 mg/kg dan 300 mg/kg, sedangkan perlakuan dosis 350 mg/kg menunjukkan gejala yang sama pada 72 jam pasca infeksi dan perlakuan dosis 400 mg/kg juga menunjukkan gejala yang sama pada 84 jam pasca infeksi. Lesi anatomi yang didapatkan yaitu ikan menunjukkan perubahan warna pada sirip pektoral menjadi kemerahan, hati menguning dan limfa yang membengkak. Survival Rate (SR) yang didapatkan pada perlakuan pemberian D. salina dengan dosis 0 mg/kg, 250 mg/kg, 300 mg/kg, 350 mg/kg dan 400 mg/kg secara berturut-turut yaitu sebesar 30%, 40%, 40%, 50% dan 60% dengan total ikan mati sebanyak 28 ekor sampai hari kelima pengamatan. Uji PCR menunjukkan hasil bahwa ikan kerapu cantang positif terinfeksi VNN dilihat dari adanya perpendaran pita DNA pada 294 bp. Uji SDS-PAGE menunjukkan hasil bahwa VNN menginfeksi ikan pada berat molekul (BM) 35 kDa - 50 kDa. Ekspresi TNF-α yang didapatkan pada perlakuan dosis D. salina 0 mg/kg, 250 mg/kg, 300 mg/kg, 350 mg/kg, 400 mg/kg dan ikan normal secara berturut-turut yaitu 77,3%, 70,6%, 61,0%, 57,3%, 43,4% dan 39,1%. Perlakuan terbaik yaitu pemberian D. salina dosis 400 mg/kg.

BRAWIJAYA

KATA PENGANTAR

Penulis menyajikan laporan penelitian yang berjudul "Ekspresi TNF- α (*Tumor Necrosis Factor Alpha*) Mata Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus lanceolatus*) yang Diinfeksi VNN (*Viral Nervous Necrosis*) Dengan Pemberian Ekstrak *Dunaliella salina*" sebagai laporan akhir dan salah satu syarat untuk meraih gelar sarjana perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya. Di bawah bimbingan Ibu Dr. Ating Yuniarti, S.Pi., M.Aqua. sebagai pembimbing I dan Ibu Rani Yuwanita, S.Pi., MP. sebagai pembimbing II.

Penelitian ini melanjutkan penelitian yang telah dilakukan oleh mahasiswa program studi Budidaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya angkatan terdahulu. Diharapkan hasil dari penelitian ini dapat dijadikan informasi untuk dapat mengembangkan penelitian selanjutnya.

Malang, 20 Juni 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
IDENTITAS TIM PENGUJI	iv
UCAPAN TERIMA KASIH	
RINGKASAN	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	
DAFTAR LAMPIRAN	xii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan 1.4 Kegunaan	3
1.4 Kegunaan	4
1.4.1 Kegunaan Teoritis	4
1.4.2 Kegunaan Praktis	4
1.5 Waktu dan Tempat	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Ikan Kerapu Cantang (Epinephelus fuscoguttatus x E. lanceola	atus)5
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi	
2.1.2 Habitat	
2.1.3 Kebiasaan Makan Ikan Kerapu Cantang	7
2.1.4 Sistem Pertahanan Tubuh Ikan Kerapu Cantang	
2.2 Uji TNF- $lpha$	9
2.3 Dunaliella salina 2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi	11
2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi	11
2.3.2 Habitat	
2.3.3 Siklus Hidup	
2.3.4 Kandungan <i>Dunaliella salina</i>	
2.4 Viral Nervous Necrosis (VNN)	15
2.4.1 Klasifikasi dan Morfologi	
2.4.2 Habitat	
2.4.3 Mekanisme Infeksi VNN	17
III. METODE PENELITIAN	18
3.1 Materi Penelitian	
3.1.1 Alat-alat Penelitian	
3.1.2 Bahan-bahan Penelitian	
3.2 Metode Penelitian	
3.3 Teknik Pengumpulan Data	
3.3.1 Data Primer	
3.3.2 Data Sekunder	
3.4 Prosedur Penelitian	
3.4.1 Penelitian Pendahuluan	
3.4.2 Penelitian Utama	
3.4.3 Pembuatan Ekstrak Dunaliella salina	23

		3.4.4 Repelleting	24
		3.4.5 Isolasi Virus	
		3.4.6 Persiapan Ikan Penelitian	
	3.5	Pelaksanaan Penelitian	25
		3.5.1 Pemberian Pakan	25
		3.5.2 Uji Tantang	26
		3.5.3 Pengamatan Gejala Klinis	26
		3.5.4 Pengamatan Lesi Anatomi	. 26
		3.5.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)	. 26
		3.5.6 Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis	
		(SDS-PAGE)	. 28
		3.5.7 Pengambilan Organ Mata Ikan Kerapu Cantang	
		3.5.8 Metode Uji Ekspresi TNF- α	
	3.6	Parameter Uji	
		3.6.1 Parameter Utama	
		3.6.2 Parameter Penunjang	
	3.7	Analisis Deskriptif	. 31
11 /	ЦΛ	SIL DAN PEMBAHASAN	20
IV	.ΠΑ₹ 11	Parameter Utama	. JZ
	4.1	4.1.1 Gejala Klinis	
		4.1.2 Lesi Anatomi	36
		4.1.3 Survival Rate (SR)	37
		4.1.3 Survival Rate (SR)	38
		4.1.5 Uji SDS-PAGE	39
		4.1.6 Uji TNF-α Mata Ikan Kerapu Cantang	
	4.2	Parameter Penunjang	
		4.2.1 Kualitas Air	46
٧.	KES	SIMPULAN DAN SARAN	48
	5.1	Kesimpulan	48
	5.2	Saran	48
_			
D/	4F [/	AR PUSTAKA	.49
ı۸	MDI	DANI	5 7

DAFTAR GAMBAR

Gambar H	Halaman
1. Ikan Kerapu Cantang	6
2. Aktivasi TNF-α	8
3. Ekspresi TNF- $lpha$ pada Jaringan Mata Ikan Kerapu yang Terinfeksi VNN	10
4. Dunaliella salina	11
5. Nervous Necrosis Virus pada ikan kerapu	16
6. Prosedur Kerja Penelitian Pendahuluan	
7. Prosedur Kerja Penelitian Utama	22
8. Halaman Depan ImmunoRatio Software	31
9. Gejala Patologi Klinik Ikan Kerapu Cantang Pasca Infeksi VNN	35
10. Lesi Anatomi Ikan Kerapu Cantang pasca infeksi VNN	36
11. Hasil Uji PCR Ikan Kerapu Cantang yang Diinfeksi VNN	39
12. Hasil Analisa SDS-PAGE pada Ikan Kerapu Cantang yang Diinfeksi V	NN 40
13. Ekspresi TNF-α Mata Ikan Kerapu Cantang Berwarna Cokelat	42

BRAWIJAYA

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Kandungan Bioaktif <i>D. salina</i>	14
2. Gejala Patologi Klinik Pasca Infeksi VNN	32
3. Survival Rate Ikan Kerapu Cantang Selama Penelitian	37
4. Ekspresi TNF-α pada Ikan Kerapu Cantang	41
5. Kisaran Parameter Kualitas Air Selama Penelitian	46



BRAWIJAYA

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alat-Alat Penelitian	57
2. Bahan-Bahan Penelitian	61
3. Data Hasil Uji SDS-PAGE Ikan Kerapu Cantang yang Diinfeksi VNN .	64
4. Data Hasil Pengamatan Kualitas Air Selama Penelitian	65
5 Data SR Ikan Keranu Cantang Selama Penelitian	67



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Negara Indonesia memiliki potensi budidaya perikanan tambak dan laut yang sangat besar (Rahmaningsih dan Ari, 2013). Organisme perikanan yang ada di lautan Indonesia sangat diminati masyarakat tidak hanya di Indonesia tapi juga internasional. Kegiatan perdagangan produk perikanan di Indonesia baik ekspor maupun impor setiap tahunnya akan terus meningkat dengan potensi sumber daya yang besar. Lalu lintas komoditas perikanan baik antar negara maupun antar area di dalam wilayah Indonesia semakin meningkat (Fitriatin dan Manan, 2015). Salah satu jenis spesies yang berpotensi menjadi komoditas budidaya adalah ikan kerapu.

Ikan kerapu memiliki nilai ekonomis yang tinggi baik di dalam negeri maupun di luar negeri sehingga penangkapan dan budidayanya bisa berkembang (Langkosono, 2007). Produksi ikan kerapu budidaya pada tahun 1999 sebesar 759 ton, meningkat menjadi 6.493 ton pada tahun 2005 dengan nilai total sekitar Rp. 116.891.489.000. Produksi kerapu dari usaha budidaya meningkat 1,5% setiap tahun dan berkontribusi terhadap total produksi makanan ikan laut (Afero, 2012). Jenis ikan kerapu yang memiliki prospek cerah salah satunya ikan kerapu cantang (Rahmaningsih dan Ari, 2013).

Ikan kerapu cantang (*Epinephelus fuscoguttatus* x *E. lanceolatus*) mudah dibudidayakan di tambak karena memiliki selera makan yang baik dan pertumbuhan jenis ikan kerapu ini lebih cepat dibandingkan dengan ikan kerapu lainnya. Keunggulan yang dimiliki ikan kerapu cantang menjadikan ikan kerapu jenis ini salah satu spesies target utama dalam budidaya (Luin, *et al.*, 2013). Kematian ikan tidak lepas dari kegiatan usaha budidaya. Tingkat mortalitas yang tinggi pada benih maupun larva ikan kerapu menjadi kendala utama dalam

kegiatan budidaya (Roza, et al., 2006). Penyebab kematian masal tersebut dapat disebabkan oleh adanya penyakit akibat dari infeksi virus. Beberapa jenis virus yang sering ditemukan menginfeksi ikan kerapu yaitu *Viral Nervous Necrosis Virus* (VNNV), *Grouper Iridovirus* (GIV) dan *Lympocyscvirus* (Hakim, et al., 2016).

Viral Nervous Necrosis (VNN) atau Viral Encephalopathy and Renopathy (VER) merupakan penyakit ikan yang disebabkan oleh Nodavirus dan menyebabkan kematian masal pada stadia larva dan benih ikan kerapu (Hakim, et al., 2016). Virus VNN mampu menyebabkan kematian massal hingga 100% dalam waktu singkat dengan menginfeksi sistem saraf dan penglihatan ikan (Tarsim, et al., 2013). Kematian masal yang disebabkan oleh infeksi virus VNN pada sistem budidaya dapat mengakibatkan kerugian yang besar bagi pembudidaya (Novisa, et al., 2015). Virus VNN telah banyak dilaporkan menginfeksi ikan laut yang dibudidayakan di Indonesia dan telah ditetapkan dalam Kepmen nomor 26 tahun 2013 sebagai Hama Penyakit Ikan Karantina (HPIK) Golongan I (Fitriatin dan Manan, 2015). Sejauh ini belum ditemukan obat untuk penyakit yang disebabkan oleh virus pada ikan. Pendekatan dengan pencegahan munculnya penyakit menjadi salah satu cara yang paling efektif untuk meminimalkan terjadinya wabah penyakit VNN (Tarsim, et al., 2103). Pencegahan VNN pada ikan kerapu cantang dapat dilakukan dengan menggunakan mikroalga Dunaliella salina (Mustopa, et al., 2012).

Mikroalga memiliki kandungan inhibitor enzim seperti protease, helikase dan polimerase yang berfungsi sebagai pencegah virus untuk bereplikasi (Bhattacharjee, 2016). *D. salina* diketahui menjadi salah satu jenis mikroalga hijau yang dapat memproduksi fenol (Duan, *et al.*, 2017). Fenol pada *D. salina* memiliki fungsi sebagai senyawa anti mikroba, anti oksidan, anti virus, anti alergi dan anti inflamasi (Cepeda, *et al.*, 2018). Bhattacharjee (2016) menambahkan

bahwa *D. salina* memiliki kandungan β-karoten terbesar dibandingkan mikroalga lain yaitu 14% dari berat kering. β-karoten berfungsi sebagai nutrisi esensial dan dapat diubah tubuh menjadi vitamin A, serta bertindak sebagai antioksidan lemah (Hadiyanto dan Azim, 2012). *D. salina* memiliki kandungan senyawa asam linoleat dan asam palmitat yang berpotensi sebagai anti mikroba. Asam lemak pada *D. salina* juga dapat digunakan sebagai senyawa bioaktif untuk anti inflamasi, anti virus, anti kanker dan anti fungi (Agustini dan Kusmiati, 2012). Berdasarkan Supamattaya, *et al.* (2005), pemberian ekstrak *D. salina* dosis 300 mg/kg pakan dapat menghambat kematian ikan atau udang dan menghasilkan SR tertinggi yaitu 33,3% dibandingkan dosis lain yang lebih rendah. Fungsi anti virus dari *D. salina* dapat mempengaruhi respon imun ikan seperti TNF-α.

TNF- α merupakan jenis sitokin utama yang terjadi akibat adanya respon inflamasi akut. Infeksi patogen memicu sinyal inflamasi yang akan mengaktifkan makrofag untuk menghasilkan TNF- α . Infeksi yang berlebih dapat memicu dihasilkannya TNF- α dalam sel tubuh dengan jumlah yang besar. TNF- α memiliki peran penting dalam pertahanan tubuh ikan terhadap infeksi patogen (Yanuhar, *et al.*, 2015). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui ekspresi TNF- α mata ikan kerapu cantang yang diinfeksi virus VNN dan diberi *D. salina* pada pakan.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah penelitian ini yaitu bagaimana ekspresi TNF-α mata ikan kerapu cantang yang diinfeksi VNN dengan pemberian ekstrak *Dunaliella salina* pada pakan dengan waktu pemeliharaan selama 10 hari?

1.3 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui ekspresi TNF- α mata ikan kerapu cantang yang diinfeksi VNN dengan pemberian ekstrak *Dunaliella salina*.

BRAWIJAYA

1.4 Kegunaan

Kegunaan dari penelitian ini dapat berguna secara teoritis maupun secara praktis. Kegunaan tersebut antara lain:

1.4.1 Kegunaan Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan menjadi referensi atau sumber informasi mengenai potensi *Dunaliella salina* terhadap pencegahan infeksi virus VNN dilihat dari perbedaan ekspresi TNF- α mata ikan.

1.4.2 Kegunaan Praktis

Hasil penelitian ini dapat menambah pengetahuan, pengalaman dan ketrampilan bagi masyarakat khususnya para pembudidaya ikan kerapu cantang dalam mengatasi permasalahan kesehatan ikan yang diakibatkan oleh VNN, sehingga menjadi salah satu solusi dalam mengatasi permasalahan kesehatan ikan secara ramah lingkungan.

1.5 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Eksplorasi Sumberdaya Perikanan dan Kelautan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Situbondo, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya pada bulan Januari - Maret 2019.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Kerapu Cantang (Epinephelus fuscoguttatus x E. lanceolatus)

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Kerapu cantang adalah kerapu hasil silangan atau hibridisasi antara Kerapu Macan betina (*Epinephelus fuscoguttatus*) dan Kerapu Kertang jantan (*Epinephelus lanceolatus*) yang dilakukan di Balai Budidaya Air Payau (BBAP) Situbondo, Jawa Timur sejak tahun 2009 (Fitriyani, *et al.*, 2015). Klasifikasi Ikan Kerapu menurut Soemarjati, *et al.* (2015), yaitu sebagai berikut:

Filum : Chordata

Subfilum: Vertebrata

Klas : Pisces

Ordo : Pisciformes

Famili : Serranidae

Genus : Epinephelus

Spesies : Epinephelus fuscoguttatus x Epinephelus lanceolatus

Secara morfologis, ikan kerapu cantang memiliki kemiripan dengan kedua induknya, namun pertumbuhannya lebih baik dibandingkan dengan ikan kerapu macan dan kerapu kertang (Fitriyani, *et al.*, 2015). Kerapu cantang merupakan ikan kerapu hasil hibridisasi yang unggul dengan bobot mencapai 1 kg dalam kurun waktu 5 bulan saja. Keunggulan lainnya yaitu cantang juga lebih adaptif dan tahan penyakit. Bentuk tubuh kerapu cantang hampir sama dengan induknya yaitu kompres membulat. Warna tubuh cokelat kehitaman dengan 5 garis melintang, bentuk mulut lebar dengan bibir bawah lebih panjang dari bibir atas, bintik hitam tersebar di area kepala dan dekat sirip pektoral (Soemarjati, *et al.*, 2015). Morfologi ikan kerapu cantang disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Ikan Kerapu Cantang (Sutarmat dan Yudha, 2013)

2.1.2 Habitat

Habitat alami ikan kerapu adalah di perairan laut berbatu karang dengan kedalaman antara 40-60 meter atau di daerah dangkal berbatu koral. Ikan kerapu muda biasanya hidup pada kedalaman 0,5-3 meter (Mursitorini dan Ramdhani, 2016). Ketika dewasa berpindah ke perairan yang lebih dalam di kedalaman antara 7-40 meter. Ikan kerapu biasanya berpindah pada siang dan sore hari. Kerapu muda hingga dewasa bersifat demersal atau berdiam di dalam kolam. Sifat kerapu yaitu sebagai organisme nocturnal dimana pada siang hari kerapu lebih banyak menghabiskan waktunya di dasar atau bersembunyi di liang-liang karang dan akan aktif bergerak di kolom air pada malam hari untuk mencari makanan (Subyakto dan Cahyaningsih, 2003).

Daerah penyebaran kerapu cukup luas, secara umum kerapu tersebar di perairan Afrika, Taiwan, Filipina, Malaysia, Australia, Indonesia dan Papua Nugini. Penyebaran ikan kerapu di Indonesia sendiri dapat ditemukan di seluruh perairan nusantara (Kordi, 2010). Daerah spesifik penyebaran kerapu macan di Afrika Timur, Kepulauan Ryukyu (Jepang Selatan), Australia, Taiwan, Mikronesia dan Polinesia (Soemarjati, *et al.*, 2015). Kualitas perairan optimal untuk pertumbuhan ikan kerapu yaitu suhu berkisar antara 24-31°C, salinitas antara 30-33 ppt, oksigen terlarut > 3,5 ppm dan pH berkisar antara 7,8-8,0 (Langkosono, 2007).

2.1.3 Kebiasaan Makan Ikan Kerapu Cantang

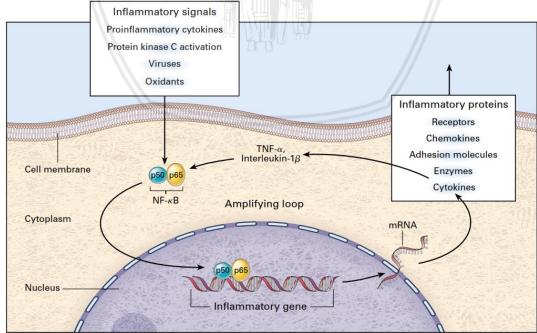
Kerapu cantang hasil hibridisasi mewarisi gen pertumbuhan dari kerapu kertang yang relatif tinggi. Kerapu cantang memiliki nafsu makan yang tinggi serta dapat memanfaatan pakan lebih baik untuk mengimbangi laju metabolismenya, dibandingkan dengan benih dari perkawinan silang lainnya (Sutarmat dan Yudha, 2013). Pakan yang diberikan saat pemeliharaan ikan kerapu yaitu pakan segar dan pakan buatan. Pakan segar berupa ikan rucah dan pakan buatan berupa pelet (Sim, *et al.*, 2005).

Ikan kerapu merupakan ikan karnivora dengan cara makan yang melahap satu persatu pakan yang diberikan sebelum sampai ke dasar. Pakan yang paling disukai dari jenis crustaceae (udang-udangan) seperti rebon, dogol, krosok dan jenis ikan-ikan kecil seperti tembang, teri dan belanak. Pemberian pakan ikan kerapu cantang yaitu sebesar 10-15% dari berat tubuh perhari dan pertumbuhan ikan akan maksimal jika pakan diberikan sebanyak 15 % dari berat tubuh perhari (Rahmaningsih dan Ari, 2013). Ikan kerapu membutuhkan nutrisi yang cukup dalam pakan untuk pertumbuhan dengan konsentrasi protein yang baik berkisar antara 45-55% dan lemak antara 8-14% (Marzugi dan Anjusary, 2013).

2.1.4 Sistem Pertahanan Tubuh Ikan Kerapu Cantang

Ikan kerapu cantang hasil persilangan memiliki sifat-sifat yang unggul dibandingkan dengan induknya termasuk ketahanannya terhadap infeksi penyakit lebih baik (Sumino, et al., 2017). Penelitian yang dilakukan oleh Sutarmat dan Yudha (2013) menunjukkan hasil bahwa koefisien pertumbuhan tertinggi dihasilkan oleh kerapu cantang dibandingkan dengan jenis ikan kerapu yang lain. Disimpulkan pula bahwa ikan kerapu hibrid cantang dapat memanfaatkan pakan dengan baik sehingga pertumbuhannya lebih cepat.

Sistem pertahanan tubuh ikan kerapu macan terhadap virus dapat dilihat dari pengamatan TNF- α pada mata ikan. TNF- α merupakan mediator pada



Gambar 2. Aktivasi TNF- α (Barnes dan Karin, 1997)

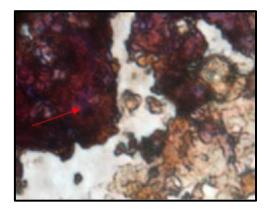
Mekanisme aktivasi TNF- α berdasarkan bagan diatas yang dijelaskan oleh Barnes dan Karin (1997) yaitu setelah NF-kB diaktifkan oleh sinyal inflamasi yang berasal dari infeksi virus, NF-kB masuk kedalam nukleus dan berikatan dengan *inflammatory gen* lalu diterjemahkan dan dibawa oleh m-RNA menuju *inflammatory protein*. Pada tahap ini sitokin mengeluarkan protein proinflamasi TNF- α dan Inteleukin-1 β didalam sitoplasma. TNF- α yang dikeluarkan bekerja pada sel-sel yang mengalami kerusakan. Apabila infeksi terus menerus terjadi dan dibutuhkan lebih banyak respon imun, maka TNF- α dapat bertindak sebagai sinyal inflamasi untuk mengaktifkan kembali makrofag dan sitokin yang selanjutnya memproduksi TNF- α dan interleukin.

2.2 Uji TNF- α

Tumor Necrosis Factor alpha (TNF-α) merupakan sitokin utama pada respon inflamasi akut terhadap infeksi bakteri dan mikroba lainnya. Infeksi yang berat dapat memicu produksi TNF dalam jumlah besar yang menimbulkan reaksi sistemik (Supit, et al., 2015). TNF-α merupakan sitokin yang bersifat sebagai pirogen. TNF-α dalam kadar rendah dapat menghambat pertumbuhan stadium darah parasit dengan mengaktifkan sistem imun seluler dan dapat membunuh parasit secara langsung namun aktivitasnya lemah. Peran ganda dari sitokin TNF-α yaitu pada kadar yang tepat akan memberi perlindungan dan penyembuhan, tetapi kadar berlebihan yang merupakan tanggapan terhadap hiperparasitemia dan pertumbuhan parasit yang berlebihan akan menyebabkan kerusakan jaringan yang sangat berat dan fatal (Irawati, et al., 2008). Infeksi virus VNN pada ikan akan meningkatkan jumlah TNF-α. Apabila infeksi pada ikan berlebihan, kadar TNF-α meningkat dan menyebabkan kerusakan jaringan fatal.

Beberapa penelitian pada ikan membuktikan bahwa TNF-α penting dalam mengaktivasi makrofag. Penelitian pada ikan rainbow trout, turbot, sea bream

(Sparus aurata), goldfish (Carassius auratus) dan catfish menunjukkan bahwa TNF mengaktifkan makrofag, sehingga meningkatkan aktivitas respirasi, fagositosis dan produksi nitric oxide (Uribe, et al., 2011). TNF-α berperan dalam pengaturan makrofag untuk memproduksi IL-12. TNF-α berperan penting sebagai kofaktor sintesis IL-12 dalam meningkatkan produksi IFN-y oleh sel NK (natural killer) (Kahtan, et al., 2018). Sel NK sendiri merupakan sel darah putih turunan limfosit yang berperan sebagai sistem pertahanan nonspesifik terhadap tumor, sedangkan sitokin IFN-y berperan sebagai sistem surveillance tumor dan melindungi terhadap tumor yang muncul secara spontan (Mihardia dan Hety, 2011). Tumor Necrosis Factor diketahui dapat merangsang produksi sitokin, meningkatkan ekspresi molekul adhesi dan aktivasi netrofil, juga merupakan stimulator tambahan untuk aktivasi sel T dan produksi antibodi oleh sel B (Maulina, 2015). Induksi TNF-α melalui reseptor TNF-α pada makrofag, akan meningkatkan sintesis ROS dan NO yang bersifat toksik terhadap parasit. Mekanisme tersebut menunjukkan bahwa TNF-α terlibat secara langsung dalam aktivasi sistim imun hospes terhadap infeksi (Kahtan, et al., 2018). Ekspresi TNFα yang diwarnai menggunakan pewarnaan IHK pada penelitian Yanuhar (2015), menunjukkan bahwa warna cokelat mengindikasikan adanya TNF-α dan warna ungu tidak terdapat TNF- α (Gambar 3).



Gambar 3. Ekspresi TNF- α pada Jaringan Mata Ikan Kerapu yang Terinfeksi VNN (Yanuhar, 2015)

BRAWIJAY

2.3 Dunaliella salina

2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi *Dunaliella salina* menurut Kumar, et al. (2018), antara lain:

Kingdom : Plantae

Filum : Chlorophyta

Klas : Chlorophyceae

Ordo : Volvocales

Famili : Dunaliellaceae

Genus : Dunaliella

Spesies : Dunaliella salina

Mikroalga adalah makhluk hidup unisel berukuran antara 1 μm sampai ratusan μm. Mikroalga memiliki klorofil, hidup di air tawar atau laut, memerlukan karbon dioksida, beberapa nutrien dan cahaya untuk berfotosintesis. Alga *D. salina* merupakan salah satu contoh mikroalga yang banyak dibudidayakan. Alga *D. salina* memiliki bentuk bulat, bersel eukariotik, uniseluler dengan diameter berkisar antara 5-10 mikrometer (Hadiyanto dan Azim, 2012). Ciri unik sel Dunaliella adalah tidak memiliki dinding sel yang kaku. Ciri ini yang membedakannya dari alga hijau uniseluler lainnya. Ketiadaan dinding sel membuat gangguan terhadap sel jauh lebih mudah daripada alga lainnya (Kulshreshtha dan Singh, 2013). Morfologi *D. salina* disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4. Dunaliella salina (Wehr, et al., 2015)

BRAWIJAY

2.3.2 Habitat

Mikroalga dominan berada dalam garam dan lingkungan hipersalin alami. Mikroalga dikenal dengan kemampuan mereka untuk beradaptasi dengan berbagai perubahan pada medianya. Alga Dunaliella tersebar luas di dunia dan hidup di habitat yang sangat luas. Mikrorganisme ini dibudidayakan di banyak negara untuk memproduksi protein karotenoid gliserol dan vitamin yang memberi makan ikan dan konsumsi manusia serta produksi biofuel dan formulasi farmasi (Charioui, et al., 2016). Dunaliella banyak ditemukan hampir di semua perairan dengan kadar salinitas tinggi di dunia seperti Afrika, Amerika, Asia, Australia dan Eropa (Arun dan Singh, 2016).

Dunaliella tumbuh dengan baik dalam perairan berkadar garam 120 gr/L NaCl (Seckbach, 2007). Dunaliella toleran terhadap berbagai suhu kurang dari 0°C hingga diatas 40°C dengan kadar optimal suhu antara 21-40°C. Suhu pertumbuhan optimum tergantung pada ketegangan dan intensitas cahaya. Karotenogenesis pada Dunaliella terangsang di lingkungan dengan suhu tinggi mendekati 40°C atau lebih. Kadar PH optimum adalah 7-9. Alga *D. salina* mampu mengakumulasi konsentrasi β-karoten yang tinggi yang dapat mencapai hingga 10-14% dari berat kering terutama ketika tumbuh di bawah tekanan lingkungan seperti iradiasi yang intens, salinitas tinggi, kekurangan nutrisi (nitrogen, fosfat, dan sulfat) dan suhu ekstrim (Hamed, *et al.*, 2017).

2.3.3 Siklus Hidup

Tahap pertumbuhan *Dunaliella salina* berdasarkan Masithah, *et al.*, (2011) terdiri dari 4 fase, yaitu fase adaptasi, fase eksponensial, fase stationer dan fase kematian.

 Fase adaptasi, terjadi pada H0 setelah D. salina ditebar pada medium baru dan masih dengan kepadatan yang sama

BRAWIJAYA

- Fase eksponensial, terjadi pada hari ketiga, dimana terjadi puncak kepadatan
 D. salina. Fase eksponensial merupakan fase dimana terjadi kecepatan
 pertumbuhan yang didukung dengan ketersediaan nutrient yang cukup dan
 kondisi lingkungan kultur yang sesuai.
- Fase stationer, merupakan fase dimana tidak ada lagi pertumbuhan, kecepatan pertumbuhan menjadi nol. Fase stationer terjadi pada hari keempat, dimana populasi *D. salina* sudah mengalami penurunan pada semua perlakuan,
- Fase kematian dimana populasi *D. salina* mengalami penurunan.

2.3.4 Kandungan Dunaliella salina

Mikroalga selain memiliki protein, karbohidrat dan lemak juga memproduksi senyawa metabolit sekunder seperti asam lemak dan pigmen yang dapat digunakan sebagai senyawa bioaktif dalam bidang farmasi untuk anti inflamasi, anti virus, anti kanker, anti fungi, dan anti mikroba. Senyawa antimikroba yang dimiliki mikroalga umumnya belum teridentifikasi, namun beberapa telah diketahui komponen penyusunnya, ada yang terdiri dari asam lemak, fenol, dan asam organik. Mikroalga dari jenis Dunaliella yang diketahui memiliki potensi antimikroba antara lain Dunaliella primolecta dengan kandungan senyawa asam gama-linoenat, Dunaliella bardawil dengan kandungan senyawa metabolism karoten seperti neophytadiene dan beta-ionone serta Dunaliella salina dengan kandungan senyawa asam linoleat dan asam palmitat (Agustini dan Kusmiati, 2012). D. salina merupakan mikroalga hijau yang memiliki kemampuan mengakumulasi β-karoten secara alami dalam jumlah yang sangat tinggi pada kondisi stres. Kondisi yang menyebabkan D. salina dapat menghasilkan β-karoten tinggi ketika konsentrasi garam tinggi, keterbatasan nitrogen dan terkena intensitas cahaya matahari (Fretes, et al., 2012).

Dunaliella sp. kaya akan kandungan β -karoten, protein, eksopolisakarida, karotenoid, gliserol, lipid, dan vitamin (Winahyu, 2017). Senyawa β -karoten yang dihasilkan D. salina terbanyak dibandingkan dengan mikroalga hijau lainnya. β -karoten digunakan sebagai obat peredam nyeri kanker payudara, sebagai obat mata, pencegah penyakit kulit yang mudah iritasi bila terkena sinar matahari, sebagai pencegah penyakit bronkitis, peredam nyeri dan sebagainya (Hadiyanto dan Azim, 2012). Beta-karoten (β -karoten) memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi sehingga mampu mengurangi resiko penyakit jantung, stroke, semua penyakit kardiovaskuler dan melindungi tubuh dari resiko kanker paru-paru, payudara dan prostat. Senyawa β -karoten merupakan salah satu tipe antioksidan lemak (Fretes, et al., 2012). Kandungan biokatif D. salina disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kandungan Bioaktif D. salina

No	Kandungan Bioaktif	Konsentrasi (% Berat Kering)	Sumber
1	Protein	57	Handayani dan Ariyanti (2012)
2	Lemak	6	Handayani dan Ariyanti (2012)
3	Karbohidrat	32	Handayani dan Ariyanti (2012)
4	β-karoten	17	Hadiyanto dan Azim (2012)
5	Karotenoid Total (KT); - Astaxantin	12,6 17,7 (% KT)	Fretes, <i>et al.</i> (2012) Fretes, <i>et al.</i> (2012)
	- zeaxantin	13,4 (% KT)	Fretes, et al. (2012)
	- lutein	4,6 (% KT)	Fretes, et al. (2012)
	 kriptoxantin 	3,9 (% KT)	Fretes, et al. (2012)
6.	Fenol:	36.15 (mg/l)	Cepeda, et al. (2018)
	- Flavonoid		Cepeda, <i>et al</i> . (2018)
	- Tanin		Momuat, <i>et al</i> . (2015)

Senyawa β-karoten pada *D. salina* memiliki manfaat yang sangat banyak. Senyawa β-karoten berfungsi sebagai nutrisi esensial yang dibutuhkan oleh tubuh dan dapat diubah tubuh menjadi vitamin A. Fungsi lain yang dimiliki senyawa ini yaitu bertindak sebagai antioksidan lemah namun efektif dalam

BRAWIJAY/

menghambat oksigen tunggal. Senyawa β-karoten pada *D. salina* juga dapat menstimulasi enzim-enzim untuk memperbaiki DNA yang rusak, dapat meningkatkan aktivitas sel-sel imun dan dapat melindungi kornea mata dari sinar *ultraviolet* (Hadiyanto dan Azim, 2012).

2.4 Viral Nervous Necrosis (VNN)

2.4.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi virus *Viral Nervous Necrosis* (VNN) menurut Chi, *et al.* (2001), adalah sebagai berikut:

Kingdom : Virus

Divisi : RNA Virus

Class : Single standart (+) RNA Virus

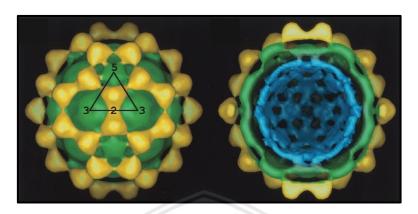
Family : Nodaviridae

Genus : Betanodavirus

Spesies : Viral Nervous Necrosis

Salah satu virus penyebab penyakit pada ikan kerapu yaitu VNN. Serangan virus VNN telah terdeteksi mulai dari kegiatan pembenihan sampai pembesaran ikan kerapu di karamba jaring apung. Virus VNN merupakan virus dari genus Betanodavirus. Virus ini berukuran sangat kecil dengan diameter 25±30 nm, tidak beramplop, memiliki asam inti berupa RNA untai tunggal. Genom dari virus ini berbentuk ikosahedral yang terdiri dari dua utas RNA; RNA-1 berukuran 3,1 kb menyandikan RNA polimerase yang bertanggung jawab pada replikasi genom, dan RNA-2 berukuran 1,4 kb yang menyandikan protein kapsid (Andriyani, 2012). Nodavirus diklasifikasikan menjadi empat genotip berdasarkan urutan gen protein yaitu *Tiger Puffer Nervous Necrosis virus* (TPNNV), *Striped Jack Nervous Necrosis Virus* (SJNNV), *Barfin Flounder Nervous Necrosis Virus* (RGNNV). Suhu

optimal yang dibutuhkan virus NNV untuk dapat bereplikasi berkisar antara 24-32°C (Chi, et al., 1999). Morfologi virus VNN disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5. Nervous Necrosis Virus pada ikan kerapu (Tang, et al., 2002)

2.4.2 Habitat

Viral nervous necrosis (VNN) adalah salah satu penyakit yang menjadi kendala utama dalam budidaya banyak spesies ikan di seluruh dunia. Agen penyebab penyakit VNN adalah infeksi nodavirus, anggota keluarga Nodaviridae yang menyebabkan penyakit yang sangat merusak dengan mortalitas mencapai hingga 100% pada larva dan juvenile. Keluarga Nodaviridae terdiri dari dua genera, alphanodavirus (jenis spesies-Nodamura virus, NOV) yang menginfeksi serangga dan betanodavirus (tipe-bergaris jack virus nekrosis saraf, SJNNV) yang menginfeksi ikan. Studi awal menggambarkan agen penyebab VNN sebagai "virus mirip picorna" dideskripsikan pertama kali pada parrotfish Jepang, Oplegnathus fasciatus di Jepang, larva dan juvenil seabass Eropa (Dicentrarchus labrax) dengan bentuk icosahedral yang khas dan diameter 23 nm. Penyakit ini dilaporkan telah ditemukan pada lebih dari 50 spesies ikan (dengan dampak terbesar pada seabass, ikan kerapu, ikan cod dan ikan datar) di bawah 16 keluarga di kawasan Indo-Pasifik, Mediterania, Skandinavia dan Amerika Utara (Jithendran, 2017). Infeksi VNN telah menyebabkan kematian hingga 100% pada 3 jenis ikan kerapu di China, 80-100% kematian pada larva dan benih ikan kerapu di Singapura dan 100% kematian pada larva ikan kerapu di beberapa produsen benih di Indonesia pada tahun 1999-2000 (Novriadi, *et al.*, 2015).

2.4.3 Mekanisme Infeksi VNN

Penyakit VNN menginfeksi pada sistem syaraf pusat, retina mata serta organ reproduksi. Penyakit ini umumnya dapat menginfeksi hampir pada seluruh fase pertumbuhan ikan dan pada stadia larva dan benih mortalitasnya dapat mencapai 100% dalam waktu 1-2 minggu. Penularan penyakit ini dapat terjadi secara verkal maupun horizontal (Hakim, *et al.*, 2016). Infeksi VNN dapat menyebabkan kematian atau kerusakan saraf sentral sehingga ikan sulit untuk merespon berbagai rangsangan dan tubuh mengalami ketidakseimbangan dalam hal pergerakan (Novisa, *et al.*, 2015). Gejala umum VNN pada ikan yang diinfeksi antara lain nafsu makan menurun, gerakan renang ikan sangat lemah, dan warna tubuh pucat. Gejala spesifik yang menyertai berupa pergerakan yang tidak terkoordinasi, seperti berenang tidak terarah, berputar-putar, hiperaktif, terbalik, serta sering menghentakkan kepala ke atas permukaan air secara sporadik (Hakim, *et al.*, 2016).

Virus penyebab VNN dapat menginfeksi ikan melalui tiga cara yaitu melalui sel-sel epithelia saluran pencernaan, melalui axon yang ada di permukaan sel dan melalui peredaran darah. Virus VNN bersifat neurotropik dan dapat bereplikasi dalam saraf dan dapat secara cepat menginfeksi organ lain yang dilalui oleh sistem saraf perifer. Mekanisme ikan terinfeksi VNN yaitu virus yang ada di air masuk melalui kontak dengan permukaan tubuh (lendir, sirip dan otot), termasuk via oral sehingga akan menginfeksi sel-sel epitel sistem saluran pencernaan. 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 (Sudaryatma, *et al.*, 2012). Keberadaan virus pada organ tubuh ikan bergantung pada jalur infeksinya (Prihartini, 2016).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat-alat Penelitian

No.	Alat	Fungsi
1.	Bak kontainer	Wadah untuk ikan hidup dan untuk menyimpan
		hasil repelleting
2.	Selang aerator	Perantara penyuplai oksigen untuk ikan
3.	Batu aerasi	Memecah gelembung oksigen
4.	Seser	Membantu mengambil ikan
5.	Drum	Wadah penampungan air laut
6.	Thermometer	Mengukur suhu selama pemeliharaan
7.	DO meter Schott	Mengukur kadar DO selama pemeliharaan
8.	Pipa paralon	Mengalirkan oksigen dari <i>blower</i> ke seluruh bak kontainer.
9.	Blower	Sumber energi untuk suplai oksigen.
10.	Autoklaf Hirayama	Mensterilisasi alat-alat yang digunakan.
11.	Botol sprayer	Wadah alkohol 70%.
12.	Timbangan digital <i>Uni Bloc</i>	Menimbang pakan dan kebutuhan <i>D. salina</i> dengan ketelitian 10 ⁻²
13.	Cetakan pelet	Membantu membentuk pakan repelleting
14.	Nampan	Wadah untuk mencampur pelet dan <i>D. salina</i> pada saat <i>repelleting</i>
15.	Oven	Membantu mengeringkan pelet
16.	Sectio Set	Membantu membedah ikan
17.	Botol film	Menyimpan organ setelah ikan dibedah
19.	Coolbox	Menyimpan botol film yang berisi organ dalam waktu sementara dan sebagai wadah sementara pada saat transportasi ikan
20.	Blender	Menghaluskan pelet dan mikroalga <i>Dunaliella</i> salina
22.	Mikroskop binokuler	Membantu melihat hasil TNF-α
23.	Freezer suhu -80°C	Menyimpan isolat virus VNN
24.	Tissue prosesor	Wadah larutan alkohol bertingkat, xylol dan paraffin pada proses dehidrasi dan <i>clearing</i>
25.	Slide drying	Membantu mengeringkan <i>slide</i> setelah ditempeli potongan organ mata
26.	Pisau mikrotom	Memotong organ mata yang telah diparafin
27.	Cassette	Tempat meletakkan organ mata pada proses
28.	Tissue Tex DRS	pembuatan sediaan histopatologi
20. 29.		Alat pewarnaan pada uji TNF-α
29. 30.	Object Glass BioGear	Meletakkan potongan organ mata
31.	Cover glass OneLab Rotator Evaporator IKA	Menutup <i>object glass</i> Alat evaporasi tepung <i>D. salina</i>
32.		Monghaluskan organ mata ikan
32. 33.	Pellet pestle Waterbath	Menghaluskan organ mata ikan Wadah air panas tempat meletakkan hasil potongan sediaan pada <i>object glass</i>

No.	Alat	Fungsi
34.	Centrifuge MPW	Menghomogenkan isolat virus
35.	Wax dispenser	Wadah parafin pada saat proses blocking
	Electrothermal	
36.	pH meter Schott	Pengukur pH air

3.1.2 Bahan-bahan Penelitian

No	Bahan	Fungsi
1	Ikan kerapu cantang ukuran 7-9 cm	Bahan yang diamati selama penelitian
2	Air laut	Media hidup ikan kerapu cantang
3	Kaporit	Bahan untuk mensterilisasi air, drum dan toples
4.	Na-thiosulfat	Bahan untuk menetralkan kaporit
5.	Alkohol 70%	Bahan untuk pengkondisian aseptis.
6.	Tisu	Bahan untuk membersihkan alat-alat yang telah digunakan
7.	Tepung <i>D. salina</i>	Bahan untuk perlakuan
8.	Pelet Stella no. 2	Pakan ikan dan bahan repelleting
9.	Isolat virus VNN	Bahan untuk uji tantang
10.	Micro tube	Wadah isolat virus VNN
11.	Saringan <i>miliopore</i> no. 45 μm <i>Minisart</i>	Bahan untuk menyaring virus agar tidak tercampur dengan bakteri
12.	PBS	Bahan untuk mempertahankan konsistensi pH pada isolat virus
13.	Formalin 10%	Bahan fiksasi organ otak ikan
14.	Sampel mata	Bahan yang akan diamati TNF-α
15.	Dry Ice	Bahan untuk menurunkan suhu pada <i>coolbox</i> saat transportasi isolat virus VNN
16.	Kertas label	Pemberi tanda perlakuan
17.	Tepung kanji	Bahan perekat pada saat mencampur pelet dan tepung <i>D. salina</i>
18.	Lem entelan	Bahan perekat cover glass pada object glass
19.	Xylol	Larutan untuk menjernihkan preparat sehingga
		memudahkan dalam pengamatan
20.	Hematoksilin	Pewarna uji TNF-α yang bersifat asam
21.	Methanol	Bahan pelarut tepung D. salina
22.	N-heksana	Bahan pelarut tepung <i>D. salina</i>
23.	Etanol	Bahan pelarut tepung <i>D. salina</i>
24.	Pot sampel	Tempat menyimpan organ mata yang direndam formalin 10%
25.	Spuit OneMed	Alat untuk menyuntik isolat virus
26.	Eosin	Pengikat cat yang bersifat basa
		5 7 3

3.2 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode penelitian deskriptif kuantitatif.

Metode deskriptif menggambarkan situasi atau kejadian dengan menerangkan

hubungan fenomena, membuat prediksi, serta menyimpulkan makna atas persoalan yang dibahas (Sumodiningrat, 2007). Penelitian deskriptif bertujuan mencapai fakta dengan menginterpretasikan data secara tepat. Metode ini mengkaji masalah-masalah dalam masyarakat, tata cara yang berlaku, situasisituasi tertentu, termasuk kegiatan, sikap, pandangan, proses, serta pengaruh suatu fenomena. Peneliti yang menggunakan metode ini dapat membandingkan berbagai fenomena sehingga menjadi studi komparatif (Nazir, 1988).

3.3 Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data adalah suatu cara yang digunakan peneliti untuk memperoleh data dan fakta yang diperlukan dalam penelitian (Hamdi dan Bahruddin, 2015). Adapun teknik pengumpulan data yang digunakan pada penelitian ini ada dua, yaitu data primer dan data sekunder.

3.3.1 Data Primer

Data primer merupakan data yang dikumpulkan berdasarkan interaksi langsung dengan sumber data. Pihak informasi sumber data contohnya yaitu narasumber (Wibisono, 2003). Beberapa teknik dalam pengumpulan data primer antara lain, observasi, wawancara, survey, angket, dan lain sebagainya.

3.3.2 Data Sekunder

Data sekunder berupa data yang diperoleh dari sumber-sumber tercetak.

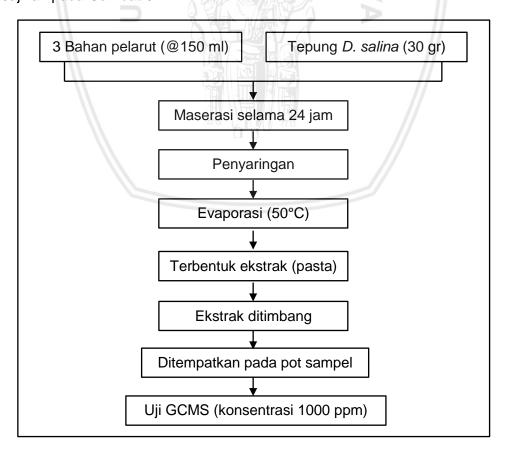
Data tersebut merupakan data yang telah dikumpulkan oleh pihak lain sebelumnya. Sumber data sekunder antara lain, buku, jurnal, internet, arsip/laporan perusahaan, dan lain sebagainya (Wibisono, 2003).

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan terdiri dari tahap pembuatan ekstrak *D. salina* menggunakan tiga pelarut: n-heksana (non polar), etanol (polar) dan methanol

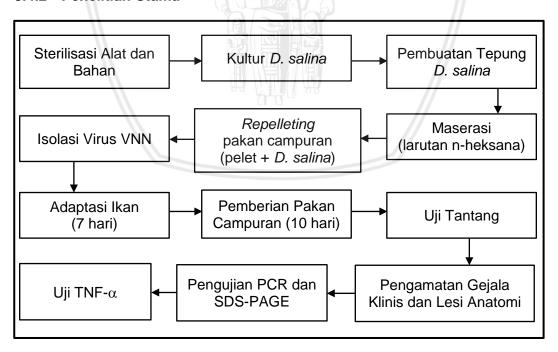
(polar) sebagai bahan maserasi. Penelitian pendahuluan ini bertujuan untuk mengetahui pelarut terbaik dalam menghasilkan kandungan ekstrak *D. salina* dengan metode GCMS (*Gas Cromatography and Mass Spectroscopy*). Prosedur maserasi *D. salina* mengacu pada Agustini dan Kusmiati (2012) yaitu tepung *D. salina* 30 gram direndam dalam 150 ml untuk masing-masing pelarut selama 24 jam. Hasil rendaman disaring dan didapatkan hasil filtrat dari pelarut n-heksana sebanyak 80 ml, etanol 120 ml dan metanol 130 ml. Filtrat kemudian dievaporasi menggunakan rotator evaporator dengan suhu 50°C, hasil evaporasi berupa ekstrak sebanyak 0,13 gram dari pelarut n-heksana, 0,39 gram etanol dan 0,92 gram metanol. Hasil ekstrak selanjutnya diuji menggunakan metode GCMS (*Gas Cromatography and Mass Spectroscopy*) untuk mengetahui pelarut terbaik dalam menghasilkan kandungan ekstrak *D. salina*. Prosedur penelitian pendahuluan disajikan pada Gambar 6.



Gambar 6. Prosedur Kerja Penelitian Pendahuluan

Berdasarkan dari penelitian pendahuluan diperoleh pelarut yang terbaik yaitu n-heksana karena dapat mengekstrak senyawa *napthalene*, fenol dan tetradekana dari *D. salina* (Yuwanita, *et al.*, 2019 belum dipublikasikan). *Napthalene* dapat berfungsi sebagai senyawa antimikroba yang efektif untuk melawan patogen, toksisitas akut, anti inflamasi dan aktivitas analgesik (Rokade dan Sayyed, 2009). Senyawa fenol berguna dalam menangkal radikal bebas dengan mengurangi stress dan menghambat oksidasi makromolekul (Pereira, *et al.*, 2007). Senyawa tetradekana sebagai senyawa antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan beberapa bakteri uji (Ozdemir, *et al.*, 2004). Senyawa fenol diantaranya senyawa flavonoid dan tanin (Momuat, *et al.*, 2015). Flavonoid berperan sebagai anti virus yang dapat menghambat pertumbuhan VNN (Hidayanti, *et al.*, 2010), sedangkan tanin dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme seperti bakteri dan virus (Afrianti, *et al.*, 2013).

3.4.2 Penelitian Utama



Gambar 7. Prosedur Kerja Penelitian Utama

Berdasarkan tahap penelitian utama yang disajikan pada Gambar 7, dilakukan setelah penelitian pendahuluan. Hasil ektrak terbaik yang didapatkan

dari penelitian pendahuluan menggunakan pelarut n-heksana. Prosedur penelitian utama dimulai dari sterilisasi alat dan bahan hingga pengujian TNF-α. Parameter yang diukur seperti suhu, pH, salinitas, DO serta *Survival Rate* (SR).

a. Persiapan Alat dan Bahan

Wadah pemeliharaan ikan kerapu cantang yang digunakan yaitu bak kontainer sebanyak 5 buah dengan kapasitas air 16 liter. Bak kontainer di cuci dahulu dengan detergen kemudian direndam menggunakan kaporit 100 ppm selama 24 jam dan dinetralisir menggunakan Na-*Thiosulfat* 50 ppm. Bak kontainer dikeringkan selama 2 hari lalu diisi air laut sebanyak 15 liter. Setiap bak kontainer diisi 10 ekor ikan kerapu cantang ukuran 7-9 cm. *Aerator set* dipasang pada setiap bak kontainer sebagai sumber oksigen.

b. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi dilakukan sebelum alat dan bahan digunakan untuk menghilangkan kuman atau kotoran sehingga alat dan bahan yang digunakan terbebas dari kontaminasi mikroba. Sterilisasi pada alat yaitu alat-alat dicuci terlebih dahulu menggunakan sabun dan air mengalir, kemudian dikeringkan dan dibungkus dengan koran. Sterilisasi alat menggunakan oven dengan suhu 167-177°C selama 1 jam. Tekan tombol off, keluarkan alat dan buka pembungkus. Bahan yang akan disterilisasi seperti akuades dimasukkan ke dalam botol. schot dan dibungkus dengan alumunium foil. Bahan yang sudah dibungkus alumunium foil disterilisasi menggunakan autoklaf yang telah di-setting ke mode p2 yaitu suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Tekan tombol off autoklaf, buka klep penutup setelah alarm berbunyi dan keluarkan bahan yang telah disterilisasi.

3.4.3 Pembuatan Ekstrak Dunaliella salina

Ekstrak *D. salina* didapatkan dengan menggunakan metode maserasi (perendaman). Proses ekstraksi dilakukan dengan merendam tepung *D. salina*

menggunakan pelarut dari hasil terbaik uji GCMS yaitu n-heksana (Yuwanita, et al., 2019 belum dipublikasikan) dengan perbandingan 1:5 (g/ml). Tepung D. salina dimaserasi selama 24 jam dan disimpan dalam kondisi gelap. Filtrat yang dihasilkan ditampung dan dikumpulkan kemudian dievaporasi menggunakan rotator evaporator dengan suhu 50°C hingga filtrat mengental (Agustini dan Kusmiati, 2012). Hasil evaporasi filtrat yang didapatkan berupa ekstrak D. salina, selanjutnya ekstrak ditimbang sesuai dosis yang telah ditentukan.

3.4.4 Repelleting

Pembuatan pakan secara *repelleting* mengacu pada Yuwanita, *et al.* (2018) yaitu dengan mencampurkan ekstrak dari tepung dunaliella yang telah menjadi pasta ke dalam pakan komersiil secara *repelleting.* Pakan komersiil yang digunakan yaitu pelet merk *Stella* no. 2 sebanyak 4 kg untuk 50 ekor ikan dan ekstrak *D. salina* sesuai dosis yang telah ditentukan yaitu 0 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg dan 400 mg. Pelet komersiil dihaluskan hingga menjadi tepung terlebih dahulu dan disaring menggunakan saringan teh untuk mendapatkan tekstur yang halus dan tidak ada yang menggumpal. Pasta ekstrak dunaliella dicampurkan ke dalam pakan yang telah halus dan ditambahkan tepung kanji 10 gram sebagai bahan perekat dan diaduk secara merata. Pakan yang telah tercampur dicetak kembali menjadi pelet menggunakan cetakan manual agar kandungan bioaktif *D. salina* tidak rusak, lalu dikeringkan sampai kering sempurna. Pelet yang telah jadi disimpan di ruang kedap udara agar tidak mengurangi kandungan *D. salina*.

3.4.5 Isolasi Virus

Virus diisolasi dari organ mata dan otak ikan kerapu terinfeksi virus VNN yang didapatkan dari Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara. Kegiatan isolasi virus dilakukan dengan mengacu pada prosedur BPBAP Situbondo, yaitu organ mata dan otak diambil lalu digerus dengan *pellet pestle* dan ditimbang. Hasil penggerusan dilarutkan dalam *Phosphate Buffer Saline*

(PBS) pH 7,2 dengan perbandingan 1:3 lalu disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan kemudian diambil dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang diperoleh disaring menggunakan membran filter 0,45 μm. Hasil isolasi virus kemudian digunakan untuk uji tantang.

3.4.6 Persiapan Ikan Penelitian

Ikan uji yang digunakan adalah ikan kerapu cantang yang diperoleh dari BPBAP Situbondo, Jawa Timur. Ikan kerapu cantang sehat sebanyak 50 ekor dengan ukuran 7-9 cm yang akan diletakkan di 5 bak kontainer yang berbeda. Akuarium berkapasitas 16 liter dengan kepadatan 10 ekor tiap bak kontainer dan diberi aerasi. Seluruh bak kontainer akan diinfeksi virus VNN dengan 4 bak kontainer diberi perlakuan pakan *D. salina* dan 1 bak kontainer sebagai kontrol negatif. Adaptasi dilakukan selama 7 hari awal setelah ikan ditebar, tujuannya agar ikan tidak stres saat dilakukan uji penelitian. Pakan yang diberikan ketika masa adaptasi yaitu pelet merk *Stella* no 2 pada pagi hari pukul 08.00 WIB dan sore hari pukul 15.00 WIB. Penyiponan dilakukan apabila air telah kotor karena feses dan terdapat sisa pakan yang mengedap di dasar. Apabila ikan sudah mampu beradaptasi dan respon terhadap pakan baik maka ikan kerapu cantang siap untuk diberikan perlakuan.

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Pemberian Pakan

Pemberian pakan campuran diberikan setelah 7 hari masa adaptasi ikan. Pakan campuran pelet dengan *Dunaliella salina* yang telah ditentukan dosisnya yaitu 0 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg dan 400 mg dalam 1 kg pelet diberikan selama 10 hari. Frekuensi pemberian pakan pada ikan kerapu sebanyak 2 kali sehari pada pagi hari pukul 08.00 WIB dan sore hari pukul 15.00 WIB (Yanuhar,

2011). Pakan diberikan secara *adlibitum* dengan *Feeding Rate* (FR) 5% atau sebanyak 5% dari berat keseluruhan tubuh ikan (Arief, *et al.*, 2011). FR yang diberikan sebesar 7,5 gram dari berat biomassa 10 ekor ikan sebesar 150 gram.

3.5.2 Uji Tantang

Prosedur uji tantang virus VNN mengacu pada Mahardika, *et al.* (2017) yaitu uji tantang dilakukan pada masing-masing ikan uji dengan menyuntikkan 0,2 ml virus VNN/ekor ikan yang sebelumnya dibius menggunakan 100 ppm eugenol. Ikan kerapu selanjutnya dipelihara dalam bak kontainer dengan penambahan aerasi hingga ikan mati mencapai 50% atau lebih.

3.5.3 Pengamatan Gejala Klinis

Gejala patologi klinik ikan diamati pasca ikan diinfeksi virus VNN. Pengamatan gejala klinis mengacu pada Yuwanita, *et al.* (2018) yaitu ikan diamati selama 4 hari pasca infeksi dengan interval waktu 12 jam yakni 12 jam, 24 jam, 36 jam, 48 jam, 60 jam, 72 jam, 84 jam dan 96 jam pasca infeksi. Pengamatan dilakukan hingga infeksi mencapai LD₅₀ (*Lethal Dosis*) atau menimbulkan kematian sampai 50%.

3.5.4 Pengamatan Lesi Anatomi

Pengamatan lesi anatomi dilakukan dengan mengamati 2 ikan dari masing-masing bak kontainer pada 96 jam pasca ikan diinfeksi VNN yang mengacu pada Lestari dan Sudaryatma (2014). Tubuh ikan kerapu dibedah untuk mengamati perubahan dan luka anatomi organ bagian dalam tubuh ikan. Organorgan yang diamati meliputi sirip dan organ bagian dalam tubuh lainnya ikan kerapu cantang.

3.5.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Ikan yang telah diinfeksi virus VNN selanjutnya diuji PCR untuk mendeteksi ikan positif terinfeksi virus. Prosedur pengujian PCR mengacu pada

BRAWIJAY

laboratorium Kesehatan Lingkungan BPBAP Situbondo dengan langkah-langkah uji PCR antara lain:

- a) RNA diekstraksi menggunakan RNA Extraction Solution
- b) RNA diamplifikasi dalam reaksi RT-PCR (*Reverse Trancriptase Polymerase Chain Reaction*) dengan menggunakan primer F2 (5'-CGT-GTC-AGT-CAT-GTG-TCG-CT-3') dan primer R3 (5'-CGA-GTC-AAC-ACG-GGT-GAA-GA-3') (OIE, 2019). Reagen yang digunakan yaitu *GoTaq* PCR *Core System (Promega)*. Suhu *thermalcycler* pada saat transkripsi balik sebesar 48°C selama 45 menit, denaturasi awal 94°C selama 2 menit, amplifikasi pertama 95°C selama 40 detik, amplifikasi kedua 55°C selama 40 detik, amplifikasi ketiga 72°C selama 40 detik, ekstensi akhir 72°C selama 5 menit dan *hold* dengan suhu 4°C yang dilakukan sebanyak 40 siklus.
- c) Nested PCR menggunakan GoTaq Green Master Mix dengan primer NF2 (5'-GTT-CCC-TGT-ACA-ACG-ATT-CC-3') dan NR3 (5'-GGA-TTT-GAC-GGG-GCT-GCT-CA-3') (OIE, 2019). Suhu thermalcycler pada saat denaturasi awal 94°C selama 2 menit, amplifikasi pertama 94°C selama 40 detik, amplifikasi kedua 50°C selama 40 detik, amplifikasi ketiga 72°C selama 40 detik, ekstensi akhir 72°C selama 10 menit dan hold dengan suhu 4°C yang dilakukan sebanyak 40 siklus.
- d) Produk PCR dielektroforesis pada 1,5% agarose gel selama 30 menit dengan larutan TAE 1X sebanyak 500 ml dengan voltase 100-150 V.
- e) Pewarnaan menggunakan larutan *Ethidium Bromide* (EtBr) 0,05% selama 10 menit.
- f) Pembacaan hasil menggunakan UV Gel Documentation. Hasil positif
 VNN apabila terlihat garis perpendaran pita DNA (band) dengan 294 bp

(nested). Hasil negatif VNN apabila tidak terlihat garis perpendaran pita DNA (band).

3.5.6 Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Pengujian SDS-PAGE dilakukan untuk mengetahui profil protein TNF-α. Mata ikan kerapu cantang diekstraksi untuk mendapatkan isolasi protein. Ikan kerapu cantang dibedah dan diambil bagian organ mata. Prosedur pembuatan isolasi protein mengacu pada Ode (2011), yaitu organ yang telah diisolasi ditimbang kemudian organ dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali. Organ mata kemudian diletakkan didalam *microtube* lalu digerus menggunakan *pellet pestle* sampai halus. Selama prosedur isolasi dikondisikan dalam keadaan dingin dan diletakkan diatas es serut. Buffer ekstrak PBS ditambahkan ke dalam *microtube* lalu disentrifuge dengan kecepatan 11000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit. Residu yang mengendap di dasar *microtube* dibuang dan supernatan diambil lalu dipindahkan kedalam *microtube* lainnya sebanyak 20 μl untuk uji SDS-PAGE.

Analisis protein SDS-PAGE mengacu pada Yanuhar dan Khumaidi (2017), dengan menggunakan gel elektroforesis berupa gel sodium dodecyl sulfate polyacrylamide dengan konsentrasi 12,5%. Buffer sampel ditambahkan ke dalam microtube yang berisi sampel protein dengan rasio 1:1. Pelarut 5 mm Tris HCl pada pH 6,8; 2-mercapto ethanol 5%; sodium dodecyl sulfate 2,5% w/v dan glycerol 10% v/v ditambahkan dalam sampel lalu dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit. Sampel didinginkan pada suhu konstan 20°C lalu dianalisis pada kecepatan konstan 20 mA selama 40–50 menit atau saat tracking dye 0,5 cm dari gel dasar. Sampel kemudian diwarnai menggunakan commasie brilliant blue (CBS). Tahap terakhir yaitu dilakukan destaining untuk menghapus gel colorant dan menekan band protein.

3.5.7 Pengambilan Organ Mata Ikan Kerapu Cantang

Ikan kerapu cantang yang telah terinfeksi virus VNN dibedah menggunakan *sectio set* dari bagian mulut menuju atas kepala ikan dan diambil organ mata. Organ mata kemudian difiksasi dalam formalin 10% berdasarkan prosedur kerja imunohistokimia (IHK) yang mengacu pada laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Fiksasi bertujuan untuk menjaga dan mempertahankan struktur organ yang telah mati. Organ mata yang telah difiksasi dimasukkan dalam pot sampel lalu diuji TNF-α.

3.5.8 Metode Uji Ekspresi TNF-α

Pengujian TNF- α dilakukan untuk mengetahui respon imun ikan terhadap infeksi VNN dengan diberi *Dunaliella salina* yang dilihat dari banyaknya TNF- α yang disekresi di organ mata. Pengujian TNF- α mata ikan kerapu mengacu pada laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya dengan langkah kerja uji TNF- α sebagai berikut:

- Organ mata ikan kerapu cantang yang telah difiksasi kemudian dipotong dengan ketebalan 2-3 mm dan dimasukkan ke tissue casset kemudian diberi label dan ditutup
- Dilakukan dehidrasi, pembeningan (clearing), pembenaman (embedding),
 didinginkan pada lempeng pendingin
- Dilakukan pemotongan (sectioning) menggunakan mikrotom yang menghasilkan potongan pita tipis
- Pita tipis dimasukkan ke dalam *waterbath* yang berisi air hangat lalu diambil dan diletakkan diatas *object glass* yang telah diolesi *albumin gliserin*.
- Dilakukan inkubasi *over night* di inkubator
- Pewarnaan dilakukan dengan memanaskan object glass yang tercoating Poly
 L-Lysine dalam inkubator dengan suhu 80°C selama 1 jam

- Preparat yang telah kering kemudian dilakukan deparafinisasi dalam xylol I, II,
 III (masing-masing selama 15 menit)
- Preparat dimasukkan ke dalam *ethanol absolute*, alkohol 90% dan 80% (masing-masing 15 menit)
- Preparat dimasukkan kedalam H₂O₂ 1,6% dalam methanol selama 20 menit
- Preparat direndam didalam antigen retrieval dan dipanaskan menggunakan
 Decloaking Chamber, selanjutnya didinginkan pada suhu ruang selama 30
 menit lalu dibilas dengan akuades
- Preparat direndam dalam Phosphat Buffer Saline (PBS) selama 15 menit
- Preparat ditetesi antibodi primer anti-mouse untuk TNF-α dan diinkubasi over night, kemudian preparat dicuci dengan PBS selama 15 menit
- Preparat sampel ditetesi Simple Stain Max PO dan diinkubasi selama 1 jam
- Preparat ditetesi DAB (1 ml *Betazoid DAB Substrate Buffer* ditambah 1-2 tetes *DAB Chromogen*) dan diinkubasi selama 10 menit, setelah itu preparat dicuci dengan air mengalir selama 5-7 menit
- Dilakukan counterstain dengan mayer haematoxilin 2-3 menit
- Preparat direndam dalam Lithum Carbonat jenuh 3 menit, lalu diicuci dengan air mengalir selama 5-7 menit
- Dilakukan dehidrasi pada preparat dengan alkohol 80%, 96%, alkohol absolut dan xylol I, II, III (masing-masing 15 menit)
- Dilakukan *mounting* dengan lem *entellan* dan dilanjutkan pengamatan dibawah mikroskop binokuler.

3.6 Parameter Uji

3.6.1 Parameter Utama

Parameter utama yang diujikan pada penelitian ini adalah TNF- α mata ikan kerapu cantang yang diinfeksi VNN, gejala klinis, lesi anatomi, PCR, SDS-

PAGE dan *Survival Rate* (SR). Pengamatan TNF-α dilakukan dengan membandingkan mata ikan kerapu cantang yang diinfeksi virus VNN dan diberikan perlakuan *Dunaliella salina* dengan kontrol tanpa perlakuan apapun.

3.6.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang yang diamati dalam penelitian ini yaitu kualitas air (suhu, pH, salinitas, dan oksigen terlarut). Pengukuran kualitas air dilakukan setiap hari pada pukul 08.00 WIB pagi hari dan pukul 15.00 WIB pada sore hari.

3.7 Analisis Deskriptif



Gambar 8. Halaman Depan ImmunoRatio Software (Dokumentasi Pribadi, 2019)

Ekspresi TNF-α mata ikan kerapu cantang diuji menggunakan pewarnaan IHK kemudian dianalisa menggunakan metode *ImmunoRatio*. *ImmunoRatio software* dapat diakses pada http://jvsmicroscope.uta.fi/immunoratio/ (Rodrigues-Sousa, *et al.*, 2014). Halaman depan *ImmunoRatio software* disajikan pada Gambar 8. Analisis data menggunakan *ImmunoRatio software* dilakukan secara *online* atau berbasis internet. Deteksi persentase pewarnaan IHK menggunakan *Image Analyser* (*ImmunoRatio*) setelah dilakukan *scanning* slide pada mikroskop dan dikonversi menjadi gambar digital. *ImmunoRatio* merupakan *software* yang memberikan informasi kuantitatif dari gambar slide IHK dan dapat mendeteksi jumlah dan bagian yang terwarnai (Diab, *et al.*, 2015).

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Parameter Utama

4.1.1 Gejala Klinis

Gejala klinis pada ikan merupakan tanda-tanda yang menunjukkan jenis patogen dan penyakit yang menginfeksi ikan. Gejala klinis yang ditimbulkan dari setiap infeksi patogen berbeda-beda dan memiliki khas masing-masing termasuk gejala klinis infeksi virus penyebab VNN. Hasil pengamatan gejala klinis dan tingkah laku ikan kerapu cantang yang diinfeksi VNN disajikan pada Tabel 2. Gambaran kondisi gejala klinis ikan kerapu cantang pasca diinfeksi VNN disajikan pada Gambar 9.

Tabel 2. Gejala Patologi Klinik Pasca Infeksi VNN

Waktu	Dosis		Gejala Klinis	
Pengamatan (jam)	<i>D. salina</i> (mg/kg)	Nafsu Makan	Tingkah Laku	Warna Tubuh
- //	0	Normal	Berenang aktif	Normal
	250	Normal	Berenang aktif	Normal
12	300	Normal	Berenang aktif	Normal
	350	Normal	Berenang aktif	Normal
	400	Normal	Berenang aktif	Normal
	0	Normal	Berenang aktif	Normal
	250	Normal	Berenang aktif	Normal
24	300	Normal	Berenang aktif	Normal
	350	Normal	Berenang aktif	Normal
	400	Normal	Berenang aktif	Normal
	0	Normal	Berenang aktif	Normal
36	250	Normal	Berenang aktif	Normal
	300	Normal	Berenang aktif	Normal
	350	Normal	Berenang aktif	Normal
	400	Normal	Berenang aktif	Normal
	0	Menurun	Berenang pasif	50% menghitam
48	250	Menurun	Berenang pasif	Normal
	300	Menurun	Berenang pasif	Normal
	350	Normal	Berenang aktif	Normal
	400	Normal	Berenang aktif	Normal
	0	Menurun	Berenang pasif	50% menghitam
60	250	Menurun	Berenang pasif, berdiam di dasar	50% menghitam
	300	Menurun	Berenang pasif, berenang miring	Normal

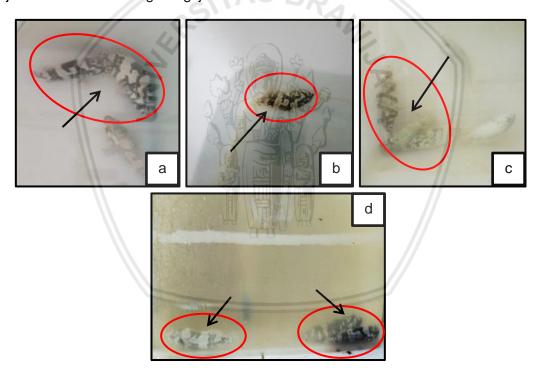
Waktu	Dosis		Gejala Klinis	
Pengamatan (jam)	<i>D. salina</i> (mg/kg)	Nafsu Makan	Nafsu Makan Tingkah Laku	
	350	Normal	Berenang	Normal
	400	Normal	mayoritas pasif Berenang aktif, beberapa berdiam di dasar	Normal
	0	Menurun	Berenang pasif,	50% menghitam
72	250	Menurun	beberapa berenang miring Berenang pasif, berdiam di dasar dan tubuh miring	50% menghitam
	300	Menurun	Berenang pasif, beberapa miring	50% menghitam
	350	Menurun	Berenang pasif, berdiam di dasar	50% menghitam
	400	Normal	Berenang aktif, berdiam di dasar	50% menghitam
	0	Menurun	Berenang pasif, tubuh miring	50% menghitam
	250	Menurun	Berenang pasif, tubuh miring	50% menghitam
84	300	Menurun	Berenang pasif, tubuh miring	50% menghitam
	350	Menurun	Berenang pasif, berdiam di dasar	50% menghitam
	400	Menurun	Berenang pasif, berdiam di dasar	50% menghitam

Berdasarkan tabel gejala klinis ikan kerapu cantang pada semua perlakuan dengan waktu 12 jam pasca infeksi virus VNN menunjukkan bahwa ikan berenang aktif dengan nafsu makan yang normal dan warna tubuh yang masih normal. Gejala klinis ikan kerapu macan yang diinfeksi VNN pada awal pengamatan hingga 12 jam pasca infeksi menurut Lestari dan Sudaryatma (2014) yaitu ikan menunjukkan tingkah laku dan gerakan renang yang normal serta gesit. Pengamatan pada 24-36 jam pasca infeksi, ikan tidak menunjukkan gejala klinis terinfeksi VNN pada semua perlakuan dengan pergerakan, nafsu makan dan warna tubuh yang normal. Gejala yang normal pada 24-36 jam pasca infeksi sesuai dengan pendapat Roza, *et al.* (2006), bahwa ikan baru akan mengalami penurunan nafsu makan pada hari ke-2 setelah uji tantang.

Gejala yang diamati pada 48-60 jam pasca infeksi VNN yaitu ikan berenang pasif dengan nafsu makan yang mulai menurun pada perlakuan dosis *D. salina* 250, 300 dan 0 mg/kg serta warna tubuh ikan mulai terlihat gelap pada perlakuan dosis 250 dan 0 mg/kg. Yuwanita, *et al.* (2018) menyebutkan bahwa nafsu makan ikan menurun diakibatkan oleh stres sehingga respon saraf yang berfungsi meningkatkan sistem imun mengalami gangguan fisiologis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan pemberian *Dunaliella salina* efektif meningkatkan pertahanan tubuh ikan terhadap infeksi patogen dilihat dari gejala ikan terinfeksi VNN pada 48-60 jam pasca infeksi hanya terjadi di perlakuan dengan dosis *D. salina* terendah. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Yuwanita, *et al.* (2018), bahwa *D. salina* mengandung betakaroten yang dapat berperan sebagai antioksidan dan vitamin A yang dapat menetralisir adanya radikal bebas, menjaga sel dan jaringan dari kerusakan serta berperan dalam fungsi kekebalan tubuh sehingga perlakuan dengan dosis *D. salina* yang lebih tinggi belum menunjukkan gejala yang tidak normal.

Pengamatan pada 72 jam pasca infeksi VNN, ikan berenang pasif dengan pergerakan yang lambat, nafsu makan yang menurun pada perlakuan dosis *D. salina* 250, 300, 350 dan 0 mg/kg. Sebagian besar tubuh ikan mulai menggelap pada seluruh perlakuan. Beberapa ikan berenang dengan tubuh yang miring dan selalu berdiam di dasar bak kontainer. Gejala ikan yang berdiam di dasar sesuai dengan pendapat Yuasa, *et al.* (2001) bahwa virus penyebab VNN menginfeksi sistem saraf mata dan otak yang ditandai dengan tingkah laku berenang yang tidak normal dan berdiam di dasar bak. Pada 84 jam pasca infeksi ikan berenang pasif dengan tubuh miring, sering berdiam dan bergerombol di dasar, serta warna tubuh ikan sebagian besar menggelap pada seluruh perlakuan. Gerakan miring ikan menunjukkan ikan telah kehilangan keseimbangan, sedangkan warna tubuh yang menggelap menunjukkan ikan mengalami stres. Berdasarkan

Yoshikoshi dan Inoue (1990), ikan yang terinfeksi virus VNN akan mengalami perubahan gerakan renang dan warna tubuh ikan menggelap. Sudaryatma, *et al.* (2012) mengatakan bahwa perubahan gaya renang ikan kerapu yang terinfeksi virus VNN mudah dikenali seperti berenang berputar dan vertikal, kehilangan disoreintasi lingkungan dengan menabrakkan diri ke dinding akuarium dan warna tubuh yang menjadi gelap. Gejala infeksi VNN pertama kali terlihat pada perlakuan dengan pemberian dosis *D. salina* terendah, hal ini diperkirakan karena adanya senyawa flavonoid dan tanin dari ekstrak *D. salina* yang memiliki aktivitas anti virus berdasarkan Saparuddin, *et al.* (2017), dengan menurunkan jumlah VNN dan mengurangi jumlah sel terinfeksi VNN.



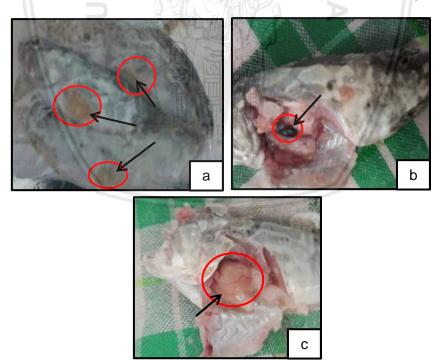
Gambar 9. Gejala Patologi Klinik Ikan Kerapu Cantang Pasca Infeksi VNN. (a) warna tubuh ikan menggelap; (b) ikan berenang miring; (d) ikan bergerombol di tepi bak; dan (c) ikan berdiam di dasar bak (Dokumentasi Pribadi, 2019)

Ikan kerapu cantang mulai mengalami kematian pada waktu 96 jam sampai 108 jam pasca infeksi. Kematian yang terjadi mencapai hingga LD₅₀ pada 108 jam pasca infeksi, hal ini sesuai dengan pendapat Roziqin (2018) bahwa

kematian dapat terjadi hingga hari kelima dan kematian akan mencapai 100% pada hari kelima hingga ketujuh.

4.1.2 Lesi Anatomi

Hasil nekropsi ikan kerapu cantang terinfeksi VNN yaitu adanya perubahan pada warna sirip pektoral menjadi kemerahan, limfa bengkak dan hati menguning. Hal ini sesuai dengan pendapat Sudaryatma, *et al.* (2012) bahwa, ikan kerapu terinfeksi VNN menunjukkan lesi anatomi dengan perubahan limpa bengkak dan hemoragis serta warna hati pucat dan konsistensinya rapuh pada penelitian yang dilakukan. Perubahan pada organ internal, terutama hati dan limpa akan terjadi akibat adanya viremia pada ikan yang terinfeksi virus penyebab VNN (Nagasawa dan Cruz-Lacierda, 2004). Lesi anatomi ikan kerapu yang terinfeksi VNN menurut Lestari dan Sudaryatma (2014) yaitu limpa bengkak dan bercak-becak merah, merah di sirip pektoral, hati rapuh dan kuning.



Gambar 10. Lesi Anatomi Ikan Kerapu Cantang pasca infeksi VNN. (a) sirip pektoral kemerah-merahan; (b) pembengkakan pada organ limfa; dan (c) organ hati menguning (Dokumentasi Pribadi, 2019)

Pembedahan dilakukan untuk melihat patologi anatomi ikan kerapu cantang pada 96 jam pasca infeksi VNN. Pengamatan lesi anatomi menunjukkan adanya perubahan warna sirip pektoral menjadi kemerahan (Gambar 10a), organ limfa membengkak (Gambar 10b) dan organ hati menguning (Gambar 10c).

4.1.3 Survival Rate (SR)

Survival Rate (SR) yaitu tingkat kelulushidupan ikan mulai awal pemeliharaan sampai akhir pemeliharaan. Kelulushidupan menurut Siregar dan Adelina (2009) dipengaruhi oleh faktor biotik dan abiotik. Faktor biotik seperti umur, kemampuan ikan beradaptasi dan lingkungan hidup ikan. Faktor abiotik seperti pakan, kualitas air dan sifat-sifat biologis lain. Pada penelitian ini, pemeliharaan ikan dilakukan sampai kematian ikan sebanyak 50% atau mencapai LD₅₀. Setelah uji tantang didapatkan nilai SR yang berbeda-beda setiap perlakuan dengan total 28 ekor ikan mati pada 96-108 jam pasca infeksi VNN. Penyebab kematian ikan karena pertahanan tubuh yang rendah dan infeksi virus VNN. Nilai SR merupakan kebalikan dari mortalitas ikan. Dari 50 ekor ikan pada penelitian ini menyisakan 22 ekor ikan hingga hari kelima pasca infeksi VNN. Data SR ikan kerapu cantang disajikan pada Lampiran 4 dan Tabel 3.

Tabel 3. Survival Rate Ikan Kerapu Cantang Selama Penelitian

Dosis <i>D. salina</i> (mg/kg)	Jumlah ikan awal (ekor)	Jumlah ikan akhir (ekor)	SR (%)
0	10	3	30
250	10	4	40
300	10	4	40
350	10	5	50
400	10	6	60

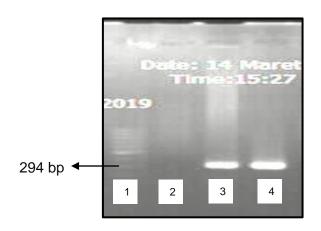
Berdasarkan tabel diatas, SR atau kelulushidupan ikan kerapu cantang selama penelitian berbeda-beda setiap perlakuan. SR yang diperoleh pada perlakuan dengan dosis *D. salina* 0 mg/kg, 250 mg/kg, 300 mg/kg, 350 mg/kg dan 400 mg/kg berturut-turut yaitu 30%, 40%, 40%, 50% dan 60%. Hasil tersebut

menunjukkan bahwa kematian telah mencapai LD₅₀ atau kematian 50%. Roza, *et al.* (2006) menambahkan bahwa ikan kerapu yang disuntik 0,2 ml VNN dapat mengakibatkan kematian LD₅₀ pada hari kegita paska infeksi. Kematian yang terjadi pada penelitian ini mencapai LD₅₀ pada hari kelima, hal ini menunjukkan adanya peran dari *D. salina* dalam pertahanan tubuh ikan melawan virus. Kematian terbanyak terjadi pada perlakuan dengan pemberian dosis *D. salina* terendah pada pakan ikan, hal ini diduga karena adanya penambahan *D. salina* dapat meningkatkan sistem kekebalan dan pertahanan tubuh ikan (Roziqin, 2018). Senyawa aktif yang dimiliki *D. salina* seperti flavonoid dan tanin juga berfungsi sebagai anti virus yang dapat menghambat pertumbuhan VNN dan mematikan sel virus sehingga menurunkan jumlah kematian ikan kerapu cantang (Saparuddin, *et al.*, 2017; Solichati, *et al.*, 2010).

4.1.4 Uji PCR

Pengujian PCR dilakukan setelah ikan kerapu cantang diinfeksi virus VNN di Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan, Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Situbondo dan menunjukkan hasil positif ikan terinfeksi VNN. Hasil pengujian PCR dapat menguatkan analisis gejala klinis dan lesi anatomi ikan telah terinfeksi virus VNN. Hasil uji PCR disajikan pada Gambar 11.

Berdasarkan Gambar 11, hasil uji PCR positif VNN apabila pita DNA berpendar pada *nested* 294 *base pair* (bp). Pada *lane*-1 berisi DNA *marker* 100 bp, *lane*-2 diisi sebagai kontrol positif, *lane*-3 diisi sebagai kontrol negatif dan *lane*-4 berisi sampel ikan kerapu cantang yang diuji PCR terhadap VNN. Sampel yang diuji dapat dikatakan positif VNN karena berpendar pada 294 bp yang sama dengan *lane*-3 yaitu kontrol negatif. Hal ini sesuai dengan pendapat Fitriatin dan Manan (2015) yaitu *band* atau pita DNA yang muncul pada sampel dibandingkan dengan kontrol positif. Sampel dinyatakan positif VNN apabila pita DNA ada pada ukuran 294 bp atau sejajar dengan *band* pada kontrol negatif.



Gambar 11. Hasil Uji PCR Ikan Kerapu Cantang yang Diinfeksi VNN

Keterangan:

Lane-1: Marker

Lane-2: Kontrol positif

Lane-3: Kontrol negatif (diinfeksi VNN) Lane-4: Sampel positif terhadap VNN

4.1.5 Uji SDS-PAGE

Pengujian SDS-PAGE dilakukan setelah ikan kerapu cantang diinfeksi VNN yang bertujuan untuk mengetahui berat molekul (BM) protein. Pengujian ini dilakukan untuk menguatkan apabila sampel terinfeksi VNN dilihat dari BM protein yang berpendar. BM protein yang berpendar pada sampel uji kemudian dibandingkan dengan *Marker*. Konsentrasi protein sampel VNN yang digunakan sebanyak 16,56 mg/ml. Analisa SDS-PAGE menggunakan *stacking gel* 3% dan *separating gel* 15% yang diwarnai menggunakan *Commassie Briliant Blue* (CBB). *Stacking gel* 3% merupakan media agar bagi protein yang telah terdenaturasi dan bermuatan negatif tergabung membentuk *elips*, sedangkan *separating gel* 15% berfungsi memisahkan protein berdasarkan ukuran (Atma, 2018). Hasil analisa SDS-PAGE disajikan pada Gambar 12. Data hasil uji SDS-PAGE disajikan pada Lampiran 2.

Berdasarkan gambar dibawah, hasil analisa SDS-PAGE pada *Marker* terdapat 8 (*band*) pita protein yaitu 15 kDa, 25 kDa, 35 kDa, 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 150 kDa dan 225 kDa. *Marker* protein merupakan pembanding pada analisa

SDS-PAGE yang menggunakan standar BM (Dewi, 2013). Pita protein yang berpendar dari sampel uji dianalisis untuk mengetahui BM dengan membandingkan sampel dan standar *marker* (Isnaini, 2008). Sampel A1 merupakan organ otak dan sampel A2 merupakan organ mata ikan kerapu cantang yang terinfeksi VNN.



Gambar 12. Hasil Analisa SDS-PAGE pada Ikan Kerapu Cantang yang Diinfeksi VNN

Berdasarkan perpendaran pita protein *marker* dan sampel ikan kerapu cantang yang diinfeksi VNN, diketahui bahwa VNN dapat menginfeksi ikan kerapu cantang pada BM 35 kDa - 50 kDa. Sampel A2 diperoleh BM 37,31 kDa, 42,80 kDa, 44,80 kDa, 47,55 kDa dan 50 kDa. Berdasarkan Yanuhar, *et al.* (2012), protein yang berperan melekatkan virus pada inang adalah mantel protein (bagian terluar protein). Tebal tipisnya pita protein menunjukkan kandungan atau banyaknya protein yang mempunyai BM yang sama dan berada pada posisi pita yang sama (Rachmania, *et al.*, 2017). Yanuhar, *et al.* (2012) juga menambahkan, BM mantel protein VNN berkisar antara 37,18 kDa dan 42 kDa. Berdasarkan hasil uji SDS-PAGE tersebut, diketahui bahwa terdapat VNN pada sampel dilihat dari BM yang berpendar termasuk dalam BM mantel protein VNN.

BRAWIJAY

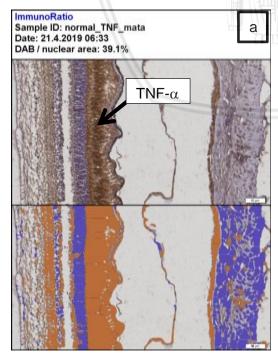
4.1.6 Uji TNF-α Mata Ikan Kerapu Cantang

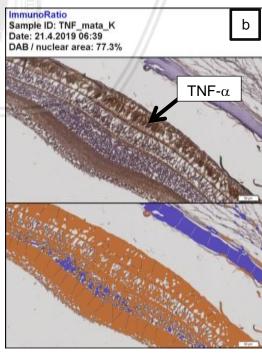
a. Hasil Pengujian Ekspresi TNF- α

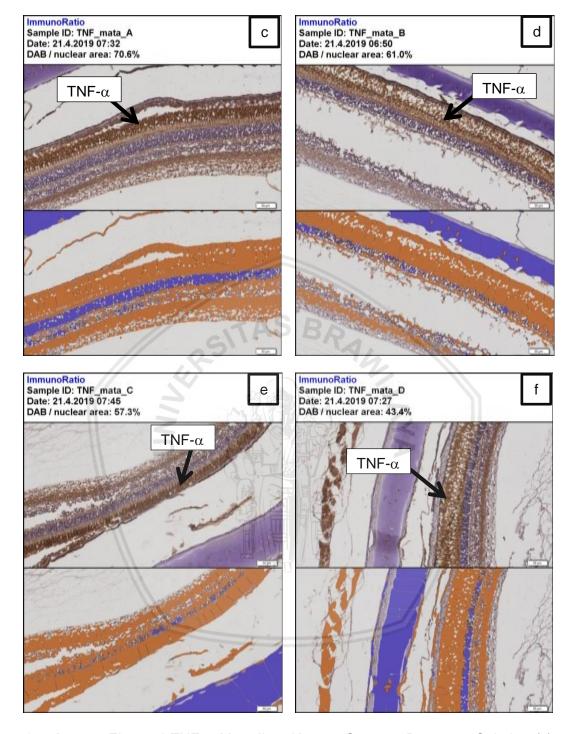
Ekspresi TNF- α mata ikan kerapu cantang dianalisa menggunakan *ImmunoRatio software* (*Image Analyser*) dengan berbasis internet. *Software* ini mendeteksi banyaknya pewarnaan IHK dari gambar digital setelah dilakukan scanning slide pada mikroskop dan memberikan informasi kuantitatif berupa persentase bagian yang terwarnai (Diab, *et al.*, 2015). Pengujian TNF- α mata ikan kerapu cantang dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Ekspresi TNF- α yang diperoleh disajikan pada Tabel 4 dan Gambar 13.

Tabel 4. Ekspresi TNF- α pada Ikan Kerapu Cantang

Dosis D. salina (mg/kg)	Persentase Ekspresi TNF-α (%)
Normal	39,1
	77,3
250	70,6
300	61,0
350	57,3
400	43,4







Gambar 13. Ekspresi TNF-α Mata Ikan Kerapu Cantang Berwarna Cokelat. (a) ikan normal; (b) perlakuan 0 mg/kg; (c) perlakuan 250 mg/kg; (d) perlakuan 300 mg/kg; (e) perlakuan 350 mg/kg; dan (f) perlakuan 400 mg/kg.

Hasil pengujian pada gambar diatas menunjukkan adanya reaksi TNF- α pada retina ikan kerapu cantang yang diinfeksi VNN. Organ target infeksi virus VNN yaitu otak, sumsum tulang belakang, dan retina dimana VNN bereplikasi

aktif dan menyebabkan vakuolisasi jaringan yang luas (OIE, 2019). Perhitungan ekspresi TNF- α menggunakan metode *ImmunoRatio*. Ekspresi TNF- α tertinggi dan terendah dari perlakuan yang diinfeksi virus VNN yaitu berturut-turut terdapat pada perlakuan kontrol (-) dengan dosis *D. salina* 0 mg/kg dan perlakuan D dengan dosis 400 mg/kg. Perbedaan persentase TNF- α dipengaruhi oleh dosis pemberian *D. salina* yang berbeda, semakin besar dosis yang diberikan semakin kecil persentase ekspresi TNF- α . Hal ini diduga karena senyawa aktif *D. salina* memiliki aktivitas anti virus yang dapat menghambat pertumbuhan VNN sehingga TNF- α diproduksi dalam jumlah yang rendah. Jumlah TNF- α pada kadar yang tepat akan memberikan perlindungan dan penyembuhan, tetapi pada kadar yang berlebihan akan menyebabkan kerusakan jaringan yang sangat berat dan fatal (Irawati, *et al.*, 2008).

Berdasarkan hasil uji GCMS, terdapat senyawa *napthalene*, fenol dan tetradekana yang terkadung di dalam *D. salina* (Yuwanita, *et al.*, 2019 belum dipublikasikan). Fenol terdiri dari ribuan senyawa, diantaranya yaitu senyawa flavonoid dan tanin (Momuat, *et al.*, 2015). Aktivitas anti virus diketahui berkaitan dengan kelompok senyawa polifenol, terutama flavonoid dan tanin (Hernawan dan Setyawan, 2003). Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang berperan sebagai anti virus dengan menghambat pertumbuhan virus (Saparuddin, *et al.*, 2017; Hidayanti, *et al.*, 2010). Senyawa flavonoid dapat menyebabkan denaturasi atau koagulasi protein sehingga sel virus akan mati dan proses replikasi dari virus VNN akan terhambat secara otomatis jumlah virus akan berkurang (Solichati, *et al.*, 2010). Saparuddin, *et al.* (2017) menambahkan bahwa senyawa flavonoid dapat menghambat proses replikasi virus dengan cara mengikat partikel virus dan menghambat glikoprotein virus, dimana glikoprotein pada virus berperan dalam penempelan dengan sel inang. Senyawa flavonoid juga

menghambat replikasi VNN pada sel darah ikan kerapu sehingga jumlah VNN dan sel yang terinfeksi berkurang. Flavonoid pada kadar rendah akan menyebabkan denaturasi protein menurut pendapat Hidayanti, *et al.* (2010) dan pada kadar tinggi akan menyebabkan koagulasi protein sehinnga sel akan mati. Senyawa polifenol seperti flavonoid juga dapat menekan teraktivasinya NF-kB sehingga ekspresi protein inflamasi seperti TNF-α tidak terbentuk (Rastini, *et al.*, 2010). Senyawa aktif lain dari ekstrak *D. salina* yaitu tanin yang memiliki aktivitas anti virus. Senyawa tanin merupakan kelompok polifenol yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme seperti bakteri dan virus (Hernawan dan Setyawan, 2003; Afrianti, *et al.*, 2013). Tanin dapat berikatan dengan dinding sel mikroorganisme (bakteri, virus) sehingga akan menginaktifkan kemampuan menempel, menghambat pertumbuhan dan aktivitas enzim protease (Afrianti, *et al.*, 2013).

Pemberian ekstrak *D. salina* pada ikan kerapu cantang dapat menurunkan jumlah VNN dan mengurangi jumlah sel yang terinfeksi dengan adanya aktivitas anti virus oleh senyawa aktif flavonoid dan tanin. Jumlah virus yang berkurang akan menurunkan jumlah sinyal inflamasi yang terkirim ke sel untuk memproduksi TNF-α sehingga persentase ekspresi TNF-α semakin kecil. Pada perlakuan normal dimana ikan tidak diinfeksi virus VNN dan tidak diberi perlakuan *D. salina* menunjukkan jumlah persentase ekspresi TNF-α yang rendah. Dalam keadaan normal, ekspresi TNF-α muncul dalam jumlah sedikit yang berfungsi menangkal radikal bebas serta merancang gen sitotoksik sebagai pertahanan sel inang (Yanuhar, *et al.*, 2015). Ekspresi TNF-α dilihat dari munculnya warna coklat pada sitoplasma makrofag. Hal ini sesuai dengan pendapat Sayuti (2015) bahwa pada preparat imunohistokimia ekspresi TNF-α ditunjukkan dengan adanya perubahan warna sitoplasma makrofag yang coklat.

BRAWIJAYA

b. Mekanisme D. salina Menghambat VNN pada Ikan Kerapu Cantang

Ikan dapat terinfeksi VNN akibat masuknya virus melalui permukaan tubuh (lendir, sirip dan otot) serta melalui oral sehingga virus dapat menginfeksi sel-sel epitel sistem saluran pencernaan. Infeksi VNN pada ikan yang dilakukan melalui injeksi intra muskular sangat cepat menyebar dan menginfeksi inang melalui saraf perifer yang ada di otot, masuk ke dalam sistem saraf pusat dan mata sehingga mengakibatkan ikan kehilangan orientasi berenang dan disfungsi visual (Sudaryatma, et al., 2012). VNN yang ada pada intra muskular kemudian melewati sistem saraf perifer di jaringan otot tepi lalu dibawa oleh axon menuju jaringan spina pada tulang belakang. VNN menginfeksi sistem saraf pusat yang berada di tulang belakang dan melalui saraf menuju organ mata (retina) ikan (Gomez, et al., 2006). Yanuhar (2015) juga menambahkan, organ mata pada ikan kerapu cantang merupakan tempat yang cocok untuk virus RNA seperti VNN mereplikasi dirinya. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat kesesuaian antara asam amino yang terdapat dalam VNN dan protein reseptor ikan kerapu cantang.

Virus yang menginfeksi sel inang akan bereplikasi dengan cara mensintesis protein penyusunnya di dalam sitosol. Fragmen-fragmen protein virus diikat oleh reseptor glikoprotein di dalam retikulum endoplasma (RE) sel virus yang selanjutnya dipresentasikan di permukaan sel kepada sel T sehingga mengaktifkan sel-sel lain seperti makrofag dan limfosit sel B. Makrofag yang aktif akan melepaskan sitokin sebagai respon imun terhadap infeksi virus. Salah satu jenis sitokin yang akan dilepaskan yaitu TNF- α yang merupakan respon inflamasi dari tubuh ikan. Sitokin disekresikan di dalam sel makrofag yang terdapat dalam jaringan mata ikan (Yanuhar, 2015). Beberapa referensi telah menyebutkan bahwa paparan virus pada sel inang dapat menyebabkan reaksi inflamasi/peradangan. Berdasarkan pendapat Yanuhar (2015), salah satu reaksi

inflamasi yang ditunjukkan adalah dengan meningkatnya ekspresi TNF- α saat diinfeksi VNN. Respon imun adaptif ikan kerapu menunjukkan bahwa reaksi inflamasi pada jaringan mata dapat berkurang apabila jumlah virus yang menginfeksi dalam jumlah yang sedikit. Jumlah VNN pada jaringan mata ikan kerapu cantang dapat berkurang dengan pemberian bahan alami yang berperan sebagai anti virus terhadap VNN.

4.2 Parameter Penunjang

4.2.1 Kualitas Air

Pengukuran kualitas air selama masa pemeliharaan ikan kerapu cantang dilakukan untuk menjaga agar lingkungan tempat hidup ikan tetap sesuai dengan kebutuhan. Kualitas air yang diamati antara lain suhu, derajat keasaman (pH), oksigen terlarut (DO) dan salinitas. Kualitas air diukur pada pagi dan sore hari selama masa pemeliharaan dan sebelum uji tantang yaitu pada tanggal 18 Februari - 7 Maret 2019. Data kualitas air yang diperoleh selama penelitian disajikan pada Lampiran 3 dengan kisaran yang disajikan pada tabel 5.

Tabel 5. Kisaran Parameter Kualitas Air Selama Penelitian

Parameter	Nilai	Referensi
Suhu (°C)	27-30	24-32 (Kordi, 2010)
Derajat Keasaman (pH)	7,11-7,94	7-9 (Kordi, 2010)
Oksigen Terlarut (DO) (ppm)	5,1-8,2	>5 (Brotohadikusumo, 1997)
Salinitas (ppt)	31-34	15-35 (Kordi, 2010)

Berdasarkan hasil pengukuran suhu selama masa pemeliharan berkisar antara 27-30 °C. Kisaran tersebut masih termasuk dalam kisaran suhu yang baik untuk pertumbuhan ikan kerapu menurut Suwoyo (2011) dimana suhu yang baik berkisar antara 26-30,5°C. Suhu perairan penting untuk diperhatikan karena mempengaruhi kelangsungan hidup, pertumbuhan, morfologi, reproduksi, tingkah laku dan metabolisme ikan. Brotohadikusumo (1997) menambahkan bahwa kisaran suhu yang baik untuk pembesaran ikan kerapu berkisar antara 28-32°C.

Hasil pengukuran keasaman perairan (pH) selama masa pemeliharaan berkisar antara 7,11-7,94. Kisaran pH yang layak untuk pertumbuhan ikan kerapu menurut Suwoyo (2011) yaitu 7,5-8,5. pH air yang baik untuk pembesaran ikan kerapu menurut Brotohadikusumo (1997) berkisar antara 7-8. Kadar pH selama penelitian masih dianggap baik untuk kelangsungan hidup ikan kerapu.

Oksigen terlarut (DO) selama pemeliharaan berkisar antara 5,1-8,2. Kandungan DO didalam perairan tidak mengalami perubahan yang drastis. Fluktuasi oksigen terlarut akan sangat berbahaya bagi kehidupan ikan kerapu apabila mencapai batas toleransi dan berlangsung dalam waktu yang lama (Suwoyo, 2011). Kandungan DO yang ideal bagi pertumbuhan benih ikan kerapu yaitu >5 ppm menurut Subyakto dan Cahyaningsih (2003). Ahmad, *et al.* (1992) menyebutkan bahwa DO harian antara 3,4-6,5 belum mencapai konsentrasi krisis bagi ikan kerapu sehingga kisaran selama pemeliharaan masih dianggap baik untuk ikan kerapu.

Kadar salinitas selama pemeliharaan berkisar antara 31-34 ppt. Kadar tersebut masih termasuk dalam kadar yang baik bagi pertumbuhan ikan air laut seperti ikan kerapu. Salinitas termasuk kualitas air yang penting bagi kelangsungan hidup dan pertumbuhan ikan kerapu karena berperan dalam transformasi energl dan proses osmoregulasi di dalam menjaga keseimbangan tekanan cairan tubuh dan lingkungan (Suwoyo, 2011). Kadar garam terbaik untuk ikan kerapu menurut Burhanuddin dan Tonnek (2005) yaitu berkisar antara 15-33 ppt. Muslimin, et al. (2004) menyatakan bahwa salinitas 35-40 ppt masih dapat memberikan kelangsungan hidup dan pertumbuhan bagi ikan kerapu. Kadar salinitas selama pemeliharaan tidak mengalami fluktuasi yang berarti sehingga tidak menjadi penyebab ikan kerapu mengalami stres.

BRAWIJAYA

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang didapatkan dari penelitian ini yaitu pemberian ekstrak *Dunaliella salina* pada pakan dengan dosis yang berbeda berpengaruh terhadap persentase ekspresi TNF-α mata ikan kerapu cantang yang berbeda pula. Perlakuan terbaik yaitu pada perlakuan dosis *D. salina* 400 mg/kg pakan dengan persentase ekspresi TNF-α sebesar 43,4%, dimana persentase ini mendekati perlakuan normal sebesar 39,1%. Persentase perlakuan dosis *D. salina* 250 mg/kg, 300 mg/kg, 350 mg/kg dan 0 mg/kg secara berturut-turut yaitu 70,6%, 61,0%, 57,3% dan 77,3%.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan dari penelitian ini yaitu untuk dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai ekspresi TNF- α pada ikan kerapu yang terinfeksi VNN dengan pemberian ekstrak *D. salina* menggunakan dosis yang lebih tinggi dikarenakan hasil terbaik dari penelitian ini yaitu pada dosis tertinggi dan masih dapat dinaikkan untuk menentukan dosis terbaik.

DAFTAR PUSTAKA

- Afero, F. 2012. Analisa ekonomi budidaya kerapu macan (*epinephelus fuscoguttatus*) dan kerapu bebek (*Epinephelus altivelis*) dalam keramba jaring apung di Indonesia. *Depik.* **1**(1): 10-21.
- Afrianti, M., B. Dwiloka dan B. E. Setiani. 2013. Total bakteri, PH, dan kadar air daging ayam broiler setelah direndam dengan ekstrak daun senduduk (*Melastoma malabathricum* L.) selama masa simpan. *Jurnal Pangan dan Gizi.* **4**(7): 49-56.
- Agustini, N. W. S dan K. Kusmiati. 2012. Identifikasi dan uji aktivitas antibakteri senyawa aktif secara maserasi dan digesti dalam berbagai pelarut dari mikroalga *Dunaliella salina*. *Prosiding Seminar Biologi*. 1: 544-551.
- Ahmad, T. M., Ardiansyah dan D. Usmunandar. 1992. Pengaruh pemberian pakan berkadar protein berbeda terhadap pertumbuhan kerapu lumpur (*Epinephelus tauvina*). *Jurnal Penelitian Budidaya Pantai*. **8**(2): 71-80.
- Alia, M., Y. Iriani, Z. Anwar dan Theodorus. 2014. Kadar *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF-α) sebagai prediktor demam berdarah dengue pada hari ketiga. *MK*S. **46**(3): 176-180.
- Andriyani, W. M. 2012. *Uji kemampuan kandidat vaksin DNA Viral Nervous Necrosis dalam menginduksi antibodi pada ikan Kerapu Tikus (Cromileptes altivelis*). Tesis. Institut Pertanian Bogor.
- Arief, M., D. K. Pertiwi dan Y. Cahyoko. 2011. Pengaruh pemberian pakan buatan, pakan alami, dan kombinasinya terhadap pertumbuhan, rasio konservasi pakan dan tingkat kelulushidupan ikan sidat (*Anguilla bicolor*). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. **3**(1): 61-65.
- Arun, N dan D. P. Singh. 2016. A review on pharmacological applications of halophilic alga *Dunaliella*. *Indian Journal of Geo-Marine Science*. **45** (3): 440-447.
- Atma, Y. 2018. Prinsip Analisis Komponen Pangan Makro dan Mikro Nutrien. Deepublish Publisher. Yogyakarta. 126 hlm.
- Barnes, P. J and M. Karin. 1997. Nuclear Factor-kB a pivotal transcription factor in chronic inflammation diseases. *The New England Journal of Medicine*. **336**(15): 1066-1071.
- Bhattacharjee, M. 2016. Pharmaceutically valuable bioactive compounds of algae. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. **9**(6): 43-47.
- Brotohadikusumo, N. A. 1997. Dampak Pembangunan Fisik Terhadap Biota Perairan. PPLH UNDIP Semarang.
- Burhanuddin dan S. Tonnek. 2005. Pendederan benih kerapu macam di tambak. Laporan Hasil Penelitian BRPBAP Maros.

- Cepeda, G. N., B. B. Santoso, M. M. Lisangan dan I. Silamba. 2018. Kandungan fenol, flavonoid dan terpenoid ekstrak metanol daun akway (*Drimys piperita* Hook f.). *Agrotek.* 1: 35-40.
- Charioui, I., M. Chikhaoui, A. Banaoui, M. Abbassi, F. E. Filali and A. Kaaya. 2016. Growth and carotenoid production in *Dunaliella* spp.isolated from hypersaline habitats in the region of Essaouira (Morocco): effect of NaNO₃ concentration. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* **4**: 649-657.
- Chi, S. C., C. F. Lo and S. C. Lin. 2001. Characterization of grouper nervous necrosis virus. *Journal Fish Disease*. **24**: 3-13.
- ______, S. C. Lin, H. M. Su and W. W. Hu. 1999. Temperature effect on nervous necrosis virus infection in grouper cell line and in grouper larvae. *Virus Research.* **63**: 107-114.
- Dewi, N. Y. 2013. Penetapan kadar dan analisis profil protein dan asam amino ekstrak ampas biji jinten hitam (*Nigella sativa* Linn.) dengan metode SDS-PAGE dan KCKT. SKRIPSI. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Diab, N. A., M. I. Assaf, M. A. Toama and M. I. Elghareeb. 2015. Role of tumor necrosis factor alpha and basic fibroblast growth factor in the pathogenesis of vitiligo: an immunohistochemical study before and after melanocyte transfer by sandpaper technique. *ZUMJ*. 21(6): 637-645.
- Duan, W., F. Meng, Y. Lin and G. Wang. 2017. Toxicological effects of phenol on four marine microalgae. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **52**: 170-176.
- Fitriatin, E dan A. Manan. 2015. Pemeriksaan *Viral Nervous Necrosis* (VNN) pada ikan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. **7**(2): 149-152.
- Fitriyani., H. Kusdianto and K. Sukarti. 2015. Effect of different dietary lipid sources on feed efficiency and feed conversion ratio of Cantang Grouper (*Epinephelus* sp.). *Tropical Fishery Science J.* **20** (2): 8-14.
- Fretes, H., A. B. Susanto, B. Prasetyo dan L. Limantara. 2012. Karotenoid dari makroalgae dan mikroalgae: potensi kesehatan aplikasi dan bioteknologi. *J. Teknol. Dan Industri Pangan.* **23** (2): 221-228.
- Gomez, D. K., D. J. Lim, G. W. Baeck, H. J. Youn, N. S. Shin, H. Y. Youn, C. Y. Hwang, J. H. Park and S. C. Park. 2006. Detection of betanodaviruses in apparently healthy aquarium fishes and invertebrates. *J. Vet. Sci.* **7**(4): 369-374.
- Gusman, E. 2011. Sistem pertahanan tubuh ikan : respon pertahanan adaptif, major histocompatibility complex (MHC), reseptor sel T, sitokin. *Jurnal Harpodon Borneo*. **1**: 54-61.
- Hadiyanto dan M. Azim. 2012. Mikroalga: Sumber Pangan dan Energi Masa Depan. Edisi Pertama. UPT UNDIP Press. Semarang. 138 hlm.
- Hakim, M. A., Indriasih dan W. Wiyani. 2016. Penyakit Ikan Kerapu: Bab VII Penyakit Viral. LP2IL. Serang. 75 hlm.

- Hamdi, A. S dan E. Bahruddin. 2015. Metode Penelitian Kuantitatif Aplikasi dalam Pendidikan. Deepublish. Yogyakarta. 171 hlm.
- Hamed, I., B. Ak, O. Isik and L. Uslu. 2017. the effects of salinity and temperature on the growth of *Dunaliella* sp. isolated from the Salt Lake (Tuz Gölü), Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.***17**: 1367-1372.
- Handayani, N. A dan D. Ariyanti. 2012. Potensi mikroalga sebagai sumber biomasa dan pengembangan produk turunannya. Fakultas Teknik Universitas Diponegoro. **33** (2): 58-65.
- Hernawan, U. E. dan A. D. Setyawan. 2003. Review: ellagitanin; biosintesis, isolasi, dan aktivitas biologi. *Biofarmasi*. **1**(1): 25-38.
- Hidayanti, F. N., Diniatik dan I. K. Astuti. 2010. Profil kromatografi lapis tipis dan uji aktivitas antivirus ekstrak etanol daun tapak liman (*Elephantopus scaber* L.) terhadap virus *Avian influenza*. *Pharmacy*. **7**(3): 13-27.
- Irawati, L., N. Acang dan N. Irawati. 2008. Ekspresi *Tumor Necrosis Factor*-alfa (TNF-α) dan Inter Leukin-10 (IL-10) pada infeksi malaria falciparum. *Majalah Kedokteran Andalas*. 1(32): 17-28.
- Isnaini, N. 2008. Identifikasi profil protein oosit kambing pada lama maturasi in vitro yang berbeda dengan SDS-PAGE. *J. Ternak Tropika*. 9(2): 60-65.
- Jithendran, K. P. 2017. Viral Nervous Necrosis: a challenge to finfish aquaculture. Basic and Clinical Virology: Student book. 1: 1-6.
- Kahtan, M. I., H. Astuty dan H. Wibowo. 2018. Uji antimalaria ekstrak Akar Pasak Bumi (*Eurycoma Longifolia Jack*) dan pengaruhnya terhadap ekspresi TNF-α pada Mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*. Majalah Kedokteran UKI 2018. **34**(2): 74-81.
- Kordi, M. Ghufran H. 2010. Nikmat Rasanya, Nikmat Untungnya Pintar Budi Daya Ikan di Tambak Secara Intensif. Lily Publisher. Yogyakarta. 262 hlm.
- Kulshreshtha, J And G.P. Singh. 2013. Evaluation of various inorganic media for growth and biopigments of *Dunaliella salina*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. **4**(2): 1083-1089.
- Kumar, P., J. K. Patra and P. Chandra. 2018. Advances in Microbial Biotechnology: Current Trends and Future Prospects. Apple Academic Press Inc. Canada. p. 574.
- Langkosono. 2007. Budidaya ikan Kerapu (Serranidae) dan kualitas perairan. *Neptunus*. **14**(1): 61-67.
- Lestari, A. T dan P. E. Sudaryatma. 2014. Studi imunohistokimia darah dan suspense organ kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) yang diinfeksi virus isolate lapang penyebab *Viral Nervous Necrosis. Jurnal Sain Veteriner.* **32**(1): 85-92.
- Luin, M., F. F. Ching and S. Senoo. 2013. Sexual maturation and gonad development in Tiger Grouper (*Epinephelus Fuscoguttatus*) X Giant Grouper (*E. Lanceolatus*) hybrid. *J Aquac Res Development.* **5**(2): 1-5.

- Mahardika, K., I. Mastuti dan Zafran. 2017. Pencegahan infeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN) penyebab *Black Body Disease* pada kerapu hibrid dengan vaksin sederhana. Seminar Nasional Kelautan XII. Fakultas Teknik dan Ilmu Kelautan Universitas Hang Tuah Surabaya.
- Marzuqi, M dan D. N. Anjusary. 2013. Kecernaan nutrien pakan dengan kadar protein dan lemak berbeda pada juvenil ikan Kerapu Pasir (*Epinephelus corallicola*). *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. **5**(2): 311-323.
- Masithah, E. D., N. Ariesma dan Y. Cahyoko. 2011. Pengaruh pemberian bakteri *Bacillus pumilus* pada rumen sapi sebagai pupuk terhadap pertumbuhan *Dunaliela salina. Jurnal Kelautan.* **4**(1): 82-89.
- Maulina, N. 2015. Penilaian TNF-alfa pada hati mencit jantan setelah pemberian ekstrak Etanol Manggis *Garcinia mangostana* L dengan metode imunohistokimia. **7**(1): 1-9.
- Mihardja, H dan Hety. 2011. Prospek akupuntur dalam pengobatan kanker melalui peningkatan proliferasi dan sitotoksisitas sel *Natural Killer. Indonesian Journal of Cancer.* **5**(4): 1-10.
- Momuat, L. I., E. Suryanto, O. Rantung, A. Korua dan H. Datu. 2015. Perbandingan senyawa fenolik dan aktivitas antioksidan antara sagu baruk segar dan kering. *Chem. Prog.* **8**(1): 20-29.
- Mursitorini, E dan P. Ramdhani. 2016. Penyakit Ikan Kerapu: Bab I Teknik Budidaya Kerapu. LP2IL. Serang. 75 hlm.
- Muslimin, S., H. S. Suwoyo dan Mangampa. 2004. Penggunaan shelter berbeda terhadap sintasan dan pertumbuhan benih kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dalam bak terkontrol. Prosiding Koinferensi Nasional IV "Pengelolaan Sumberdaya Perairan Umum, Pesisir, Pulau-Pulau Kecil dan Laut Indonesia" Balikpapan.
- Mustopa, A. Z., D. Susilaningsih., L. Sukmarini., M. Ridwan., Delicia dan Hasim. 2012. Pengembangan polisakarida dari mikroalga btm 11sebagai inhibitor RNA helikase virus hepatitis c. *Prosiding Insinas.* **1**(1): 146-150.
- Nagasawa, K and E. R. Cruz-Lacierda. 2004. Disease of Cultured Groupers. Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center. Philippines. p. 81.
- Nazir, M. 1988. Metode Penelitian. Jakarta: Ghalia Indonesia. 64 hlm.
- Novisa, E., Tarsim dan E. Harpeni. 2015. Pengaruh jintan hitam (*Nigella sativa*) terhadap histopatologi organ kakap putih (*Lates calcarifer*) yang terinfeksi *Viral Nervous Necrosis* secara buatan. *e-Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan.* **3**(2): 383-388.
- Novriadi, R., S. Agustatik dan T. D. O. N. 2015. Identifikasi keberadaan *Nervous Necrosis* virus dan *Iridovirus* pada budidaya ikan laut di wilayah kerja Balai Perikanan Budidaya Laut Batam. *Omni-Akuatika*. **14**(20): 54-62.
- Ode, I. 2011. Identifikasi ekspresi protein reseptor organ otak ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) pada infeksi vibriosis. *Bimafika*. **3**: 216 -224.

- OIE (Organization International des Epizooties). 2019. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals (Chapter 1.1.1. Viral encephalopathy and retinopathy). p. 20.
- Ozdemir G., N. U. Karabay, M. C. Dalay and B. Pazarbasi. 2004. Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*. *Phytotherapy Research*. **18**: 754–757.
- Pereira, A. P., I. C. F. R. Ferreira, F. Marcelino, P. Valentão, P. B. Andrade, R. Seabra, L. Estevinho, A. Bento and J. A. Pereira. 2007. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*. **12**: 1153-1162.
- Prihartini, N. C. 2016. Distribusi pathognomik virulensi VNN (*Viral Nervous Necrotic*) pada benih nila (*Oreochromis* sp.). *Samakia: Jurnal Ilmu Perikanan.* **7**(2): 51-56.
- Rachmania, R. A., P. Wahyudi, A. M. Wardani dan D. R. Insani. 2017. Profil berat molekul enzim protease buah nanas (*Ananas comosus* L. Merr) dan pepaya (*Carica papaya L.*) menggunakan metode SDS-PAGE. *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia*. **13**(1): 52 65
- Rahmaningsih, S dan A. I. Ari. 2013. Pakan dan pertumbuhan ikan Kerapu Cantang (*Epinephellus fuscoguttatus-lanceolatus*). *Ekologia*. **13**(2): 25-30.
- Rastini, E. K., M. A. Widodo dan M. S. Rohman. 2010. Pengaruh pemberian ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) terhadap aktivasi NF-κβ dan ekspresi protein (TNF-α, ICAM-1) pada kultur sel endotel (HUVECs) dipapar Ox-LDL. *J.Exp. Life Sci.* **1**(1): 48-55.
- Rodrigues-Sousa, T., A. F. Ladeirinha, A. R. Santiago, H. Carvalheiro, B. Raposo, A. Alarcão, A. Cabrita, R. Holmdahl, L. Carvalho and M. M. Souto-Carneiro. 2014. Deficient production of reactive oxygen species leads to severe chronic DSS-induced colitis in Ncf1/p47phox-mutant mice. PLOS ONE. **9**(5): 1-10.
- Rokade, Y. B dan R. Z. Sayyed. 2009. Naphthalene derivatives: a new range of antimicrobials with high therapeutic value. *Rasayan J. Chem.* **2**(4): 1-9.
- Roza, D., F. Johnny dan Tridjoko. 2006. Peningkatan respon imun non-spesifik benih Kerapu Bebek (*Cromileptes altivelis*) dengan imunostimulan dan bakterin terhadap infeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN). *Jurnal Perikanan*. **8**(1): 25-35.
- Roziqin, M. 2018. Respon Anti-Inflamasi B-Aktin Pada Organ Saraf Mata Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) yang Diberi Perlakuan *Viral Nervous Necrosis* (VNN) dan Mikroalga Laut *Spirulina* sp. SKRIPSI. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.
- Saparuddin., A. Ridwan dan Z. Arham. 2017. Efektivitas ekstrak daun *Macaranga tanarius* dalam menginaktifasi *Viral Nervous Necrosis* ikan kerapu tikus. *Biowallacea*. **4**(1): 519-526.

- Sayuti, S. N. 2015. Deteksi imunohistokimia antigen *Coxiella burnetti* sebagai penyebab Q Fever pada sapi. *Jurnal Kedokteran Hewan.* **9**(2): 1-15.
- Seckbach, J. 2007. Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments. Springer. Netherlands. 813 hlm.
- Sim, S. Y., M. Rimmer, K. Williams, J. D. Toledo, K. Sugama, I. Rumengan dan M. J. Phillips. 2005. Pedoman Praktis Pemberian dan Pengelolaan Pakan untuk Ikan Kerapu yang di Budidaya. NACA, Bangkok, Thailand. 18 hlm.
- Siregar, Y. I dan Adelina. 2009. Pengaruh vitamin C terhadap peningkatan Hemoglobin (Hb) darah dan kelulushidupan benih ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*). *Jurnal Natur Indonesia*. **12**(1): 75-81.
- Soemarjati, W., A. B. Musim, R. Susiana dan C. Saparinto. 2015. Bisnis dan Budi Daya Kerapu. Penebar Swadaya. Jakarta. 148 hlm.
- Solichati, E. L., A. M. Kusuma dan Diniatik. 2010. Aktivitas antivirus ekstrak etanol daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) terhadap virus *Newcastle Disease* beserta profil kromatografi lapis tipis. *Pharmacy*. **7**(1): 64-75.
- Subagyo, W. C., N. K. Suwiti dan I N. Suarsana. 2015. Karakteristik protein daging sapi bali dan wagyu setelah direbus. *Buletin Veteriner Udayana*. **7**(1): 17-25.
- Subyakto, S dan S. Cahyaningsih. 2003. Pembenihan Kerapu Skala Rumah Tangga. Jakarta: Agromedia Pustaka. 63 hlm.
- Sudaryatma, P. E., A. T. Lestari, N. L. Sunarsih, K. S. Widiarti, S. N. Hidayah, D. Srinoto. 2012. Imunositokimia *Streptavidin Biotin*: deteksi dini *Viral Nervous Necrosis Virus* pada lendir ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Jurnal Sain Veteriner.* **30**(1): 99-109.
- Sumino., C. T. Anggraeni dan Tardiono. 2017. Inventarisasi, prevalensi dan intensitas ektoparasit pada ikan Kerapu (*Epinephelus* sp.) di keramba jaring apung perairan Teluk Hurun Lampung. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. **7**(1): 1-7.
- Sumodiningrat, G. 2007. Pemberdayaan Sosial: Kajian Ringkas Tentang Pembangunan Manusia Indonesia. Jakarta: Buku Kompas. 144 hlm.
- Supit, I. A., D. H. C. Pangemanan dan S. R. Marunduh. 2015. Profil *Tumor Necrosis Factor* (TNF-α) berdasarkan Indeks Massa Tubuh (IMT) pada mahasiswa fakultas kedokteran unsrat angkatan 2014. *eBm.* **3**(2): 640-643.
- Sutarmat, T dan H. T. Yudha. 2013. Analisis keragaan pertumbuhan benih kerapu hibrida hasil hibridisasi Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dengan Kerapu Kertang (*Epinephelus lanceolatus*) dan Kerapu Batik (*Epinephelus microdon*). *J. Ris. Akuakultur.* **8**(3): 363-372.
- Suwoyo, H. S. 2011. Kajian kualitas air pada budidaya kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) sistem tumpang sari di areal mangrove. *Berkala Perikanan Terubuk*. **39**(2): 25-40.

- Tang, L., C. Lin, N. K. Krishna, M. Yeager, A. Schneemann and J. E. Johnson. 2002. Virus-like particles of a fish Nodavirus display a capsid subunit domain organization different from that of insect Nodaviruses. *Journal of Virology*. **76**(12): 6370-6375.
- Tarsim., A. Setyawan, E. Harpen dan A. R. Pratiwi. 2013. The effication of Black Cummin (Nigella sativa) as immunostimulant in Humpback Grouper (Cromileptes altivelis) againts VNN (Viral Nervous Necrosis) infection. Seminar Nasional Sains dan Teknologi V Lembaga Penelitian Universitas Lampung. 525-532.
- Uribe, C., H. Folch, R. Enriquez and G. Moran. 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veteriarni Medicina*. **56**(10): 486-503.
- Wehr, J. D., R. G. Sheath and J. P. Kociolek. 2015. Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification, Second Edition. USA: Academic Press. p. 1066.
- Wibisono, D. 2003. Riset Bisnis Panduan Bagi Praktisi dan Akdemisi. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 309 hlm.
- Winahyu, D. A. 2017. Bioaktivitas antioksidan senyawa eksopolisakarida dari mikroalga *Dunaliella* sp. *Jurnal Farmasi Lampung.* **6**(2): 23-29.
- Yanuhar, U. 2011. The function of receptor protein humpback grouper *Epinephelus* sp. in expression and proliferation of CD4 and CD8 cells in defence immunity of viral nervous necrotic infection. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*. **1**(2): 34-67.
- _____. 2015. Effects of pigment-protein fraction from *Nannocloropsis* oculata on TNF and IL-6 which act as an anti-inflammatory against *Viral Nervous Necrosis* (VNN) infection. *Procedia Chemistry*. **14**: 437-443.
- dan A. Khumaidi. 2017. The application of pigment-protein fraction from *Nannochloropsis oculata* on β-actin response of *Cromileptes altivelis* infected with viral nervous necrosis. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. **16**(1): 22–32.
- ______, E. Gusman and D. Arfiati. 2012. The exposure immunogenic protein of *Viral Nervous Necrotic* on humpback grouper that influences to proliferation and expression of immune cells (interferon γ and NF-Kb cell). *Advances in Environmental Biology*. **6**(1): 388-396.
- ______, Kusriani, D. Arfiati, Sukoso, N. Dahokhlory dan A. Khumaidi. 2015. Fragmen pigmen protein *N. oculata* pada ikan kerapu terinfeksi *Viral Nervous Necrosis* dalam menginduksi TNF-α. Seminar Nasional Tahunan XII Hasil Penelitian Perikanan dan Kelautan.
- Yoshikoshi, K and K. Inoue. 1990. *Viral Nervous Necrosis* in hatchery larvae and juvenils of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schelgel). *J. Fish Dis.* **13**: 69-77.
- Yuasa, K., I. Koesharyani, D. Roza, K. Mahardika, F. Johnny and Zafran. 2001. Manual for PCR procedure; rapid diagnosis on *Viral Nervous Necrosis* (VNN) in grouper. *Lolitkanta-JICA Booklet*. **13**: 1-35.

- Yuwanita, R., N. R. Buwono dan H. F. E. Putra. 2018. Pengaruh *Dunaliella salina* terhadap polimorfonuklear leukosit ikan kerapu cantang (*Epinephelus fuscoguttatus x Epinephelus lanceolatus*) yang diinfeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. **10**(2): 124-130.
- Zhang, A., D. Chen, H. Wei, L. Du, T. Zhao, X. Wang and H. Zhou. 2012. Functional characterization of TNF- α in grass carp head kidney leukocytes: induction and involvement in the regulation of NF-kB signaling. Fish and Shellfish Immunology. **33**: 1123-1132.



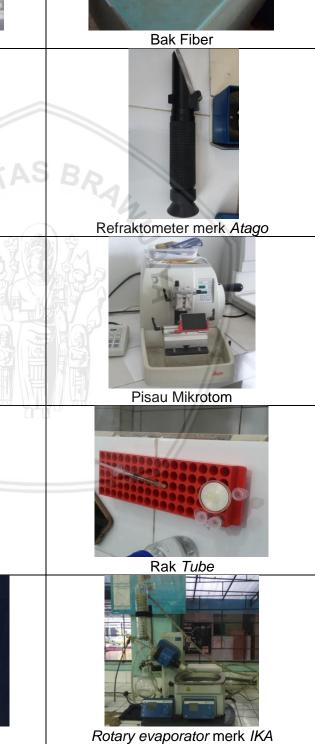
LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat-Alat Penelitian











Ice Crusher



Lampiran 2. Bahan-Bahan Penelitian





Lampiran 2. (Lanjutan)



Object glass merk BioGear



Go Taq® Green Master Mix



DNA Ladder 100 bp



Lem entelan



Aquades



Ethidium Bromide (EtBr)



Primer



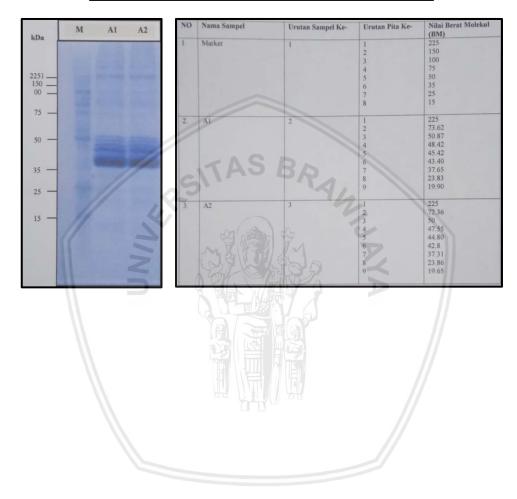
Agarose



Xylol

Lampiran 3. Data Hasil Uji SDS-PAGE Ikan Kerapu Cantang yang Diinfeksi VNN

No.	Nama Sampel	Konsentrasi (mg/ml)
1.	A1	16.56
2.	A2	16.56



Lampiran 4. Data Hasil Pengamatan Kualitas Air Selama Penelitian

	Dosis	Kualitas Air							
Tanggal	D. salina	Suh	u (C)	DO (ppm)	р	Н	Sal	(ppt)
	(mg/kg)	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore
	0	28	28	5,6	6,9	7,58	7,73	34	33
18 Feb	250	28	29	5,7	5,9	7,62	7,32	34	33
	300	28	29	5,9	6,6	7,49	7,41	34	33
2019	350	27	28,5	5,2	6,1	7,19	7,48	34	33
	400	28	29	5,7	7,3	7,48	7,44	34	33
	0	27	29	6,2	7,7	7,31	7,68	32	33
40 Fab	250	27	29	5,5	6,4	7,28	7,64	32	33
19 Feb	300	28	29	6,4	7,6	7,47	7,25	32	33
2019	350	27	28	6,3	6,9	7,44	7,37	32	33
	400	27,5	28	6,3	7,3	7,29	7,69	32	33
	0	28	29	5,6	6,7	7,29	7,38	33	34
00 Fab	250	27,5	29	6,3	6,8	7,48	7,24	33	34
20 Feb	300	28	29,5	5,9	6,9	7,23	7,73	33	34
2019	350	28	28	5,7	7,3	7,28	7,36	33	34
	400	28	29	5,8	7,4	7,32	7,49	33	34
	0	28	29	5,1	6,8	7,49	7,38	31	32
04 = 1	250	28	2901	6,1	7,2	7,46	7,63	31	32
21 Feb	300	27,5	29	6,4	6,9	7,51	7,39	31	32
2019	350	27,5	28	6,1	6,9	7,58	7,48	31	32
-	400	27	29	6,1	7,3	7,66	7,39	31	32
- 11	0	28	29	6,2	6,9	7,55	7,43	33	33
00 5 1	250	28,5	30	5,7	6,3	7,63	7,48	33	33
22 Feb	300	28	29	5,8	6,5	7,47	7,19	33	33
2019	350	28	30	5,9	6,8	7,56	7,57	33	33
	400	28	30	5,6	7,3	7,46	7,55	33	33
	0	27,5	29	5,7	6,8	7,57	7,49	34	32
	250	27,5	28	5,6	7,1	7,89	7,46	34	32
23 Feb	300	28	29	5,7	7,5	7,59	7,30	34	32
2019	350	28	29	6,2	7,1	7,66	7,94	34	32
•	400	27	28,5	6,4	6,9	7,64	7,19	34	32
	0	28	29	5,5	7,2	7,75	7,79	32	34
	250	28	28	5,5	6,6	7,54	7,48	32	34
24 Feb	300	28,5	29	6,4	7,4	7,48	7,29	32	34
2019	350	28	29	5,9	6,7	7,79	7,47	32	34
•	400	27,5	28	6,2	7,4	7,73	7,14	32	34
	0	27,5	28	5,9	6,3	7,54	7,56	33	34
	250	28	28,5	6,1	6,2	7,48	7,58	33	34
25 Feb	300	28	29	6,5	6,7	7,11	7,35	33	34
2019	350	28	29	5,8	5,8	7,37	7,68	33	34
ŀ	400	27,5	28	6,3	6,4	7,25	7,46	33	34
	0	27,5	28	5,5	5,1	7,11	7,42	33	32
	250	27,5	28	7,6	6,5	7,78	7,54	33	32
26 Feb	300	28	28,5	6,2	7,1	7,14	7,25	33	32
2019	350	27	28	6,1	6,5	7,49	7,69	33	32
	400	28	29	6,3	6,6	7,39	7,75	33	32
	700			0,0	0,0	7,00	1,10	_ 55	52

•	14. (Lanjutan Dois				Kualit	as Air			
Tanggal	D. salina	Suh	u (C)	DO (ppm)		Н	Sal	(ppt)
	(mg/kg)	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore
	0	28	28,5	6,3	6,6	7,49	7,71	32	31
07 5-6	250	27,5	29	6,3	6,9	7,29	7,60	32	31
27 Feb	300	28	29	7,4	7,6	7,54	7,18	32	31
2019	350	27,5	28	7,4	7,2	7,40	7,56	32	31
	400	28,5	29	6,6	6,5	7,26	7,49	32	31
	0	28	29	6,9	6,5	7,79	7,65	32	33
00 = 1	250	27	28,5	7,0	6,5	7,47	7,60	32	33
28 Feb	300	28	29	6,7	7,5	7,60	7,24	32	33
2019	350	28	29	7,6	5,7	7,28	7,56	32	33
	400	27,5	28	7,4	7,2	7,50	7,63	32	33
	0	27	30	6,4	7,8	7,47	7,67	34	33
	250	28	28,5	6,4	6,5	7,67	7,65	34	33
1 Mar	300	28,5	29	6,4	7,5	7,36	7,68	34	33
2019	350	28	29,5	7,1	7,0	7,42	7,44	34	33
	400	28	28,5	7,4	7,2	7,68	7,37	34	33
	0	27	29	5,6	5,6	7,36	7,31	33	33
	250	27,5	29	7,2	6,2	7,18	7,67	33	33
2 Mar	300	27	27,5	7,6	5,8	7,66	7,61	33	33
2019	350	28	29	5,7	4,9	7,52	7,47	33	33
	400	29	29	5,4	5,2	7,57	7,65	33	33
0	-	28	29	6,0	6,6	7,62	7,39	33	32
	250	28	28,5	6,4	6,7	7,37	7,27	33	32
3 Mar	300	27,5	29	6,2	6,7	7,25	7,57	33	32
2019	350	27	29	6,1	6,0	7,74	7,45	33	32
	400	27	29	6,4	6,7	7,44	7,29	33	32
	0	27,5	29	6,4	7,7	7,38	7,49	34	33
	250	28	30	7,6	7,9	7,58	7,58	34	33
4 Mar	300	27,5	28	8,1	7,7	7,12	7,26	34	33
2019	350	28	29,5	8,2	7,1	7,29	7,19	34	33
	400	27	29	7,3	8,1	7,56	7,38	34	33
	0	27	28	6,7	6,3	7,58	7,25	33	34
	250	27,5	29	6,5	6,3	7,65	7,29	33	34
5 Mar	300	28	29	6,5	6,7	7,47	7,58	33	34
2019	350	28	29	6,7	6,7	7,54	7,68	33	34
	400	28	29	6,6	6,8	7,68	7,14	33	34
	0	27	29	6,5	6,4	7,39	7,14	34	33
ŀ	250	28	29	6,4	6,3	7,12	7,38	34	33
6 Mar	300	27	29,5	6,4	6,8	7,12	7,31	34	33
2019	350	27	29	6,9	6,9	7,28	7,37	34	33
	400	28	29	7,1	7,0	7,64	7,25	34	33
	0	27,5	28	6,9	7,0	7,82	1,20	34	- 55
	250	28	28,5	7,1		7,57		34	
7 Mar	300	27	28	7,1		7,46		34	
2019	350	27	28	7,6				34	
			1			7,45		34	
	400	28	28	7,4		7,14		J4	

Lampiran 5. Data SR Ikan Kerapu Cantang Selama Penelitian

Tanggal	Dosis <i>D. salina</i> (mg/kg)	Jumlah Ikan Hidup (ekor)	Jumlah Ikan Mati (ekor)	SR (%)
	0	10	0	
0	250	10	0	
Senin, 25	300	10	0	
Feb 2019	350	10	0	
	400	10	0	
	0	10	0	
Solono 26	250	10	0	
Selasa, 26 Feb 2019	300	10	0	
Feb 2019	350	10	0	
	400	10	0	
	0	10	0	
Dahu 07 Fah	250	10	0	
Rabu, 27 Feb - 2019 -	300	- A 10 D	0	
2019	350	10	0	
	400	10	0	
	0	10	0	
Karaia 00	250	01 (10) 01	0	
Kamis, 28	300	~ 7 10 J~	0	
Feb 2019	350	10	0	
\\	400	10/10/19	0	
	0	10	0	//
l (. 4 \\	250	10	0	100%
Jumat, 1	300	10 净质	0	sebelum uji
Maret 2019	350	10	0	tantang
\\	350 10 0 400 10 0 0 10 0 250 10 0 300 10 0 350 10 0 400 10 0	0	//	
	0	10	0	//
Cabtu O	250	10	0	
Sabtu, 2 Maret 2019	300	10	0	
Maret 2019	350	10	0	
	400	10	0	
	0	10	0	
Minagu 2	250	10	0	
Minggu, 3 Maret 2019	300	10	0	
Maret 2019	350	10	0	
	400	10	0	
	0	10	0	
Conin 4	250	10	0	
Senin, 4 Maret 2019	300	10	0	
IVIAI GL ZU I 9	350	10	0	
	400	10	0	
	0	10	0	
Soloco E	250	10	0	
Selasa, 5 Maret 2019	300	10	0	
IVIAICLZUIY	350	10	0	
	400	10	0	

Tanggal	Dosis <i>D. salina</i> (mg/kg)	Jumlah Ikan Hidup (ekor)	Jumlah Ikan Mati (ekor)	SR (%)
	0	10	0	
Doby 6	250	10	0	
Rabu, 6 Maret 2019	300	10	0	
Maret 2019	350	10	0	
	400	10	0	
	0	10	0	
Komio 7	250	10	0	
Kamis, 7 Maret 2019	300	10	0	
Maret 2019	350	10	0	
	400	10	0	
	0	10	0	
lumat 0	250	10	0	100% setelah
Jumat, 8 Maret 2019	300	10	0	
Maret 2019	350	< 10 D	0	uji tantang
	400	10	0	
	0	10	0	
Sabtu, 9	250	10	0	
Maret 2019	300	0 10	0	
Maret 2019	350	~ T 10 //	0	
	400	10	0	
\\	0	4	6	40
Minagu 10	250	6	4	60
Minggu, 10 Maret 2019	300		3	70
IVIAI 61 2019	350	退 8 月夏	2	80
\\\	400	9	1	90
	0	3	1	30
Senin, 11	250	4	3	40
Maret 2019	300	4	3	40
IVIAI EL 2019	350	5	3	50
	400	6	3	60