

ANALISIS SEL MIKRONUKLEI IKAN KERAPU CANTANG (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) YANG TERINFEKSI VIRAL NERVOUS NECROSIS (VNN) DENGAN PEMBERIAN REKOMBINAN *Chlorella Vulgaris*

SKRIPSI

Oleh:

**AGI PANDIYA
NIM. 175080100111028**



**PROGRAM STUDI MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2021**



ANALISIS SEL MIKRONUKLEI IKAN KERAPU CANTANG (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) YANG TERINFEKSI VIRAL NERVOUS NECROSIS (VNN) DENGAN PEMBERIAN REKOMBINAN *Chlorella Vulgaris*

SKRIPSI

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

Oleh:

**AGI PANDIYA
NIM. 175080100111028**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**PROGRAM STUDI MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2021**

SKRIPSI

ANALISIS SEL MIKRONUKLEI IKAN KERAPU CANTANG (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) YANG TERINFEKSI VIRAL NERVOUS NECROSIS (VNN) DENGAN PEMBERIAN REKOMBINAN *Chlorella Vulgaris*

Oleh:

AGI PANDIYA

NIM. 175080100111028

Telah dipertahankan di depan penguji
pada tanggal 16 Juli 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,
Dosen Pembimbing 1



Ir. Kusriani, MP
NIP. 19560417 198403 2 001
Tanggal : 7/22/2021

Dosen Pembimbing 2



Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si
NIP . 19730404 200212 2 001
Tanggal : 7/22/2021

Mengetahui,
Ketua Jurusan
Manajemen Sumber Daya Perairan



Dr. Ir. M. Firdaus, MP.
NIP. 19680919 200501 1 001
Tanggal: 7/22/2021

PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Agi Pandiya

NIM : 175080100111028

Judul Skripsi : Analisis Sel Mikronuklei Ikan Kerapu Cantang

(*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) yang

Terinfeksi Viral Nervous Necrosis (VNN) dengan

Pemberian Rekombinan *Chlorella vulgaris*

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa penulisan skripsi ini merupakan bagian dari Payung Riset yang didanai oleh DRPM Deputi Bidang Penguatan Riset dan Inovasi Nasional dengan Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi (PTUPT) sesuai dengan Kontrak Penelitian Nomor: 197/SP2H/LT/DRPM/2021, tanggal 18 Maret 2021.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya dan dapat dipertanggungjawabkan.

Malang, 9 Juli 2021



Agi Pandiya

NIM. 175080100111028

IDENTITAS TIM PENGUJI

Judul : Analisis Sel Mikronuklei Ikan Kerapu Cantang
 (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) yang Terinfeksi
 Viral Nervous Necrosis (VNN) dengan Pemberian
 Rekombinan *chlorella vulgaris*

Nama Mahasiswa : Agi Pandiya

NIM : 175080100111028

Program Studi : Manajemen Sumber daya Perairan

PENGUJI PEMBIMBING:

Pembimbing 1 : Ir. Kusriani, MP

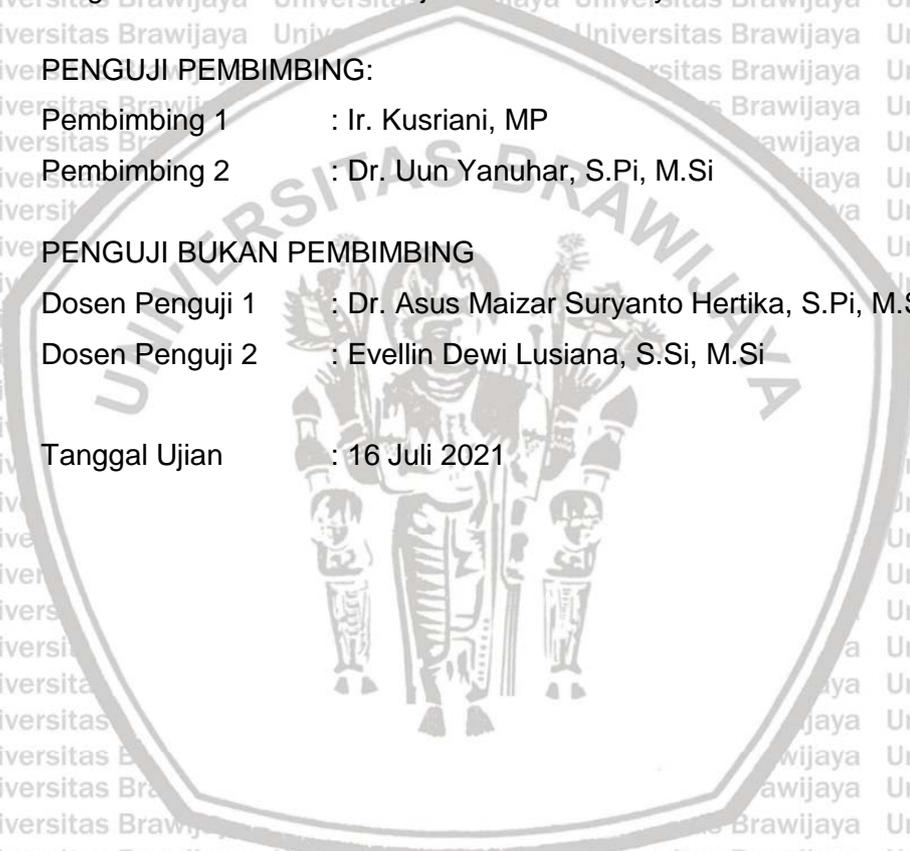
Pembimbing 2 : Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si

PENGUJI BUKAN PEMBIMBING

Dosen Penguji 1 : Dr. Asus Maizar Suryanto Hertika, S.Pi, M.Si

Dosen Penguji 2 : Evellin Dewi Lusiana, S.Si, M.Si

Tanggal Ujian : 16 Juli 2021



UCAPAN TERIMA KASIH

Disampaikan Terima Kasih Kepada :

Payung Riset Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi (PTUPT)

Yang Telah Membiayai :

Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat
Deputi Bidang Penguatan Riset dan Pengembangan
Kementerian Riset dan Teknologi/ Badan Riset dan Inovasi Nasional
Sesuai dengan Kontrak Penelitian
Nomor: 197/SP2H/LT/DPRM/2021, tanggal 18/03/2021

Dengan Judul :

“Analisis Sel Mikronuklei Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) yang Terinfeksi Viral Nervous Necrosis (VNN) dengan Pemberian Rekombinan *Chlorella vulgaris*”

Sebagai Ketua Peneliti Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.Si.

Anggota Tim Penelitian Sebagai Berikut:

- | | |
|-------------------------------------|---------------------------------|
| 1. Prof. Dr. Ir. Diana Arfiati, MS. | 11. Jihan Salsabila |
| 2. Dr. Ir. Muhammad Musa, MS. | 12. Dila Muna Firdaus |
| 3. Nico Caesar Rahman, S.Pi., M.P. | 13. Delima Ayu Faradila |
| 4. Nur Sakinah Junirahma, S.Pi. | 14. Suwantoro |
| 5. Saddam Langkung Djaduk, S.Pi. | 15. Muchamad Zam-zami |
| 6. Choirul Huda, S.Pi. | 16. Dela Novalinda Santika |
| 7. Agi Pandiya | 17. Hoki Agustinus Ong Wijaya |
| 8. Muhammad Alfian | 18. Achmad Firu Yuda Putra |
| 9. Nimas Alificynthia | 19. Tasya Billa Miftahul Jannah |
| 10. Ihda Zulvia Nur Mawaddah | 20. Raudatul Ibdiah |

Ketua Peneliti,



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

UCAPAN TERIMA KASIH

Proses skripsi ini sangat panjang dan penulis telah mendapat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Allah SWT Tuhan Yang Maha Esa karena berkat rahmat dan karunianya penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi ini.
2. Kedua orang tua serta saudara dan kerabat atas dukungan do'a yang tidak henti-hentinya.
3. Bangsa Indonesia yang telah memberikan kesempatan akses pendidikan perguruan tinggi untuk penulis
4. Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.Si. selaku Ketua Prodi Manajemen Sumberdaya Perairan sekaligus dosen pembimbing skripsi yang senantiasa memberi bimbingan dan dukungan dalam penulisan Laporan Skripsi.
5. Ibu Ir. Kusriani, MP Selaku dosen penasihat akademik dan dosen pembimbing 1 skripsi yang senantiasa memberi dukungan moril selama masa perkuliahan.
6. Dr Asus Maizar, S.Pi., MP selaku dosen penguji skripsi yang telah memberikan masukan dalam penulisan Laporan Skripsi
7. Evellin Dewi Lusiana, S.Si., M.Si. selaku dosen penguji skripsi yang telah memberikan masukan dalam penulisan Laporan Skripsi
8. Keluarga besar bapak Prof. Dr. Heru Suryanto, ST, MT. Yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian.
9. Nico Rahman Caesar, S. Pi., MP dan Nur Sakinah Junirahma, S.Pi yang telah membantu proses pembuatan laporan Skripsi
10. Khoirunnisa teman dekat penulis yang telah memberi semangat serta dukungan moril dalam menyelesaikan proses penyusunan skripsi
11. Keluarga besar Warlok Sibon, Keluarga besar Mbah Gudeng, Kos Koorop VIP, Devi Rahmania N W yang senantiasa membantu dan mendukung penulis, serta Teman – teman Manajemen Sumber daya Perairan angkatan 2017 yang telah berjuang bersama dalam menjalankan proses perkuliahan.

RINGKASAN

AGI PANDIYA. Analisis Sel Mikronuklei Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) yang Terinfeksi Viral Nervous Necrosis (VNN) dengan Pemberian Rekombinan *Chlorella vulgaris* (di bawah bimbingan **Ir. Kusriani, MP,** dan **Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si**)

Mikroalga merupakan mikroorganisme bersel tunggal yang keberadaannya melimpah di perairan Indonesia. *Chlorella vulgaris* merupakan salah satu mikroalga yang memiliki kandungan nutrisi cukup tinggi, salah satunya yakni PCP (*Peridinin Chlorophyll Protein*). PCP merupakan trimer protein yang dapat digunakan sebagai anti bakteri dan anti virus yang ramah lingkungan. Produksi vaksin rekombinan melalui *cloning* 310 bp menjadi salah satu upaya dalam penanganan serangan *Viral Nervous Necrosis* (VNN) pada usaha pemeliharaan ikan kerapu cantang. VNN merupakan virus berbahaya yang mampu menyebabkan kematian massal pada pemeliharaan ikan kerapu. Virus ini menyerang ikan kerapu mulai dari juvenil hingga kerapu dewasa. Hal ini menyebabkan rendahnya kelulushidupan ikan yang dipelihara. Adanya virus yang menjangkit ikan kerapu mengakibatkan terjadinya perubahan pada kualitas dan kuantitas sel mikronuklei pada ikan kerapu. Perubahan tersebut dapat digunakan untuk menentukan kondisi dari kesehatan ikan. Tujuan dari penelitian ini adalah menjelaskan status respon *in vivo* pemberian rekombinan *Chlorella vulgaris* terhadap sel makronuklei dan mikronuklei pada ikan kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) yang terinfeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN).

Waktu pelaksanaan penelitian ini dilakukan pada tanggal Maret–Juni 2021. Penelitian ini dilaksanakan di UD. Giso Bangkit Situbondo. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimen. Data primer terdiri dari data kualitatif dan kuantitatif. Desain penelitian ini meliputi 8 perlakuan yaitu, K- (A) : Ikan kerapu sehat tanpa penginfeksi VNN, K+ (B) : Ikan kerapu sehat dengan penginfeksi VNN, C1 (C) : Perlakuan ikan kerapu sehat + vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* 33 μ l, C2 (D) : Perlakuan ikan kerapu sehat + vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* 66 μ l, C3 (E) : Perlakuan ikan kerapu sehat + vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* 112 μ l, C4 (F) : Perlakuan ikan kerapu sehat diinfeksi VNN + vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* 33 μ l, C5 (G) : Perlakuan ikan kerapu sehat diinfeksi VNN + vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* 66 μ l, C6 (H) : Perlakuan ikan kerapu sehat diinfeksi VNN + vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* 112 μ l. Adapun dosis konsentrasi untuk *coating* vaksin rekombinan baik CFA maupun IFA adalah 8,5 μ l untuk 33 μ l, 16,5 μ l untuk 66 μ l, dan 28 μ l untuk 112 μ l. Pemberian *coating* vaksin rekombinan CFA diberikan pada hari ke-0 hingga hari ke-4 dan dilanjutkan dengan pemberian *coating* IFA pada hari ke-4 pasca CFA hingga hari ke-7.

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK). Hasil analisis sel makronuklei dan mikronuklei yang didapatkan dari berbagai perlakuan didapatkan yaitu, pada perlakuan K- (A) mendapatkan rata-rata nilai mikronukleinya 11,7/1000sel. Pada perlakuan K+ (B) rata-rata 16,5/1000sel untuk nilai mikronukleinya. Perlakuan C1 (C) mendapat nilai mikronuklei terbaik yaitu pemberian protein rekombinan dengan dosis 33 μ l yaitu 10,5/1000sel untuk mikronukleinya. Pada perlakuan infeksi virus VNN + protein rekombinan didapatkan hasil paling baik yaitu pada perlakuan C2 (D) dengan dosis

66 μ l yaitu 10,6/1000sel untuk mikronukleinya. Berdasarkan uji tukey 0,05 mampu mengurangi jumlah sel mikronuklei ikan kerapu cantang. Pengukuran kualitas air diperoleh hasil pengukuran suhu berkisar 30-31 °C, pH 7,50-7,58, *Dissolved oxygen* 17,2-19,2 ppm serta pengukuran salinitas yang berkisar antara 30 ppt. Kualitas air pada penelitian ini selalu terjaga dalam kondisi homogen.



SUMMARY

AGI PANDIYA. Analysis of Micronuclei Cells on Cantang Grouper (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) Infected with Viral Nervous Necrosis (VNN) with Recombinant *Chlorella vulgaris* (under the guidance of **Ir. Kusriani, MP**, dan **Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si**)

Microalgae are single-celled microorganisms that are exists in Indonesian waters. *Chlorella vulgaris* is microalgae with a fairly high nutritional content, which is PCP (*Peridinin Chlorophyll Protein*). PCP is a protein trimer that can be used as an environmentally friendly anti-bacterial and anti-virus. The production of recombinant vaccine through 310 bp cloning is one efforts in handling *Viral Nervous Necrosis* (VNN) attacks in cantang grouper hatchery. VNN is a dangerous virus that cause mass death in grouper rearing. This virus attacks grouper from juvenile until adult grouper. This causes the low survival of the kept fish. The virus presence that infects groupers causes changes in the micronucleus cells quality and quantity. This alterarion can be used to determine the fish's health. The purpose of this study was to explain the in vivo response status of recombinant *Chlorella vulgaris* to micronuclei cells in Cantang grouper (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) infected with Viral Nervous Necrosis (VNN).

This study was held out on March-June 2021. Carried out at UD. Giso Bangkit Situbondo. This research are used the experimental method. Primary data consists of qualitative and quantitative data. The design of this study included 8 treatments, K- (A) : Healthy grouper without VNN infection, K+ (B) : Healthy grouper with VNN infection, C1 (C) : Treatment of healthy grouper + *Chlorella vulgaris* recombinant vaccine 33 μ l, C2 (D) : Treatment of healthy grouper + recombinant vaccine of *Chlorella vulgaris* 66 μ l, C3 (E) : Treatment of healthy grouper + recombinant vaccine of *Chlorella vulgaris* 112 μ l, C4 (F) : Treatment of infected healthy grouper VNN + recombinant vaccine *Chlorella vulgaris* 33 μ l, C5 (G) : Treatment of healthy grouper infected with VNN + recombinant vaccine of *Chlorella vulgaris* 66 μ l, C6 (H): Treatment of healthy grouper infected with VNN + recombinant vaccine of *Chlorella vulgaris* 112 μ l. The concentration doses for recombinant vaccine coatings for both CFA and IFA were 8.5 μ l for 33 μ l, 16.5 μ l for 66 μ l, and 28 μ l for 112 μ l. The recombinant CFA vaccine coating was given on day 0 to day 4 and continued with IFA coating on day 4 after CFA until day 7.

The data analysis used in this study was a randomized block design (RAK).The analysis results of micronuclei cells from various treatments were obtained, in treatment K- (A) the average micronuclei value was 11.7/1000 cells. In the K+ (B) treatment, the average micronuclei cells values was 16.5/1000 cells. Treatment C1 (C) got the best micronuclei values, the provision of recombinant protein at 33 μ l dose, 10.5/1000cells for micronuclei. In the treatment of VNN virus infection + recombinant protein, the best results were obtained, in the C2 (D) treatment with 66 μ l dose, the results was 10.6/1000 cells for the micronucleus based on the Tukey 0.05 test, which was able to reduce the cells. Measurement of water quality obtained, which temperatures ranging from 30-31 $^{\circ}$ C, pH 7.50-7.58, Dissolved oxygen 17.2-19.2 ppm and salinity measurements ranging from 30 ppt. Water quality are maintained in a homogeneous condition.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat serta karunia-Nya kepada penulis sehingga penulis berhasil menyelesaikan laporan Skripsi yang berjudul **Analisis Sel Mikronuklei Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) yang Terinfeksi Viral Nervous Necrosis (VNN) dengan Pemberian Rekombinan *Chlorella vulgaris*** melalui program Payung Riset PTUPT. Segala kegiatan yang bersangkutan baik dalam pembuatan proposal laporan skripsi hingga pembuatan laporan skripsi seluruhnya dibimbing oleh Dr. Uun Yanuhar, S. Pi., M.Si.

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Ir. Kusriani, MP. dan Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si. selaku dosen Skripsi dan semua pihak yang telah mendukung proses penyusunan Laporan Skripsi ini. Penulis menyadari bahwa laporan Usulan Skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran dari semua pihak yang bersifat membangun agar tulisan ini dapat memberikan informasi yang bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan.

Malang, Maret 2021



Aqi Pandiya
NIM. 17508010011028

DAFTAR ISI

Halaman

PERNYATAAN ORISINALITAS.....	i
IDENTITAS TIM PENGUJI.....	ii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	iii
RINGKASAN.....	v
SUMMARY.....	vii
KATA PENGANTAR.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat.....	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Mikronuklei.....	4
2.2 Biologi Ikan Kerapu Cantang (<i>Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus</i>).....	5
2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	5
2.3.2 Habitat dan Penyebaran.....	7
2.3.3 Pakan dan Kebiasaan Makan Ikan Kerapu Cantang.....	8
2.4 <i>Viral Nervous Necrosis</i> (VNN).....	8
2.4.1 Gejala Klinis.....	10
2.4.2 Mekanisme Penularan VNN.....	11
2.4.3 Deteksi VNN.....	11
2.4.4 Pencegahan.....	13
2.5 Vaksin Rekombinan.....	14
2.6 Vaksin Rekombinan <i>Chlorella Vulgaris</i>	15
2.7 Produksi Antibodi IgM terhadap Perlakuan Pemberian Vaksin Rekombinan.....	16
2.8 Parameter Kualitas Air.....	17
2.8.1 Suhu.....	17
2.8.2 pH.....	18
2.8.3 Dissolved Oxygen (DO).....	18
2.8.4 Salinitas.....	19

BAB III. METODE PENELITIAN.....	21
3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan.....	21
3.2 Metode Penelitian.....	21
3.2.1 Data Primer.....	21
3.2.2 Data Sekunder.....	23
3.3 Prosedur Penelitian.....	23
3.3.1 Persiapan Alat dan Bahan.....	23
3.3.2 Sterilisasi Alat dan Bahan.....	24
3.3.3 Desain Penelitian.....	24
3.5.4 Kultur Mikroalga <i>Chlorella vulgaris</i>	26
3.5.5 Produksi Vaksin Rekombinan <i>Chlorella vulgaris</i>	27
3.5.4 Aklimatisasi Ikan Kerapu Cantang (<i>Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus</i>).....	27
3.5.5 Uji Tantang VNN pada Ikan Kerapu Cantang (<i>Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus</i>).....	28
3.5.6 Uji <i>In-Vivo</i> Vaksin Rekombinan pada Ikan Kerapu Cantang (<i>Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus</i>).....	28
3.5.7 Pengukuran Kualitas Air.....	29
3.5.8 Analisis Sel Darah Ikan Kerapu Cantang (<i>Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus</i>).....	31
3.5 Analisis Data.....	32
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	33
4.1 Keadaan Umum Lokasi Penelitian.....	33
4.1 Aklimatisasi Ikan Kerapu Cantang.....	33
4.3 Analisis Sel Mikronuklei Ikan Kerapu Cantang.....	36
4.4 Analisis Data.....	38
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	42
5.1 Kesimpulan.....	42
5.2 Saran.....	42
DAFTAR PUSTAKA.....	43
LAMPIRAN.....	49

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasl Pengamatan Tingkah Laku Hewan Uji.....	35
2. Test of Between-Subjects Effects (ANOVA).....	38
3. Hasil Uji Tukey HSD Mikronuklei.....	39



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Mikronuklei Ikan Kerapu Cantang.(Dokumentasi PTUPT, 2021).....	5
2. Ikan Kerapu Cantang (Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus) (Dokumentasi PTUPT, 2021).....	6
3. a). Panjang Ikan Kerapu 6cm, b). Berat Ikan Kerapu 4gr. (Dokumentasi PTUPT, 2021).....	7
4. Skema Betanodavirus. (Bandin dan Souto, 2019).....	10
5. Desain Perlakuan. (Dokumentasi PTUPT,2021).....	26
6. Kultur mikroalga Chlorella Vulgaris	26
7. Ikan Kerapu Cantang (Dokumentasi PTUPT, 2021).....	28
8. Peta Lokasi Penelitian. (Dokumentasi PTUPT, 2021)	33
9. Aklimatisasi Ikan Kerapu. (Dokumentasi PTUPT, 2021).....	34
10. Nilai Hasil Pengamatan Mikronuklei.....	37
11. Hasil Uji Tukey dengan Boxplot	40
12. Hasil Uji Tukey dengan Boxplot.....	41



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alat dan Bahan Penelitian.....	49
2. Dokumentasi Penelitian	50
3. Hasil Pengamatan Sel Makronuklei dan Mikronuklei.....	52



BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Salah satu produk unggulan pasar ekspor bidang perikanan Indonesia adalah ikan kerapu, permintaan yang meningkat akan kebutuhan ikan kerapu membuat nilai ekonomisnya menjadi tinggi. Ada beberapa jenis ikan kerapu salah satunya adalah ikan kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*).

Akan tetapi permasalahan yang dihadapi oleh para pelaku budidaya yaitu rendahnya angka lulus hidup ikan tersebut. Faktor yang menyebabkan rendahnya angka lulus hidup dari ikan kerapu adalah kualitas air yang tidak mendukung sehingga mempengaruhi proses pertumbuhan ikan dikarenakan stress. Masuknya infeksi bakteri, virus, dan penyakit lainnya juga bisa disebabkan karena kurang terjaganya kualitas air media pemeliharaan ikan kerapu. (Noor *et al.*, 2018).

Salah satu agen patogenik yang dapat menyebabkan kematian dengan skala jumlah yang besar adalah virus *Viral Nervous Necrosis* (VNN) bahkan hingga 100% tingkat mortalitas. Pada larva dan juvenile sangat rentan untuk terinfeksi virus tersebut. Masuknya infeksi virus VNN membuat sistem saraf pada ikan menjadi lemah, sehingga saraf kontrol dari ikan tidak berfungsi dengan baik. Hal tersebut akan mempengaruhi metabolisme hingga sistem gerak ikan dan akhirnya menyebabkan kematian (Yanuhar, 2011). Gejala yang ditunjukkan dari serangan virus VNN adalah berubahnya arah gerak renang ikan, umumnya ikan akan berenang mengambang pada permukaan air dengan perutnya berada diatas dan arah berenang yang berputar-putar, warna ikan juga akan menjadi lebih gelap dibanding ikan lainnya, hal ini dikarenakan organ syaraf mata dan otak ikan diserang oleh VNN (Sudaryatma *et al.*, 2012). Diagnosis terhadap keberadaan VNN yang menyerang ikan kerapu dapat diamati dari tingkah laku yang

ditunjukkan ikan kerapu. Perlu dilakukan analisis atau pengamatan lebih lanjut untuk mengetahui masuknya infeksi virus, Salah satunya adalah analisis sel darah ikan. Analisis sel mikronuklei ikan kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) dilakukan untuk mengetahui adanya virus VNN yang menyerang ikan kerapu.

Penanggulangan virus VNN dengan bahan alami akan lebih efektif daripada penggunaan antibiotik, karena dikhawatirkan akan mengandung residu antibiotik tertentu. Salah satu penggunaan bahan alami adalah dengan senyawa bioaktif dari mikroalga *Chlorella vulgaris*. Kandungan yang terdapat pada mikroalga *Chlorella vulgaris* antara lain Klorofil, beta karoten, mineral, karbohidrat, lemak, vitamin, dan tinggi akan protein. 27% protein, 15,4% selulosa, , 9,2% lemak, 31% hemiselulsa, 3,3% glukosamin terdapat dalam mikroalga *Chlorella vulgaris* yang juga mengandung kapur serta besi. β - karoten, lutein, cantaxanthin, astaxanthin, violaxantin, pheophytin- α , chlorophyll- α , serta chlorophyll β merupakan pigmen yang terdapat pada *Chlorella vulgaris* (Dewi, 2017).

Mikroalga *C. vulgaris* memiliki kandungan nutrisi yang bermanfaat, Fragmen Pigmen Protein (FPP) yang didapat melalui proses isolasi protein dari *Chlorella vulgaris* adalah salah satunya. Fragmen protein tersebut merupakan Peridinin Chlorophyl Protein (PCP) dimana pada proses fotosintesis pigmen ini memiliki fungsi untuk memanen cahaya (Habshi, 2016). Pigmen PCP terdiri atas empat molekul peridinin dan satu molekul klorofil. Pada PCP peridinin adalah bagian utamanya. Sintesis dari PCP akan diuji untuk diketahui bagaimana kemampuan yang dapat diberikan untuk induksi sistem kekebalan tubuh dari ikan kerapu cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) (Yanuhar, 2015).

Untuk mencegah terjadinya kematian pada ikan kerapu budidaya yang diakibatkan serangan virus VNN, diperlukan pengendalian kualitas air yang tepat meliputi beberapa parameter yaitu, fisika, kimia dan biologi. Hal ini juga dilakukan

sebagai upaya menunjang keberlangsungan hidup ikan. Protein rekombinan yang diproduksi dari isolasi DNA mikroalga *Chlorella vulgaris* menjadi alternatif untuk mengatasi serangan virus VNN pada ikan kerapu. Pemberian protein rekombinan secara *in-vivo* di harapkan menjadi solusi guna meningkatkan kelangsungan hidup dan pertumbuhan ikan Kerapu.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang pada uraian diatas, didapatkan rumusan masalah yakni bagaimana status respon *in vivo* pemberian rekombinan *Chlorella vulgaris* terhadap sel mikronuklei pada ikan kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) yang terinfeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN) terhadap sel makronuklei dan mikronukleinya?.

1.3 Tujuan

Berdasarkan rumusan masalah pada uraian diatas, tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis status respon *in vivo* pemberian rekombinan *Chlorella vulgaris* terhadap sel mikronuklei pada ikan kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) yang terinfeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN).

1.4 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini diharapkan dapat menanggulangi permasalahan pada ikan kerapu cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) yang terinfeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN) yang diberikan rekombinan *Chlorella vulgaris* dan menjadi referensi bagi penelitian lebih lanjut.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

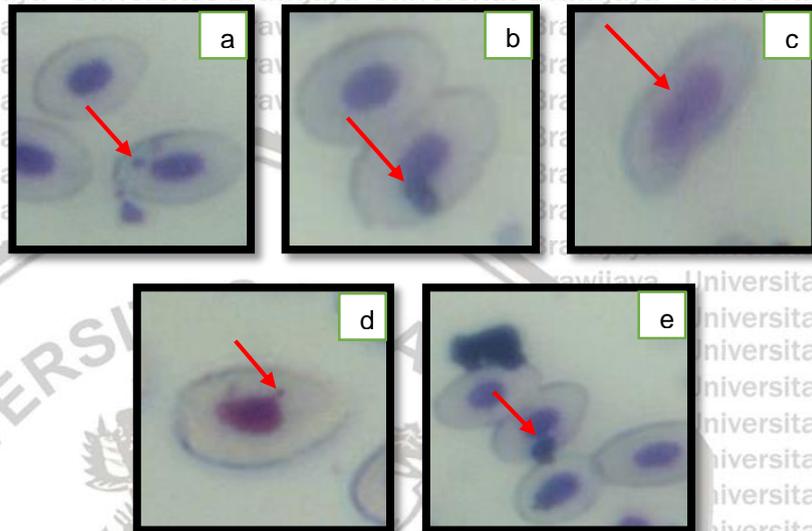
2.1 Mikronuklei

Mikronukleus adalah inti kecil yang terdapat pada nucleus. Mikronuklei terdapat pada sitoplasma. Pada umumnya individu memiliki frekuensi mikronuklei sebanyak $4,4 \pm 2,6$ untuk 500 cell binucleat. Mikronuklei dapat dijadikan indikator penyerapan dosis karena memiliki hubungan dengan aberasi kromosom. Pada proses aberasi kromosom terdapat korelasi positif dengan paparan atau dosis yang masuk ke dalam tubuh. Pengamatan sel mikronuklei dapat dijadikan metode alternative untuk memantau kerusakan kromosom pada individu atau organisme (Lusiyanti *et al.*, 2014).

Mikronukleus terbentuk oleh fragmen kromosom asentrik. Pada saat terjadi proses anaphase dimana kromatid sentrik dan adanya fragmen kromosom yang tertinggal pada saat terjadinya pergerakan unsur sentries menuju kutub sel, maka mikronuklei akan terbentuk pada sitoplasma. Pada ikan, mikronuklei yang dimiliki akan lebih banyak daripada mamalia. Hal ini disebabkan karena ikan memiliki kromosom yang lebih kecil dibanding kromosom yang dimiliki mamalia. Dalam uji mikronukleus, sel berinti mikro frekuensi dan frekuensi sel yang menyimpang diambil sebagai parameter untuk penilaian genotoksik dan sitotoksik pada perairan (Mehra *and* Chadha, 2020).

Mikronukleus dan kelainan inti lainnya pada eritrosit banyak digunakan sebagai indikator paparan kontaminan genotoksik dan mutagenik pada spesies ikan. Kelainan pada inti sel terbentuk selama fase proliferasi siklus sel dalam berbagai jenis sel. Sebuah mikronukleus terbentuk selama telofase pembelahan sel ketika baik secara keseluruhan atau kromosom yang terfragmentasi menjadi terenkapsulasi dalam amplop nukleus dan sifat-sifat interfase pada inti ukurannya

berkurang secara signifikan. Ini dapat terjadi karena klastogenisitas (pemutusan kromosom) atau aneugenisitas (spindel mitosis) yang tidak berfungsi dengan baik akibat adanya paparan kontaminan genotoksik (Braham *et al.*, 2017). Pada penelitian ini didapatkan juga beberapa kelainan pada nukleus seperti Lobed Nuklei, Notched Nuklei, Blebbed Nuklei, Binukleat nuklei dan Mikronuklei.



keterangan: kelainan nukleus pada sel ikan kerapu cantang a.) Mikronuklei, b.) Notched Nuklei, c.) Binukleat Nuklei, d.)Blebbed Nuklei, e.) Lobed Nuklei yang diamati dengan mikroskop perbesaran 400x

Gambar 1. Mikronuklei Ikan Kerapu Cantang (Dokumentasi PTUPT, 2021).

2.2 Biologi Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*)

2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi dari ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) menurut Soemarjati *et al.*, (2015) adalah :

- Filum : Chordata
- Subfilum : Vertebrata
- Kelas : Pisces
- Ordo : Perciformes
- Famili : Serranidae
- Genus : Cromileptes
- Spesies : *Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*

Bentuk visual dari Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) dapat dilihat pada gambar 2.



Keterangan: Ikan kerapu dengan panjang 8 cm.

Gambar 2. Ikan Kerapu Cantang (Dokumentasi PTUPT, 2021)

Morfologi Ikan kerapu Cantang adalah hasil dari kombinasi ikan kerapu macan yang disandingkan dengan ikan kerapu kertang. Menurut Kordi (2010), silindris tubuhnya lebih tinggi, kulitnya ditutupi dengan bintik-bintik gelap yang lebat, dan siripnya menambah warna, sedangkan sirip lainnya memiliki tepi berwarna coklat kemerahan. Kerapu macan memiliki bentuk kerapu macan silindris memanjang, kulitnya ditutupi bintik hitam pekat, dan sirip menambah warna, sedangkan sirip lainnya memiliki tepi berwarna coklat kemerahan. Pada garis samping terdapat 110-114 sisik yang pipih, namun ada juga beberapa yang agak bulat.

Mulut kerapu cantang lebih besar dan miring ke atas, dengan dua baris gigi di rahang bawah dan atas, dengan ujung yang tajam dan kuat. Gigi besar, di sisi lain, adalah ujung luar dari depan gigi baris luar. Sisik logam kecil dan garis seperti macan tutul dapat ditemukan di tubuh kerapu cantang (Putri *et al.*, 2013).



Keterangan: Pengukuran panjang dan berat ikan kerapu
Gambar 3. a). Panjang Ikan Kerapu 6cm, b). Berat Ikan Kerapu 4gr.
(Dokumentasi PTUPT, 2021).

2.3.2 Habitat dan Penyebaran

Ikan kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) dikenal juga dengan *Coral reef fishes* atau yang lebih populer dengan sebutan *groupers* lebih cenderung memilih dasar perairan dengan tekstur lumpur dan berpasir sebagai tempat tinggalnya. Ikan kerapu juga tidak jarang ditemukan di perairan dengan terumbu karang pada kedalaman sampai 60 meter. Selama siklus hidupnya, ikan kerapu muda umumnya ditemukan pada perairan pinggir pantai berkarang yang memiliki kedalaman hingga 3 meter. Ketika ikan kerapu muda beranjak dewasa akan melakukan perpindahan wilayah atau migrasi menuju perairan dengan kedalaman hingga 40 meter. Larva Ikan kerapu cantang juga ditemui pada perairan dengan pasir berkarang yang terdapat padang lamun dan lebih aktif di malam hari, hal ini dikarenakan ikan kerapu memiliki sifat *nocturnal* atau lebih aktif pada waktu malam hari untuk mencari makan dan ketika siang hari ikan ini akan bersembunyi di terumbu karang (Wiyatno *et al.*, 2012). Parameter ekologis yang cocok untuk pertumbuhan ikan kerapu cantang yaitu dengan kisaran suhu 24-31°C, salinitas antara 30-33 ppt kandungan DO lebih dari 3,5 ppm dan pH 7,8-8,0 (Amiruddin *et al.*, 2012).

Persebaran ikan kerapu cantang mulai dari perairan lepas pantai tropis dan sub tropis. Penyebaran ikan Kerapu Cantang ini mulai dari Pasifik Barat di mulai dari selatan Jepang ke pulau Guam, Selatan Australia dan Kaledonia Baru. Di Indonesia ikan kerapu banyak di temukan di pulau Jawa, Sumatra, Sulawesi dan

Ambon. Di pulau Jawa sendiri ikan kerapu banyak di temukan di daerah Situbondo. Salah satu Indikator adanya kerapu Cantang adalah perairan karang yang terhampar yang cukup luas di Indonesia sehingga menjadi peluang besar sumberdaya ikan (Eshmat dan Manan, 2013).

2.3.3 Pakan dan Kebiasaan Makan Ikan Kerapu Cantang

Dikarenakan sifat ikan kerapu yang *nocturnal* maka ikan kerapu akan lebih aktif untuk mencari makan pada malam hari. Ikan Kerapu Cantang memiliki sifat yang karnivor. Ikan kerapu cantang dewasa akan memburu dan memangsa ikan – ikan kecil, udang dan kepiting. Larva Kerapu Cantang adalah pemakan zooplankton, crustacea, molusca, rotifer, copepoda. Ikan Kerapu Cantang biasanya mencari makan dengan cara menunggu dan menyergap mangsa dari tempat persembunyiannya. Ikan Kerapu Cantang bersifat kanibal dan cenderung teritorial. Sifat ini berbeda dengan ikan kerapu lainnya karena lebar bukaan mulut yang lebih kecil (Suyano dan Marmi, 2018).

Ikan Kerapu Cantang lebih banyak menggunakan indra penciuman serta perasa dari pada penglihatannya untuk mencari makan. Ikan kerapu Cantang mempunyai kebiasaan makan yang aktif pada malam hari namun tidak jarang juga aktif pada siang hari. Pakan yang paling di sukai yaitu jenis crustacea (rebon, dogol dan krosok) selain itu yaitu jenis ikan- ikan seperti teri, tembang dan belanak. Ikan kerapu adalah ikan predator dimana mangsanya adalah udang, crustacea, cumi, sotong, dan ikan (Sasongko *et al.*, 2019).

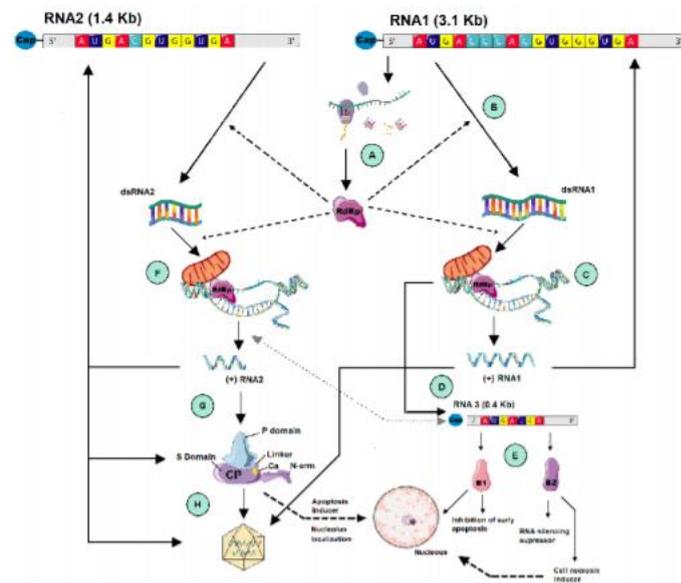
2.4 Viral Nerosus Necrosis (VNN)

Viral Nerosus Necrosis (VNN) seringkali menyerang organisme akuatik perairan laut. Viral Nerosus Necrosis juga mempunyai nama lain yaitu *Viral Encephalopathy and Retinopathy, Paralytic Syndrome, Spinning Grouper Diseases, Piscine Neurophaty* atau *Fish Encephalitis* (Kurniawan, 2012).

Klasifikasi dari *Viral Nervous Necrosis* (VNN) Menurut Chi, et al. (2001), yaitu sebagai berikut:

Kingdom : Virus
Divisio : RNA Virus
Class : Single standard (+) RNA Virus
Family : Nodaviridae
Genus : Betanodavirus
Spesies : *Viral Nervous Necrosis* (VNN)

VNN termasuk keluarga *Nodaviridae* yang menginfeksi ikan, virus ini termasuk dalam genus *Betanodavirus*. Genus *Betanodavirus* adalah sekelompok virus tidak beramplop yang berukuran kecil yaitu 25- 35 nm. Virus ini memiliki bentuk bulat dengan keseluruhan informasi genetik yang terdiri atas dua molekul RNA. RNA yang pertama memiliki ukuran yang besar (110 kDa) yang menyandikan RNA-dependent dengan RNA *polymerase/RdRp*, dan RNA kedua memiliki ukuran 40-42 kDa yang berfungsi dalam menyandikan coat protein (Yanuhar, 2011). Genus *Betanodavirus* dapat menginfeksi ikan budidaya baik laut maupun tawar, di bagi menjadi empat spesies yaitu *Vizbarfin Flounder Nervous Necrosis Virus* (RGNNV), *Tiger Puffer Nervous Necrosis Virus* dan *Striped Jack Nervous Necrosis* serta yang paling umum menginfeksi ikan budidaya yaitu RGNNV (Andriyani, 2012). Skema repliasi betanodavirus dapat dilihat pada gambar 4.



Keterangan: Gambaran umum skema siklus replikasi betanodavirus
Gambar 4. Skema *Betanodavirus*. (Bandin dan Souto, 2019).

2.4.1 Gejala Klinis

Betanodavirus adalah salah satu dari dua *genera* yang membentuk famili *Nodaviridae* yang menjadi agen etilogis VNN. Adanya infeksi virus ini dapat dilihat dari vakuolasi nekrosis dan sel sel saraf pusat pada otak, serta bagian retina dan juga sumsum tulang belakang yang mampu menyebabkan tingkat mortalitas hingga 100% pada stadia larva dan ikan muda. Serangan infeksi penyakit ini menyebabkan kerugian yang cukup signifikan pada ikan kerapu cantang dewasa (Crane dan Hyatt, 2011).

Infeksi virus VNN menimbulkan gejala diantaranya adalah berkurangnya daya tarik ikan terhadap pakan, ikan juga menunjukkan tingkah laku berenang dengan tidak memiliki arah jelas dan cenderung berenang secara memutar, pergerakan ikan cenderung tidak aktif dan lebih sering berada didasar media pemeliharaan sehingga akan terlihat layaknya ikan yang telah mati. Pembekakan gelembung renang juga terjadi pada benih dan induk yang terinfeksi, tubuh ikan akan memiliki warna lebih gelap. Terjadinya gangguan pada saraf yang memiliki hubungan dengan vakuolisasi atau kerusakan hepat pada retina dan sistem pusat

saraf ditunjukkan pada ikan yang terinfeksi VNN (Sari *et al.*,2013). Gejala abnormal juga dialami ikan yang terinfeksi, hal ini ditandai dengan ikan terlihat mengalami kendala dalam mengontrol keseimbangan statis normal dan dinamis, laju dan pergerakan arah renang serta kontrol inflamasi dari gelembung renang yang dimiliki (Zorriehzahra *et al.*,2016).

2.4.2 Mekanisme Penularan VNN

Mekanisme infeksi VNN tidak hanya menyerang jenis spesies ikan air laut, hal ini juga terjadi pada ikan air tawar. Penularan VNN akan semakin mudah jika sistem imun pada ikan menurun karena tekanan lingkungan atau keadaan ikan yang stress. Ikan yang berumur tua akan lebih rentan terkena penyakit ini. VNN dapat menyebar dengan mudah selama media yang di gunakan dalam kegiatan budidaya terkontaminasi (Yenong, 2010). Penularan *Viral Nervous Necrosis* dapat terjadi dengan pola vertikal dan horizontal. Penularan secara vertikal yaitu VNN akan tersebar melalui telur yang di buahi induk. VNN akan terdeteksi pada organ gonad, usus, lambung dan ginjal. Sedangkan pada pola transmisi VNN secara horizontal yaitu terjadi pada lingkungan perairan seperti adanya kontak antara ikan yang sakit dengan ikan yang sehat terjadi kurang lebih selama 4 hari dan alat- alat yang di pakai dalam kegiatan budidaya yang terkontaminasi VNN. Lingkungan serta kualitas air yang buruk dapat menjadi pemicu penularan dari serangan virus VNN (Kurniawan, 2014).

2.4.3 Deteksi VNN

Pada penelitian ini untuk mendeteksi virus VNN dapat dilakukan dengan cara yaitu :

1. Ekstraksi RNA (VNN)

Pada penelitian ini ekstraksi RNA digunakan untuk mendapatkan virus RNA VNN dengan organ target ikan kerapu cantang. Organ target distribusi dari virus

ini pada benih ikan kerapu cantang yaitu organ otak. Tahapan berdasarkan (SNI 7546.1 : 2015) yaitu sebagai berikut :

1. Mengisolasi organ target sebanyak 20-50 mg ke dalam mikrotube berukuran 1,5 ml.
2. Menambahkan 500 µl kit RNA bentuk larutan extraction solution (TRIzol®) ke dalam mikrotube, kemudian menggerus dengan pastel penggerus sampai halus, selanjutnya di diamkan pada suhu 25-30 0C selama 5 menit.
3. Menambahkan 100 µl kloroform dan vortex 15 detik kemudian menginkubasi pada suhu ruang 2-3 menit.
4. Mensentrifugasi pada kecepatan 12000 x g (12000 rpm r = 6 cm) selama 15 menit pada 4°C.
5. Memindahkan 200 µl supernatan ke dalam mikrotube baru dan tambahkan 200 µl isopropanol, selanjutnya vortex selama 15 detik.
6. Mensentrifugasi pada kecepatan 12000 x g selama 10 menit pada 4°C.
7. Kemudian supernatan diambil dan segera digunakan maka disimpan pada deep freezer suhu -20°C, apabila digunakan dalam jangka waktu yang lama, maka disimpan pada suhu -80°C.

2. Amplifikasi

1. Setelah ekstraksi RNA, selanjutnya proses amplifikasi dengan urutan proses nested RT- PCR menggunakan Go Taq® Green Master Mix (promega) dengan primer yaitu :

F2 : 5'-CGTGTCAGTCATGTGTCGCT-3'

R3 : 5'-CGAGTCAACACGGGTGAAGA-3'

NF2 : 5'-GTTCCCTGTACAACGATTCC-3'

NR3 : 5'-GGATTTGACGGGGCTGCTA-3'

Pasangan primer spesifik VNN antara F2 dan R3 serta NF2 dan NR3 terdeteksi pada 294 bp.

2.4.4 Pencegahan

Salah satu pendekatan alternatif adalah pencegahan infeksi virus VNN, yang dimulai dengan inventarisasi penyakit dan distribusi vaksinasi. Karena dapat menimbulkan residu setelah mengkonsumsi ikan, pemanfaatan rekombinan vaksin

dalam budidaya ikan memiliki kelebihan dan kekurangan. Pemilihan rekombinan, di sisi lain, merupakan strategi alternatif karena vaksin inaktif yang dihasilkan dari perbanyakan virus in vitro sulit diproduksi, tidak stabil, dan perawatannya mahal.

Gen virus dimasukkan ke dalam vektor yang diproduksi dalam sel bakteri yang kompeten untuk menghasilkan vaksin rekombinan. Setelah ditantang dengan virus VNN, vaksinasi rekombinan VNN terbukti sangat berhasil dalam meningkatkan kekebalan larva kerapu. Isolat vaksin kapsid protein VNN rekombinan asal Indonesia juga telah dipelajari dan dilakukan pengembangan di laboratorium, dan mampu mencegah tingkat kematian massal pada ikan kerapu saat terinfeksi virus VNN (Mahardika *et al.*, 2018).

Imunostimulan digunakan untuk meningkatkan respon imun pada ikan kerapu untuk mencegah infeksi VNN di pembenihan. Imunostimulan sangat dianjurkan karena ramah lingkungan, dibandingkan dengan pestisida yang dapat membahayakan lingkungan perairan dan menyebabkan penyakit menjadi resisten.

Vitamin, probiotik, zat herbal, dan imunisasi semuanya dapat digunakan untuk meningkatkan kekebalan tubuh dan mencegah VNN (Yanuhar *et al.*, 2012).

Kemampuan melakukan manajemen pemeliharaan yang ketat di lokasi budidaya benih merupakan salah satu cara pengendalian untuk menghindari infeksi VNN pada ikan budidaya, penerapan vaksinasi bertujuan menguatkan antibodi dan

mengurangi stres ikan kerapu selama masa pemeliharaan, penggunaan benih dan induk dengan sertifikat ikan yang berasal dari tempat penangkaran benih dengan sertifikasi CPIB, penggunaan benih dan induk dengan sertifikat yang berasal dari *Hatchery* pembibitan dengan sertifikasi CPIB (Rahmaningsih, 2018).

2.5 Vaksin Rekombinan

Vaksin rekombinan dibuat menggunakan teknologi DNA rekombinan, yang pada dasarnya adalah kloning gen yang kemudian dirancang untuk menghasilkan produk protein yang dibutuhkan. Kloning gen memerlukan penggunaan sumber DNA, vektor, dan sel inang. Kloning gen adalah proses menggunakan vektor untuk mengirimkan DNA atau gen asing ke dalam sel inang. Kloning gen ini dicapai sehingga gen identik dapat direproduksi. Kloning gen adalah proses memasukkan gen yang ingin direplikasi ke dalam vektor untuk membuat DNA rekombinan yang dapat melakukan replikasi di sel inang. Pengklonaan gen meliputi empat tahap utama, yaitu konstruksi DNA (*Deoxyribonucleic acid*) rekombinan, transformasi, seleksi sel klon, dan pengisolasian klon DNA rekombinan yang membawa gen yang diinginkan (Susmiarsih, 2018).

DNA rekombinan terdiri dari DNA vektor, yang merupakan molekul DNA yang menggandakan diri, dan DNA asing, yang biasanya merupakan gen dari organisme hidup. Vektor berperan sebagai penyalur DNA asing dari satu makhluk untuk ditransfer ke makhluk lain. Setidaknya dua jenis enzim digunakan untuk membuat DNA rekombinan, termasuk enzim endonuklease, yang bertindak sebagai pemotong molekul DNA. Enzim ini biasa disebut sebagai enzim restriksi karena fungsinya. Enzim ligase, misalnya, bekerja untuk menggabungkan molekul DNA yang telah dipotong dan dibagi dengan molekul lain. (Gusrina, 2018).

2.6 Vaksin Rekombinan *Chlorella Vulgaris*

Menurut Yanuhar (2017), *Chlorella vulgaris* merupakan mikroalga bersel tunggal (uniseluler), namun dapat juga ditemukan berkoloni atau berkelompok.

Chlorella vulgaris memiliki bentuk elips berdiameter 2-12 mikron. *Chlorella vulgaris* memiliki warna hijau karena terkandung banyak klorofil a dan b, serta karoten dan xantofil di dalam selnya. Karena sel *Chlorella vulgaris* tidak memiliki flagela dan memiliki protoplasma berbentuk cangkir, mereka tidak dapat bergerak secara aktif.

Menurut Yanuhar *et al.*, (2019) mikroalga *Chlorella vulgaris* memiliki

Klasifikasi sebagai berikut:

Kingdom : Protista
Phylum : Chlorophyta
Sub Phylum : Chlorophyceae
Ordo : Chlorococcales
Family : Oocystaceae
Genus : *Chlorella*
Spesies : *C.vulgaris*

Nutrisi lain, seperti PCP (Peridinin Chlorophyll Protein), ditemukan dalam mikroalga *Chlorella vulgaris*. PCP adalah pemangkas protein dengan sifat antibakteri dan antivirus. PCP dimanfaatkan sebagai komponen untuk meningkatkan produksi antibodi yang dimiliki ikan (Yanuhar *et al.*, 2015)

Habitat dari *Chlorella vulgaris* sendiri ada dua yaitu perairan tawar dan perairan laut. *C.vulgaris* air tawar hidup pada salinitas 5 ppt dan air laut pada salinitas 35 – 40 ppt. *Chlorella vulgaris* dapat tumbuh di berbagai media yang kaya nutrisi seperti nitrogen, fosfor, kalium, dan mikronutrien lainnya. Pertumbuhan cepat dapat di lakukan bahkan sampai suhu 40 °C, tetapi kisaran suhu 25-30°C merupakan suhu optimal bagi pertumbuhan alga (Yanuhar, 2017).

Chlorella vulgaris tumbuh subur pada media yang kaya nutrisi. Nutrisi yang dibutuhkan Kandungan nutrisi *Chlorella vulgaris* diantaranya, Karbon (C), nitrogen (N), fosfor (P), belerang (S), natrium (Na), magnesium (Mg), dan kalsium (Ca) merupakan unsur hara yang dibutuhkan *Chlorella vulgaris* dalam jumlah yang cukup banyak. Unsur hara yang dibutuhkan dalam jumlah relatif sedikit adalah besi (Fe), tembaga (Cu), mangan (Mn), seng (Zn), silikon (Si), boron (B), molibdenum (Mo), vanadium (V) dan kobalt (Co). *C. vulgaris* tumbuh optimal pada suhu 25° C, pH 7- 8, dan salinitas 25 ppt. *Chlorella vulgaris*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella virginica*, dan lain-lain adalah contoh dari *Chlorella* sp. yang hidup di air laut (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995). *C. vulgaris* adalah ciliata planktonik yang mengapung di air, meskipun beberapa *Chlorella* sp. spesies dapat membentuk hubungan simbiosis dengan hewan lain seperti *Hydra* dan ciliata air tawar seperti *Paramecium bursaria* (Mufidah *et al.*, 2017).

2.7 Produksi Antibodi IgM terhadap Perlakuan Pemberian Vaksin Rekombinan

Respon vaksin rekombinan pada ikan kerapu yang diuji dengan vaksin percv untuk mendapatkan respon secara optimal dan terukur digunakan teknik mikroenkapsulasi. Respon antibody IgM pada ikan menunjukkan adanya titer antibody yang terbentuk pada tubuh inang. Respon IgM yang terukur bisa menggambarkan terbentuknya sel sel imun seperti sitokin, limfokin, interleukin, cluster differensiasi sel. Salah satu pengukuran titer antibody secara in vivo dari treatment vaksin bisa menunjukkan adanya tingkat tingginya respon protein hemaglutinin. Adanya proliferasi antara antigen dengan antibody menunjukkan respon tingginya sensitivitas dari antibody yang dihasilkan pada sel inang atau hewan uji. Hal ini bisa dibuktikan bahwa semakin tinggi titer antibody yang dihasilkan pada proliferasi sel eritrosit, leusit dan limfosit menunjukkan penambahan jumlah yang signifikan. (PTUPT, 2021)

2.8 Parameter Kualitas Air

Kualitas air adalah faktor paling berpengaruh terhadap keberlangsungan hidup organisme perairan. Kualitas air yang baik untuk ikan kerapu cantang akan memberikan manfaat yang baik bagi proses pertumbuhan ikan. Sebaliknya, jika kualitas air pada pemeliharaan ikan kerapu tergolong buruk, maka akan menghambat proses pertumbuhan ikan bahkan akan menjadi pintu masuk bagi penyakit untuk menyerang ikan kerapu. Anggraini *et al.* (2018), semakin buruk keadaan suatu perairan maka semakin kecil harapan biota laut untuk dapat hidup sesuai dengan lingkungan aslinya. Buruknya kondisi kualitas air akan memudahkan ikan menjadi stres dan mudah diserang oleh penyakit. Beberapa parameter kualitas air yang mempengaruhi pertumbuhan ikan kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) yakni suhu, pH, oksigen terlarut (DO), dan salinitas.

2.8.1 Suhu

Ikan merupakan hewan yang suhu tubuhnya tergantung dengan suhu lingkungannya. Suhu yang ada pada lingkungan hidup ikan sangat mempengaruhi kesehatan dan daya tahan tubuh ikan, terutama bila suhu yang ada pada lingkungan diluar dari kisaran suhu optimal ikan. Suhu air dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya musim, letak geografis, ketinggian, sirkulasi udara, tutupan awan, adanya arus, dan kedalam. Perubahan suhu pada perairan akan berpengaruh langsung terhadap proses fisika, reaksi kimia, evaporasi, volatilisasi, dan akan menurunkan kadar kelarutan gas dalam air, seperti oksigen, karbon dioksida, dan nitrogen (Nurcahyo, 2018).

Dalam budidaya ikan, lingkungan perairan yang terkontaminasi dan kualitas udara yang buruk akan menyebabkan peningkatan infeksi VNN dan iridovirus.

Kehidupan VNN dipengaruhi oleh suhu air. Infeksi VNN menyebabkan kematian pada kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) di perairan antara

27°C hingga 31°C, namun suhu 35°C perkembangbiakan virus VNN akan terhambat, terbukti dengan terjadinya jumlah kematian ikan yang turun. Suhu optimum berkisar antara 25°C sampai 30°C untuk perbanyakkan VNN isolat RGNNV (*redspotted grouper nervous necrosis virus*) (Sembiring *et al.*, 2018)

2.8.2 pH

Jumlah ion H⁺ dalam air menentukan tingkat pH tinggi dan rendah. pH berkisar antara 7,6 hingga 8,9 agar kerapu cantang dapat berkembang dan tumbuh secara maksimal. pH merupakan parameter kimia yang penting bagi kelangsungan hidup biota perairan. Nilai pH air dapat diubah dan berdampak pada metrik kualitas air. Kandungan organik yang tinggi dalam pH perairan dapat menghasilkan peningkatan pH, yang dapat berdampak pada toksisitas air. Amonia yang tergabung hadir dalam konsentrasi yang lebih besar di perairan alkali dan berbahaya bagi spesies air (Lestari, 2016).

Nilai pH pada perairan budidaya berbeda pada waktu pagi dan siang hari. Nilai pH cenderung lebih rendah ketika pagi daripada siang hari. Hal ini dikarenakan jumlah karbondioksida pada pagi hari relatif lebih tinggi daripada siang hari serta terbentuk senyawa karbonat H₂CO₃ yang menyebabkan bertambahnya ion H⁺ pada perairan. pH pada pemeliharaan ikan kerapu cantang harus dijaga agar nilainya optimal. pH yang terlalu asam dapat mempengaruhi ikan untuk menghasilkan lendir guna melindungi lapisan epitel. Dalam kondisi yang berlebihan akan mengganggu pertukaran gas pada proses respirasi, yang dalam jangka waktu lama akan menyebabkan terjadinya mortalitas pada ikan (Murtidjo, 2002).

2.8.3 Dissolved Oxygen (DO)

Oksigen terlarut juga merupakan faktor penting bagi kehidupan ikan kerapu cantang. Oksigen terlarut digunakan oleh biota perairan dalam proses respirasi.

Penurunan konsentrasi oksigen terlarut pada lingkungan budidaya disebabkan oleh penguraian bahan organik, respirasi yang dilakukan oleh organisme dan reaerasi yang terhambat. Difusi oksigen dari udara dan hasil fotosintesis autotrofik di air dapat menjadi sumber oksigen terlarut. Kandungan oksigen terlarut yang optimal untuk kehidupan kerapu cantang adalah lebih dari atau sama dengan 5 ppm. Pada konsentrasi tersebut dapat mendukung pertumbuhan serta perkembangan kerapu cantang. (Septinawati dan Tjahjningsih, 2010).

Kebutuhan oksigen terlarut ikan kerapu cantang akan mengalami peningkatan sebesar 10% ketika terjadi peningkatan suhu sebesar 1 °C. Oksigen terlarut dibawah 5 ppm ikan masih dapat bertahan hidup namun pertumbuhannya terganggu. Dalam kondisi perairan dengan oksigen terlarut yang sangat rendah dapat menyebabkan ikan kerapu cantang mengalami stress. Tingkat stress dari ikan ini dapat diketahui melalui status hematologi mengenai kadar hemoglobin, sel darah merah dan sel darah putih. Ketika terjadi kelangkaan oksigen, salah satu respon ikan adalah menumbuhkan sel darah merah untuk mempertahankan homeostasis fisiologis dan meningkatkan hemoglobin untuk mengikat oksigen sehingga dapat disalurkan keseluruh tubuh (Samsisko, *et al.* 2014).

2.8.4 Salinitas

Konsentrasi ion terlarut di udara, diukur dalam gram per liter atau bagian per seribu, dikenal sebagai salinitas. Proses osmoregulasi organisme dipengaruhi oleh konsentrasi salinitas dalam air. Osmoregulasi adalah proses pengontrolan keseimbangan udara dan ion antara tubuh dan lingkungannya. Semakin banyak energi yang dibutuhkan organisme untuk bertahan hidup jika kondisi salinitas tidak stabil atau berfluktuasi. Tingkat salinitas yang rendah juga dapat menurunkan jumlah oksigen terlarut di air. Pergeseran kisaran salinitas dari tinggi ke rendah akan mengakibatkan masalah dengan proses fisiologis dalam tubuh ikan. Oleh karena itu, untuk pertumbuhan dan metabolisme ikan, diperlukan lingkungan

salinitas yang mendukung dan stabil (Syukri dan Ilham, 2016).

Ikan kerapu cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) yang dipelihara di kolam pemeliharaan atau tambak dapat mengalami perubahan salinitas. Karena perbedaan salinitas antara air tawar dan air laut, ikan kerapu cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) harus menyesuaikan atau menyesuaikan diri untuk bertahan hidup di lingkungan barunya. Salah satu yang dapat dilakukan adalah menurunkan kadar garam media kultur secara bertahap hingga mencapai kadar yang diinginkan atau ideal. Kerapu cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) mungkin tidak dapat menyesuaikan diri dengan penurunan salinitas yang cukup besar karena proses fisiologis dalam tubuh ikan terganggu. Maka dari itu dibutuhkan konsentrasi salinitas yang optimal untuk pemeliharaan ikan kerapu cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) (Faozan, et al. 2019).



BAB III. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Kegiatan penelitian skripsi ini dilaksanakan pada bulan maret hingga juni 2021 yang berlokasi di UD. Giso Bangkit, Situbondo; laboratorium BPBAP Situbondo; Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Surabaya II; Laboratorium Biomolekuler FMIPA Universitas Brawijaya, Laboratorium Genetika Molekuler, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim dan BIOSAINS Universitas Brawijaya.

3.2 Metode Penelitian

Metode eksperimental digunakan dalam penelitian ini. Salah satu metode penelitian yang diyakini dapat menguji hipotesis hubungan sebab akibat atau memenuhi validitas internal yang sah adalah metode penelitian eksperimen. Ciri khas yang membedakan penelitian eksperimen dengan penelitian yang lain adalah satu atau lebih variabel bebas dimanipulasi (kondisi dibuat berbeda misal perbedaan dosis treatment), pengaruh manipulasi variabel bebas (pemberian perlakuan) terhadap variabel terikat diamati, dengan asumsi karena diberi perlakuan yang berbeda maka akan berdampak yang berbeda pula (Jaedun, 2011).

3.2.1 Data Primer

Data primer adalah informasi yang dikumpulkan langsung dari sumbernya, yaitu individu atau kelompok individu yang memerlukan pengolahan tambahan, seperti hasil wawancara atau tanggapan kuesioner. Data primer adalah informasi yang dikumpulkan langsung dari sumbernya, yaitu individu atau kelompok individu yang memerlukan pengolahan tambahan, seperti hasil wawancara atau tanggapan kuesioner. Data primer disebut juga sebagai data asli atau data terbaru. Untuk

mendapatkan data primer, peneliti harus mengumpulkannya secara langsung (Gustina dan Djannah, 2015). Data primer pada penelitian ini diamati meliputi analisis pengamatan sel mikronuklei pada ikan kerapu Cantang yang terinfeksi VNN, pengaruh pemberian vaksin rekombinan *C.vulgaris* dan pengukuran kualitas air parameter fisika maupun kimia. Pengambilan data primer menggunakan teknik pengumpulan data, yaitu :

1. Observasi

Observasi adalah istilah yang digunakan untuk menggambarkan data yang diperoleh melalui kegiatan pengamatan seperti melakukan pengamatan dan pengamatan langsung di lapangan. Hasanah (Hasanah, 2016). Penelitian ini bertujuan untuk mengumpulkan informasi tentang vaksin rekombinan *C. vulva* dan pengaruhnya terhadap ikan kerapu cantang yang terinfeksi VNN dengan menggunakan indikator seperti sel makronuklei dan mikronukleus, serta pengukuran kualitas air.

2. Wawancara

Wawancara adalah kegiatan yang dilakukan untuk mendapatkan informasi dari sumber yang berbasis bahasa. Untuk mengumpulkan data yang valid, wawancara penelitian membutuhkan komunikasi yang baik dan lancar antar individu (Kartikasari et al., 2016). Wawancara dilakukan dalam penelitian ini dengan mengajukan pertanyaan kepada orang-orang yang lebih memahami bidang penelitian yang dilakukan.

3. Dokumentasi

Dokumentasi adalah proses pengumpulan informasi dari sumber tertulis seperti arsip, termasuk buku-buku tentang teori, pendapat, argumen, dan hukum, dengan melakukan penelitian, mencatat, dan makalah atau catatan. (Subakti et al., 2016). Pengambilan gambar atau foto dengan memanfaatkan kamera digital digunakan dalam penelitian ini dan mencangkep sarana prasarana prasarana dan

seluruh kegiatan.

3.2.2 Data Sekunder

Merupakan informasi yang dikumpulkan dan dilaporkan oleh seseorang untuk tujuan tertentu atau sebagai pengetahuan ilmiah disebut sebagai data sekunder. Data sekunder adalah informasi yang telah dikumpulkan dan tersedia di perpustakaan, bisnis, organisasi perdagangan, biro statistik pusat, dan kantor pemerintah. Data sekunder dapat diperoleh dengan lebih mudah dan cepat karena sudah tersedia di perpustakaan, bisnis, organisasi perdagangan, biro statistik pusat, dan kantor pemerintah (Sani dan Maftukhatusolikhah, 2015). Data sekunder untuk penelitian ini dikumpulkan dari penelitian sebelumnya, literatur, dan sumber lain yang relevan seperti jurnal dan buku, serta data dari peneliti yang bekerja pada pengendalian media kolam pemeliharaan ikan kerapu cantang dan kualitas air untuk pemeliharaan kerapu dan analisis sel mikronuklei Ikan Kerapu Cantang yang terinfeksi VNN.

3.3 Prosedur Penelitian

Penelitian memiliki beberapa tahap prosedur penelitian yang dilakukan, diantaranya adalah persiapan alat dan bahan, sterilisasi alat dan bahan, aklimatisasi ikan kerapu cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*), uji tantang *in-vivo* pada ikan kerapu Cantang, deteksi VNN, uji *in-vivo* protein rekombinan p-percv pada ikan kerapu cantang, pengukuran kualitas air, dan Analisis sel mikronuklei.

3.3.1 Persiapan Alat dan Bahan

Sebelum memulai penelitian akan dilakukan persiapan alat dan bahan, alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini merupakan alat modern yang akan lebih efektif dan efisien untuk melakukan penelitian ini, alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.3.2 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sebelum melakukan penelitian pada laboratorium perlu dilakukan sterilisasi alat, sterilisasi alat bertujuan untuk membebaskan segala kehidupan mikroorganisme yang tidak diharapkan kehadirannya baik yang patogen atau apatogen, karena jika tidak disterilkan mikroorganisme tersebut akan mempengaruhi hasil dari penelitian yang dilakukan, maka dari itu perlu dilakukan sterilisasi agar hasil akhir dari penelitian dapat lebih akurat. Menurut Mulyanti dan Putri (2011), pada bidang mikrobiologi proses sterilisasi dilakukan sebagai tindakan pencegahan pencemaran dari organisme luar pada alat yang dipergunakan untuk mempertahankan keadaan aseptis, yang artinya terbebas dari mikroorganisme yang dianggap dapat mengganggu jalannya proses dan hasil akhir penelitian.

3.3.3 Desain Penelitian

Desain penelitian Analisis Sel Mikronuklei Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) yang Terinfeksi virus VNN dengan Pemberian Rekombinan *Chlorella vulgaris* Secara *In Vivo* ini dilakukan dengan 8 perlakuan yakni, sebagai berikut :

K- (A) : Kontrol Negatif, Ikan kerapu cantang sehat tanpa penginfeksi VNN maupun pemberian vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris*.

K+ (B) : Kontrol Positif, Ikan kerapu cantang sehat dengan penginfeksi VNN selama 14 Hari dan tanpa pemberian vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris*.

C1 (C) : Ikan kerapu cantang sehat tanpa penginfeksi VNN selama 14 hari dengan pemberian vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* 33 µl + 8,5 µl CFA (pada hari ke-0) dan vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* konsentrasi 33 µl + 8,5 µl IFA (Pada Hari Ke-4).

C2 (D) : Ikan kerapu cantang sehat tanpa penginfeksi VNN selama 14 hari dengan pemberian vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* 66 µl + 16,5 µl CFA (pada hari ke-0) dan vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* konsentrasi 66 µl + 16,5 µl IFA (Pada Hari Ke-4).

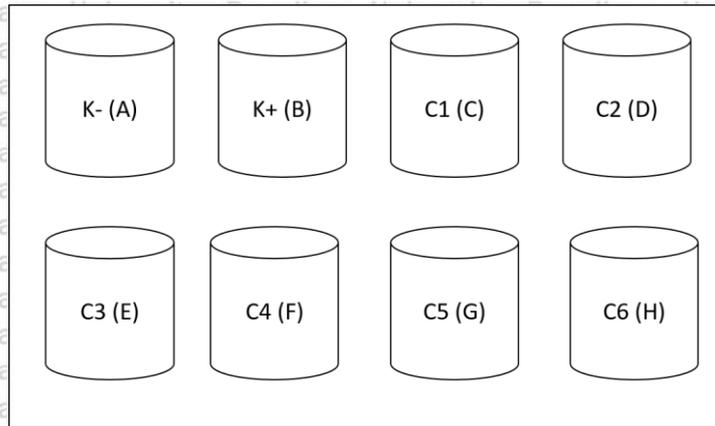
C3 (E) : Ikan kerapu cantang sehat tanpa penginfeksi VNN selama 14 hari dengan pemberian vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* 112 µl + 28 µl CFA (pada hari ke-0) dan vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* konsentrasi 112 µl + 28 µl IFA (Pada Hari Ke-4).

C4 (F) : Ikan kerapu cantang dengan penginfeksi VNN selama 14 hari dengan pemberian vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* 33 µl + 8,5 µl CFA (pada hari ke-0) dan vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* konsentrasi 33 µl + 8,5 µl IFA (Pada Hari Ke-4).

C5 (G) : Ikan kerapu cantang dengan penginfeksi VNN selama 14 hari dengan pemberian vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* 66 µl + 16,5 µl CFA (pada hari ke-0) dan vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* konsentrasi 66 µl + 16,5 µl IFA (Pada Hari Ke-4).

C6 (H) : Ikan kerapu cantang dengan penginfeksi VNN selama 14 hari dengan pemberian vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* 112 µl + 28 µl CFA (pada hari ke-0) dan vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* konsentrasi 112 µl + 28 µl IFA (Pada Hari Ke-4).

Desain perlakuan tertera pada **Gambar 5**.



Keterangan: Desain Perlakuan yang digunakan dalam penelitian.

Gambar 5. Desain Perlakuan. (Dokumentasi PTUPT,2021).

3.5.4 Kultur Mikroalga *Chlorella vulgaris*

Kultur *Chlorella vulgaris* dapat dilakukan secara bertingkat yaitu kultur skala carboy, skala intermediate dan skala massal. Kultur *Chlorella vulgaris* skala carboy merupakan kultur dalam skala kecil yaitu kultur yang dilakukan pada toples 10 liter yang terdiri dari kultur agar, test tube, Erlenmeyer dan carboy. Kegiatan kultur skala Intermediate merupakan kegiatan budidaya yang dilakukan di menggunakan bak fiber dengan volume bak 1ton (1000 liter) dan di isi air sebanyak 1/3 dari volume bak fiber. Kultur skala Intermediate di lakukan di ruangan terbuka. Atap dalam ruangan tersebut menggunakan atap fiber, sehingga cahaya matahari dapat masuk secara tidak langsung. Kultur skala massal yaitu kultur *Chlorella vulgaris* yang di lakukan pada kolam beton (Menegol et al.,2017).



a.)

b.)

Keterangan : a). Kultur Mikroalga dalam Tabung Gelas 5000mL, b). Proses Penyaringan Mikroalga

Gambar 6. Kultur mikroalga *Chlorella Vulgaris*

Penyediaan kultur mikroalga *Chlorella vulgaris* didapatkan dari hasil kultivasi mikroalga *Chlorella vulgaris*. Hasil kultivasi ini kemudian dipanen dan disaring.

Selanjutnya dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan antara larutan bening dan biomassa mikroalga *Chlorella vulgaris*. Hasil dari sentrifugasi yaitu biomassa mikroalga *Chlorella vulgaris* berupa pelet dan larutan bening berupa supernatan.

Supernatan dibuang dan diambil bagian peletnya yang selanjutnya digunakan untuk produksi vaksin rekombinan (Rafaelina, et al., 2016).

3.5.5 Produksi Vaksin Rekombinan *Chlorella vulgaris*

Produksi *C. Vulgaris* mengacu pada penelitian (Yanuhar, 2015; Yanuhar et al., 2020). Hasil isolasi yang didapatkan kemudian diketahui konsentrasinya dengan melakukan uji nanodrop. Kemudian produksi dan perbanyakan vaksin rekombinan dilakukan dengan teknik kloning yakni dengan transformasi menjadi *E. Coli* menggunakan pTA2 vektor dan dikonfirmasi untuk mendeteksi gen vaksin rekombinan dalam plasmid DNA dengan teknik RT-PCR dengan menggunakan primer T3 (3'-CTTTAGTGA GGGTTAAT-5') dan T7 Promoter (3'-TAATACGACTCACTATAGGG-5'). Kemudian hasil kloning dan perbanyakan disimpan dalam bentuk gliserol stock, yang kemudian fase pellet (DNA plasmid) digunakan sebagai treatment pada penelitian ini sebagai protein rekombinan *C. Vulgaris*.

3.5.4 Aklimatisasi Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*)

Pada penelitian ini, ikan yang di uji memiliki ukuran 8 - 10 cm. Jumlah ikan per media adalah sebanyak 12 ekor. Proses aklimatisasi dilakukan di UD. Giso Bangkit, Situbondo. Menurut Yanuhar (2011), ikan kerapu cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) terlebih dahulu tidak langsung diberikan pakan, hal ini dikarenakan benih ikan kerapu cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) memerlukan adaptasi terhadap media pemeliharannya yang baru. Adaptasi ini

dibutuhkan selama 12 jam, pakan diberikan setelah ikan terlihat sehat dan agresif.

Pakan yang digunakan berupa ikan kembung segar yang dicacah kecil - kecil.

Pemberian pakan dilakukan sebanyak dua kali per hari, yaitu pada jam 08.00 dan

15.00 WIB dan kontrol terhadap media air pemeliharaan selalu dilakukan.

Selanjutnya kualitas air dilakukan pengukuran seperti suhu, pH, DO dan salinitas

agar terjaga dengan baik kondisi lingkungan ikan kerapu cantang.

3.5.5 Uji Tantang VNN pada Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*)

Menurut Mahardika dan Mastuti (2019), pelaksanaan Uji tantang dengan

VNN dilakukan pada hari ke-5 dan ke-10 setelah proses aklimatisasi. Penularan

virus VNN pada penelitian ini dengan cara memotong kecil-kecil daging ikan yang

telah positif terinfeksi VNN sebanyak 5 gram per ekor ikan lalu diberikan secara

oral pada sampel ikan kerapu cantang. Kemudian dilakukan pengamatan yang

bertujuan untuk melihat ada atau tidaknya perubahan tingkah laku dari ikan kerapu

cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*). Diamati apakah terjadi gejala

abnormal hingga gejala spesifik selama proses penularan.



Keterangan : Ikan kerapu cantang yang menunjukkan gejala klinis VNN.

Gambar 7. Ikan Kerapu Cantang (Dokumentasi PTUPT, 2021)

3.5.6 Uji *In-Vivo* Vaksin Rekombinan pada Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*)

Perlakuan untuk uji *in-vivo* protein rekombinan *Chlorella vulgaris* pada ikan

kerapu cantang yang terinfeksi VNN dilakukan dalam penelitian ini. Proses

pengujian ini dilakukan dengan teknik sonde atau melalui oral dengan bantuan

selang *feeding tube*. Pemberian dosis perlakuan mangacu pada Yanuhar (Paten No. IDP000045822, 2011), yakni menggunakan dosis yang berbeda, 33 μ l, 66 μ l dan 112 μ l. Ikan yang sudah dipelihara dan diberi perlakuan kemudian dibedah untuk dianalisa Sel makronuklei dan mikronukleinya.

Uji in-vivo dilakukan dengan 8 perlakuan yakni perlakuan K- (A) Ikan kerapu sehat tanpa penginfeksian VNN, K+ (B) Ikan kerapu yang diinfeksi VNN, perlakuan C1 (C) Ikan kerapu sehat yang diberikan vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* dosis 33 μ l, C2 (D) Ikan kerapu sehat yang diberikan vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* dosis 66 μ l, C3 (E) Ikan kerapu sehat yang diberikan vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* dosis 112 μ l, C4 (F) Ikan kerapu yang diinfeksi VNN dan diberikan vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* dosis 33 μ l, C5 (G) Ikan kerapu yang diinfeksi VNN dan diberikan vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* dosis 66 μ l, C6 (H) Ikan kerapu yang diinfeksi VNN dan diberikan vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* dosis 112 μ l. Irawanto *et al.*, (2018) penggunaan dosis yang berbeda, yaitu dengan memberikan dosis 33 μ l, 66 μ l, dan 112 μ l. Dosis ekstrak kasar dari *Chlorella vulgaris* yang diberikan berbeda dengan setiap putaran, dengan menghitung dosis stok ekstrak kasar mikroalga yang diperoleh melalui hasil spektrofotometri yang dibandingkan dengan bobot ikan. Pemberian *coating* vaksin rekombinan CFA diberikan pada hari ke-0 hingga hari ke-4 dan dilanjutkan pemberian *coating* IFA pada hari ke-4 pasca CFA hingga hari ke-7. Dosis konsentrasi untuk *coating* vaksin rekombinan baik CFA maupun IFA adalah 8,5 μ l untuk 33 μ l, 16,5 μ l untuk 66 μ l, dan 28 μ l untuk 112 μ l.

3.5.7 Pengukuran Kualitas Air

1. Suhu

Pengukuran suhu dilakukan dengan menggunakan thermometer batang (*thermometer* Hg). Prosedur pengukuran suhu menurut Hamuna *et al.* (2018)

adalah:

- Memasukkan *thermometer* Hg kedalam perairan dengan cara membelakangi cahaya lalu di tunggu 3 sampai 5 menit sampai skala dalam *thermometer* Hg menunjukkan angka tertentu.
- Mencatat skala yang di tunjukkan oleh *thermometer* Hg ketika masih berada di perairan dan bagian *thermometer* Hg jangan sampai tersentuh.

2. Derajat Keasaman (pH)

Aprilliyanti *et al.*, (2015) menyatakan pengukuran pH di lakukan dengan menggunakan pH pen. Adapun prosedur pengukurannya adalah sebagai berikut:

- Menyiapkan pH pen merek ATC
- Kalibrasi terlebih dahulu pH pen sebelum di gunakan dengan aquades
- Masukkan pH pen kedalam air kemudian lihat angka pada layar pH pen.
Catat hasil pembacaan skala atau angka pada tampilan pH pen
- Setelah di pakai di standarisasi kembali.

3. Oksigen Terlarut (*Dissolved Oxygen*)

Putriana (2015) menyatakan pengukuran DO menggunakan DO meter.

Prosedur pengukurannya adalah sebagai berikut :

- Melakukan persiapan DO meter merk Lutron
- Melakukan kalibrasi DO meter menggunakan aquades
- Mencelupkan DO meter kedalam air sampel dalam jangka waktu kurang lebih 1 sampai 2 menit
- Menekan tombol ON dan menunggu sampai angka tertera pada layar stabil
- Menekan tombol HOLD pada saat angka telah stabil
- Melihat secara teliti skala yang ditunjukkan pada DO meter kemudian dicatat nilai DO yang di peroleh.

4. Salinitas

Aprilliyanti *et al.*, (2016), menyatakan bahwa untuk pengukuran salinitas dilakukan dengan refraktometer. Adapun prosedur pengukurannya adalah :

- Menyiapkan refraktometer merk Aventure
- Meneteskan aquadest pada prisma refraktometer dengan menggunakan pipet tetes
- Membersihkan prisma refraktometer dengan menggunakan tissue secara searah
- Meneteskan air sampel yang akan di ukur kadar salinitasnya pada prisma refraktometer dengan menggunakan pipet tetes
- Menutup prisma refraktometer dengan kemiringan 45°C secara perlahan agar tidak terdapat gelembung udara pada kaca prisma refraktometer
- Membaca skala salinitas yang tertera pada refraktometer yaitu pada angka yang terlihat di sebelah kanan dalam refraktometer.

3.5.8 Analisis Sel Darah Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*)

1. Pengamatan Mikronuklei pada Sel Darah Ikan

Sebuah slide bersih dilapisi dengan sampel darah tepi yang dikumpulkan dari vena ekor sampel ikan. Setelah 20 menit fiksasi dalam etanol 100%, slide dibiarkan kering sebelum diwarnai dengan 10% Giemsa selama 25 menit. Menggunakan

mikroskop Olympus BH2, pengamatan dilakukan pada lima slide 1000 eritrosit dari masing-masing ikan. Di bawah perbesaran 1000x, setiap slide diberi skor untuk menilai frekuensi inti indentasi, inti lobus, tunas, fragmentasi, dan sel mikronukleus, yang dihitung sebagai sel per 1000 (persentase) (Guner, 2011).

Amati setiap sel dan gunakan rumus di bawah ini untuk menghitung frekuensi mikronukleus Menurut Betancur *et al.* (2009)

$$\text{Frekuensi Mikronuklei} = \frac{\sum \text{Mikronuklei } X (1000)}{\text{Total sel yang dihitung}}$$

3.5 Analisis Data

Tanpa mengurangi pemahaman mengenai rancangan percobaannya, analisis data dalam penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dan software SPSS untuk menghitung estimasi (Harjosuwono et al., 2011).

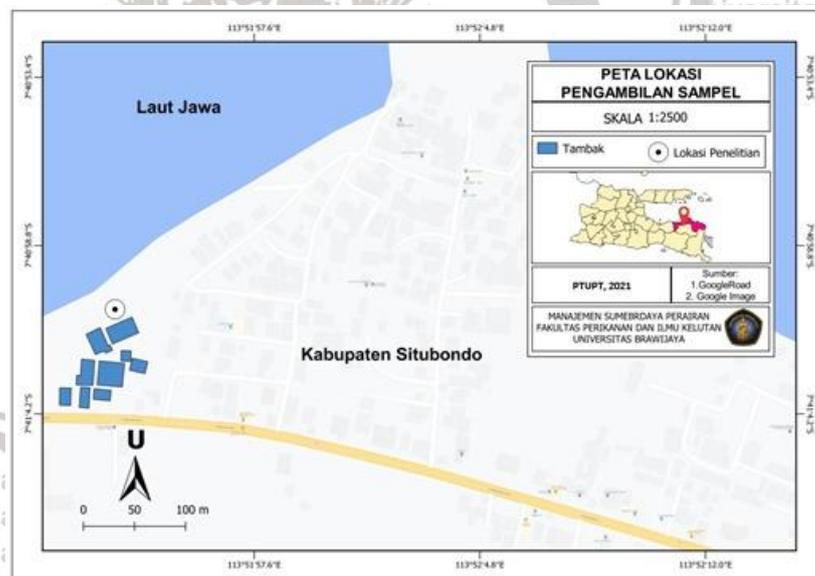
Nilai F dan nilai Sig akan muncul pada hasil perhitungan. Jika nilai Sig lebih kecil dari derajat signifikansi yang telah ditetapkan, perlakuan akan tampak memiliki dampak yang cukup besar pada respons yang diamati. Jika nilai Sig lebih dari atau sama dengan tingkat signifikansi yang telah ditentukan, perlakuan tidak berpengaruh pada respon yang diamati.

Dari analisis sel mikronuklei Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) dan pengukuran kualitas air didapatkan hasil yang ditampilkan menggunakan tabel, gambar dan grafik dari beberapa tahap penelitian agar menjadi suatu informasi untuk mengetahui status sel mikronuklei Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) yang diinfeksi virus VNN dengan pemberian protein rekombinan *Chlorella vulgaris* secara *In Vivo*.

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Keadaan Umum Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di desa kembang sambu yang merupakan salah satu wilayah di kabupaten situbondo, Provinsi Jawa Timur. Pemilihan lokasi penelitian ini berdasarkan survei mengenai daerah yang memiliki kegiatan pembenihan ikan kerapu cantang secara intens. Kabupaten Situbondo adalah salah satu kabupaten di Jawa Timur yang terletak antara 7°35' dan 7°44' Lintang Selatan dan 113°30' dan 114°42' Bujur Timur, di ujung timur bagian utara Pulau Jawa. Kabupaten Situbondo berbatasan dengan Selat Madura di utara, Selat Bali di barat, Kabupaten Bondowoso di selatan, dan Kabupaten Probolinggo di barat. Di bidang perikanan, kabupaten Situbondo menawarkan banyak potensi, salah satunya adalah budidaya ikan kerapu.



Keterangan: Lokasi UD Giso Bangkit.

Gambar 8. Peta Lokasi Penelitian. (Dokumentasi PTUPT, 2021)

4.1 Aklimatisasi Ikan Kerapu Cantang

Ikan kerapu di aklimatisasi terlebih dahulu sebelum dilakukan uji *in-vivo*. Ikan Kerapu Cantang yang dipelihara merupakan ikan berukuran 8 – 10 cm. Wadah

yang digunakan memiliki kapasitas 80 liter, pemeliharaan menggunakan 24 buah ember dengan padat tebar 12 ekor per wadah pemeliharaan. Sebelum ikan dimasukkan kedalam wadah perlakuan, dilakukan aklimatisasi terlebih dahulu selama 15 menit pada wadah yang berbeda. Ikan kerapu membutuhkan penyesuaian fisiologis atau adaptasi terhadap lingkungan hidup barunya. Apabila tidak dilakukan aklimatisasi sebagai proses penyesuaian lingkungan, ikan yang dipelihara akan mengalami stress (Arianto *et. al.*, 2018). Parameter fisika dan kimia perlu diperhatikan agar organisme yang dipelihara dapat tumbuh dengan baik. Untuk pemeliharaan ikan air laut beberapa parameter yang perlu diperhatikan adalah suhu, pH, Oksigen terlarut, dan Salinitas (Nurchahyo, 2018).



Keterangan: Ikan Kerapu sedang proses aklimatisasi sebelum dipindah ke bak perlakuan
Gambar 9. Aklimatisasi Ikan Kerapu. (Dokumentasi PTUPT, 2021).

Selelah dilakukan proses aklimatisasi pada ikan, tahapan selanjutnya adalah melakukan proses pengujian *in-vivo* vaksin rekombinan pada ikan kerapu yang berukuran 8 – 10 cm yang dilakukan selama 15 hari. Metode yang digunakan dalam pemberian protein rekombinan *Chlorella vulgaris* adalah metode sonde yakni memasukkan langsung kedalam mulut ikan dengan bantuan suntik sonde (Yanuhar, 2011). Dosis yang diberikan dalam vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* yakni 33 μ l + 8,5 μ l CFA , 66 μ l + 16,5 μ l CFA, dan 122 μ l + 28 μ l CFA. Pada hari ke-0 hingga hari ke-4 diberikan CFA (*Complete Friends Adjuvant*) dan hari ke-5 sampai dengan hari ke-7 menggunakan IFA (*Incomplete Friends Adjuvant*) guna meningkatkan proses kerja dari vaksin rekombinan yang diberikan. Selama proses pemeliharaan dan pemberian perlakuan tingkah laku ikan diamati untuk

mengetahui ada atau tidaknya perubahan tingkah laku. Hasil pengamatan tingkah laku ikan dapat dilihat pada tabel 2 sebagai berikut.

Tabel 1. Hasil Pengamatan Tingkah Laku Hewan Uji

Perlakuan	Aktivitas	Respon	Keterangan
K- (A)	Ikan berenang didasar ember dan cenderung bergerombol didekat aerasi	Ikan memberikan respon terhadap gerakan dan pakan	Normal
K+ (B)	Ikan cenderung berenang lambat, arah berenang tidak beraturan	Respon ikan terhadap gerakan dan pakan kurang dan nafsu makan menurun	Infeksi virus VNN menimbulkan kematian
C1 (C)	Ikan berenang aktif	Respon ikan terhadap gerakan dan pakan aktif	Normal
C2 (D)	Ikan berenang aktif	Respon ikan terhadap gerakan dan pakan aktif	Normal
C3 (E)	Ikan berenang aktif	Respon ikan terhadap gerakan dan pakan aktif	Normal
C4 (F)	Ikan berenang sedikit aktif dan bergerombol didekat aerasi	Respon ikan terhadap pakan Kurang aktif	Terjadi kematian pada beberapa ikan di hari ke-9
C5 (G)	Ikan berenang sedikit aktif dan bergerombol didekat aerasi	Respon ikan terhadap gerakan dan pakan kurang aktif	Tidak terjadi kematian pada ikan
C6 (H)	Ikan berenang sedikit aktif dan bergerombol didekat aerasi	Respon ikan terhadap gerakan dan pakan kurang aktif	Tidak terjadi kematian pada ikan

Keterangan :

K- (A) : Ikan Kerapu Sehat

K+ (B) : Ikan Kerapu sehat yang diinfeksi VNN (*Viral Nervous Necrosis*)

C1 (C) : Ikan kerapu Sehat + Vaksin Rekombinan 33 µl + 8,5 µl CFA pada hari 0 – hari ke 4 dilanjutkan dengan pemberian vaksin pada hari ke 5 – hari ke 7 menggunakan coating IFA.

C2 (D) : Ikan Kerapu Sehat + Vaksin Rekombinan 66 µl + 16,5 µl CFA pada hari 0 – hari ke 4 dilanjutkan dengan pemberian vaksin pada hari ke 5 – hari ke 7 menggunakan coating IFA.

C3 (E) : Ikan Kerapu Sehat + Vaksin Rekombinan 112 µl + 28 µl CFA pada hari 0 – hari ke 4 dilanjutkan dengan pemberian vaksin pada hari ke 5 – hari ke 7 menggunakan coating IFA.

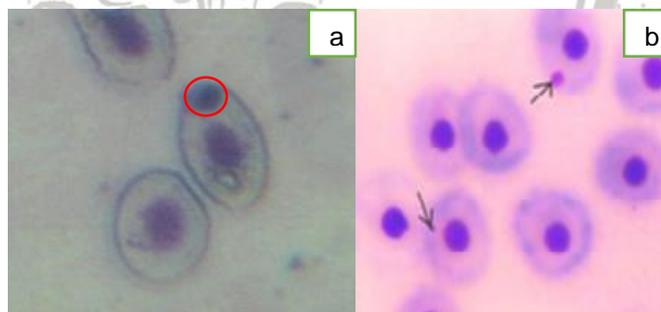
C4 (F) : Ikan Kerapu yang diinfeksi VNN + Vaksin Rekombinan 33 µl + 8,5 µl CFA pada hari 0 – hari ke 4 dilanjutkan dengan pemberian vaksin pada hari ke 5 – hari ke 7 menggunakan coating IFA.

C5 (G) : Ikan kerapu yang diinfeksi VNN + Vaksin Rekombinan 66 µl + 16,5 µl CFA pada hari 0 – hari ke 4 dilanjutkan dengan pemberian vaksin pada hari ke 5 – hari ke 7 menggunakan coating IFA.

C6 (H) : Ikan kerapu yang diinfeksi VNN + Vaksin Rekombinan 112 µl + 28 µl CFA pada hari 0 – hari ke 4 dilanjutkan dengan pemberian vaksin pada hari ke 5 – hari ke 7 menggunakan coating IFA.

4.3 Analisis Sel Mikronuklei Ikan Kerapu Cantang

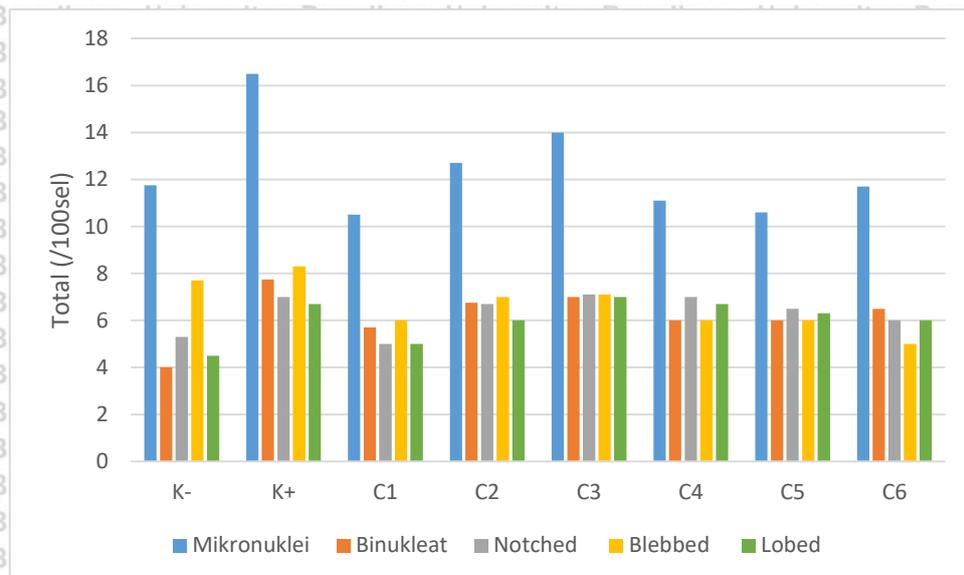
Berdasarkan pengamatan yang telah dilakukan, didapatkan hasil dari pengamatan pada masing - masing perlakuan yang diamati selama 7 hari. Lalu dilakukan pengambilan darah untuk diamati perbedaan nilai mikronukleinya. Didapatkan hasil perhitungan jumlah mikronuklei (sel/1000). Lusiyanti dan Alatas (2011), Potongan asentrik yang gagal bergabung dengan sel anak selama proses pembelahan sel menghasilkan mikronukleus. Selama proses anafase, juga dapat timbul dari kromosom yang tertinggal atau tidak diambil selama mitosis, atau sebagai akibat dari struktur kromosom yang rumit. Mikronukleus memiliki diameter kurang dari seperlima diameter inti (10 μ m), ditempatkan baik di dalam maupun di luar inti, dan tidak berinteraksi dengan inti. Mikronukleus dibuat ketika struktur kromosom rusak selama fase G0-G1 dari siklus sel, menghasilkan munculnya mikronukleus setelah sel melewati nukleus. Hasil pengamatan mikronuklei dapat dilihat pada Gambar 9.



Keterangan: Gambar a.) Mikronuklei yang diamati dengan mikroskop perbesaran 400x

Sumber: a. (Dokumentasi PTUPT, 2021) b. (Ali *et al.*, 2008)

Berdasarkan pengamatan yang telah dilakukan, jumlah mikronuklei setiap perlakuan dapat dilihat pada gambar 10.



Keterangan: Nilai rata rata kelainan sel mikronuklei selama 7 hari pengamatan

Gambar 10. Nilai Hasil Pengamatan Mikronuklei

Pada hasil pengamatan yang dilakukan menggunakan mikroskop perbesaran 400x didapatkan rata rata nilai kelainan sel, untuk sel mikronuklei mendapat nilai paling tinggi diantara kelainan sel lainnya. Untuk binukleat nuklei didapatkan nilai tertinggi pada perlakuan K+ (B) yaitu 7,7/1000sel, notched nuklei mendapatkan nilai tertinggi pada C3 (E) dengan nilai 7,1/1000sel, blebbed nuklei 8,3/1000sel pada perlakuan K+(B), dan Lobed nuklei 6,7/1000sel. Pada Perlakuan K- (A) didapatkan Rata - rata nilai mikronukleinya 11,7/1000sel. Pada perlakuan K+ (B) ikan kerapu yang diberikan infeksi virus VNN didapatkan rata – rata 16,5/1000sel untuk nilai mikronukleinya. Nilai mikronuklei terbaik didapatkan pada perlakuan C1 (C) yaitu pemberian vaksin rekombinan dengan dosis 33 µl yaitu 10,5/1000sel. Pada perlakuan ikan kerapu sehat yang diinfeksi virus VNN + vaksin rekombinan didapatkan hasil paling baik yaitu pada perlakuan C5 (G) dengan dosis 66 µl yaitu 10,6/1000sel untuk mikronukleinya. Ketika kondisi tubuh organisme memburuk maka kandungan DNA akan menurun. Replikasi diferensial menyebabkan perubahan jumlah DNA dalam ortomer. Over-replikasi dapat dilihat pada kultur dengan kondisi yang lebih baik, dan under-replication dapat

diperlihatkan pada kultur dengan kondisi yang lebih buruk (Radzikowski, 1985). Menurut (Yin Yang et al., 2017). Peningkatan jumlah mikronuklei mengindikasikan bahwa kesehatan ikan menurun, sedangkan semakin rendah sel mikronuklei sel darah ikan, maka kesehatan ikan dikatakan baik. Ikan mampu merespon bahan pencemar didalam perairan walaupun dalam konsentrasi yang cukup rendah yaitu dengan membentuk mikronuklei.

4.4 Analisis Data

Analisis menggunakan rancangan acak kelompok (RAK) dilakukan dalam penelitian ini untuk melihat ada atau tidaknya pengaruh dari perlakuan yang berbeda pada perlakuan protein rekombinan *Chlorella vulgaris* yang diberikan.

Analisis data penelitian ini menggunakan software SPSS20. Hasil dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Test of Between-Subjects Effects

Source	Types III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	274,969	14	19,641	8,172	0,000
Intercept Model	9776,266	1	9776,266	4067,715	0,000
Perlakuan	231,109	7	33,016	13,737	0,000
Waktu	43,859	7	6,266	2,607	0,023
Error	117,766	49	2,403		
Total	10169,000	64			
Corrected Total	392,734	63			

Berdasarkan tabel Dapat dilihat bahwa F hitung perlakuan sebesar 13,737 dengan probabilitasnya sebesar $0,00 < 0,05$. F hitung waktu sebesar 2,607 dengan probabilitasnya sebesar $0,00 < 0,05$. Berdasarkan dari analisa dari tabel diatas nilai Sig. Sebesar 0,0 didapatkan, dimana nilai tersebut berada dibawah nilai 0,05 yang menunjukkan bahwa perlakuan protein rekombinan yang dilakukan berbeda nyata atau terdapat perbedaan. Maka selanjutnya perlu dilakukan uji lanjut untuk mengetahui pengaruh dari perlakuan yang berbeda dengan uji Tukey HSD.

Berikut hasil uji Tukey HSD dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil Uji Tukey HSD Mikronuklei

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0,05		
		1	2	3
C1 (C)	8	10,50		
C5 (G)	8	10,63		
C4 (F)	8	11,13		
C6 (H)	8	11,63	11,63	
K- (A)	8	11,75	11,75	
C2 (D)	8	12,75	12,75	
C3 (E)	8		14,00	
K+ (B)	8			16,50
Sig.		0,094	0,064	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

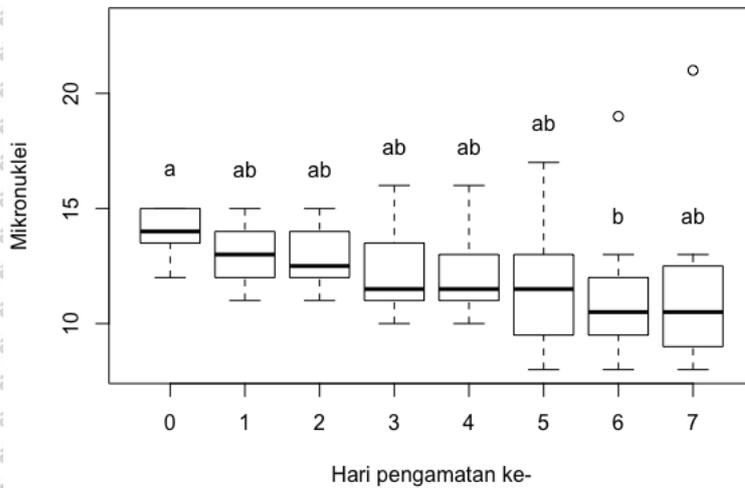
Based on observed means.

The error term is Mean Square (Error)= 2,403

a. *Uses Harmonic Mean Sample Size = 8,000*

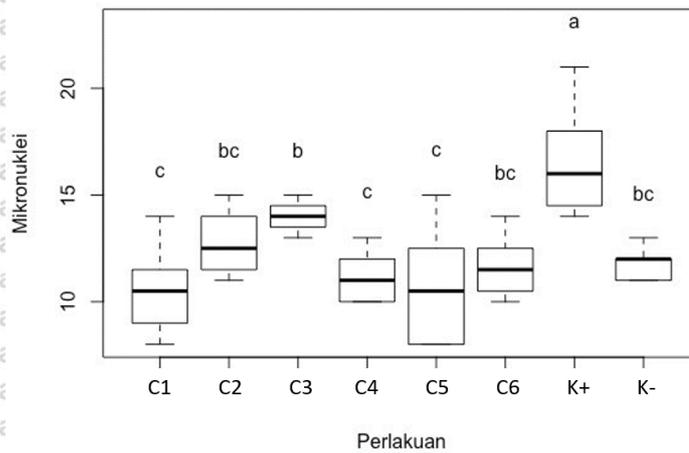
b. *Alpha = 0,05*

Hasil uji Tukey HSD dan grafik yang ditampilkan diketahui bahwa tiap perlakuan memiliki hasil yang berbeda. Perbedaan tiap perlakuan yang diberikan diketahui dengan melakukan uji perbedaan dengan taraf nyata 0,05 (selang kepercayaan 95%). Perlakuan yang paling baik adalah perlakuan pada C1 (C) yaitu protein rekombinan dengan dosis 33 µl. Perlakuan yang paling memiliki pengaruh dengan signifikan 0,05 adalah perlakuan protein rekombinan dengan dosis 33 µl dimana pada perlakuan tersebut didapatkan jumlah mikronuklei yang rendah. Pada perlakuan K+ (B) atau penularan virus VNN didapatkan jumlah mikronuklei yang tinggi, hal ini disebabkan adanya serangan patogenik dari virus VNN yang mempengaruhi sel darah dari ikan kerapu cantang, sehingga nilai mikronukleinya pun meningkat. Mikronukleus berdampak pada eritrosit, dan semakin besar jumlah mikronukleus yang diperoleh maka semakin besar pula paparan penyakit masuk ke dalam tubuh ikan. Nilai rata-rata mikronukleus pada MN normal tanpa paparan genotoksik bervariasi dari rata-rata 0,5 hingga 2,5 MN/1000 sel. (Lusiyanti dan Abdul, 1999). Kemudian dilanjutkan dengan Uji menggunakan boxplot menggunakan *software* R untuk menunjukkan perbedaan antara populasi.



Gambar 11. Hasil Uji Tukey dengan Boxplot

Berdasarkan hasil yang ditampilkan dari uji tukey pengamatan dari hari ke hari dapat Dilihat dari garis tengahnya, Median dari setiap data memiliki nilai yang berbeda dan semakin menurun dari hari ke hari, kemudian dilihat dari panjang box, data memiliki rentang yang hampir sama dari hari ke hari. Hari 6 dan 7 terdapat data pencilan (dilihat dari adanya titik di atas). Lalu Dilihat dari letak garis tengahnya, hanya pada hari pertama data memiliki sebaran yang simetris.



Gambar 12. Hasil Uji Tukey dengan Boxplot

Berdasarkan hasil yang ditampilkan Uji tukey dengan boxplot dapat dilihat dari garis tengahnya, median dari setiap perlakuan memiliki nilai yang berbeda beda dan paling tinggi pada perlakuan k-. Kemudian dari panjang box, sebaran data dari setiap perlakuan sangat bervariasi namun cenderung sempit. Dilihat dari letak garis tengah, hampir semua data memiliki sebaran yang simetris karena letak median dari semua perlakuan hampir berada di tengah box. Pada perlakuan k+ data yang ditampilkan cenderung condong ke bawah.

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan analisis sel mikronuklei ikan kerapu cantang (*epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) yang terinfeksi viral nervous necrosis (vnn) dengan pemberian rekombinan *chlorella vulgaris* secara *in vivo* dapat disimpulkan bahwa infeksi Viral Nervous Necrosis (VNN) pada ikan kerapu cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) mempengaruhi nilai sel makronuklei dan mikronuklei dengan terjadinya peningkatan jumlah sel tersebut, dimana hal ini mengindikasikan bahwa kondisi ikan sedang tidak baik. Sedangkan pada perlakuan pemberian protein rekombinan dengan dosis 33 µl menjadi hasil terbaik karena mampu menurunkan nilai makronuklei dan mikronuklei secara signifikan berdasarkan uji Tukey dengan menggunakan SPSS20.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian ini, sebagai penerapan ilmu Manajemen Sumber Daya Perairan disarankan perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai pemberian vaksin *Chlorella vulgaris*, serta pemberian vaksin rekombinan yang di produksi menggunakan mikroalga jenis lain sebagai antivirus bagi ikan kerapu cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) yang terinfeksi Viral Nervous Necrosis (VNN).

DAFTAR PUSTAKA

- Agostinia, A., J. Niklasc., T. Schulteb., M. D. Valentina., M. Bortolusa., E. Hofmannb., W. Lubitzc dan D. Carbonera. 2018. Changing the site energy of per-614 in the Peridinin-chlorophylla-proteindoes not alter its capability of chlorophyll triplet quenching. *Bioenergetics*: 612-618.
- Agustinia, N,W,S dan M. Setyaningrum. 2018. Screening Fitokimia, Uji Aktivitas Antimikroba dan Antioksidan, serta Identifikasi Senyawa dari Ekstrak Biomassa *Chlorella vulgaris*. *Journal of Agro-based Industry*. 35 (1): 29- 37.
- Alimuddin, B. Handoyo dan N. B. P. Utomo. 2014. Efektivitas pemberian hormon pertumbuhan rekombinan ikan kerapu kertang (*Epinephelus lanceolatus*, Bloch 1790) melalui perendaman dan oral terhadap pertumbuhan elver ikan sidat (*Anguilla bicolor bicolor*). *Jurnal Iktiologi Indonesia*. 14(3) : 179-189.
- Amiruddin, H., R.K. Dongoran, R. Nurhadi dan L. Darto. 2012. Manajemen induk Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) sebagai Upaya Optimalisasi Produksi Telur Berkualitas. Balai Budidaya Laut Ambon.
- Andriyani, W.M. 2012. Uji Kemampuan Kandidat Vaksin DNA *Viral Nervous Necrosis* dalam menginduksi Antibody Ikan Kerapu Cantang. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor. Tidak Di publikasikan.
- Andriyanto, W., Slamet, B. and Ariawan, I.M.D.J., 2013. PERKEMBANGAN EMBRIO DAN RASIO PENETASAN TELUR IKAN KERAPU RAJA SUNU (*Plectropoma laevis*) PADA SUHU MEDIA BERBEDA EMBRYONIC DEVELOPMENT AND HATCHING EGGS RATIO OF BLACKSADDLED CORAL GROUPER (*Plectropoma laevis*) AT DIFFERENT TEMPERATURE MEDIA. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*, 5(1), p.193.
- Aprilliyanti, S., T.R. Soeprbowati dan B. Yulianto. 2016 Hubungan Kemelimpahan *Chlorella* sp Dengan Kualitas Lingkungan Perairan Pada Skala Semi Masal di BBBPBAP Jepara. *Jurnal Ilmu Lingkungan*. Vol. 14 (2) :77-81
- Arianto, R.M., Fitri, A.D.P. and Jayanto, B.B., 2018. Pengaruh Aklimatisasi Kadar Garam terhadap Nilai Kematian dan Respon Pergerakan Ikan Wader (*Rasbora argyrotaenia*) untuk Umpan Hidup Ikan Cakalang. *Journal of Fisheries Resources Utilization Management and Technology*, 7(2), pp.43-51.
- Bandín, I. and Souto, S., 2020. Betanodavirus and VER disease: a 30-year research review. *Pathogens*, 9(2), p.106.
- Chi, S.C., Lo, B.J. and Lin, S.S., 2001. Characterization Of Grouper Nervous. *J. Fish Dis.* 24: 3-13
- Crane, M dan A. Hyatt. 2011. Viruses of Fish: An Overview of Significant Pathogens. *Viruses* .3: 2025-2046
- Dewi, M. 2017. Kualitas Histopatologi Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.) Pada

- Bak Pemeliharaan Dengan Treatment *Chlorella Vulgaris* Dan Infeksi Viral Nervous Necrosis (VNN). *Skripsi*. Universitas Brawijaya
- Eshmat, M.E dan A.Manan. 2013. Analisis Kondisi Kualitas Air Pada Budidaya Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) Di Situbondo. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. **5** (1): 1- 4.
- Faozan, R., Syakirin, M.B. and Mardiana, T.Y., 2019. PENGARUH TINGKAT PENURUNAN SALINITAS MEDIA DALAM PROSES AKLIMASI TERHADAP TINGKAT KELANGSUNGAN HIDUP IKAN KERAPU CANTANG (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*). *Pena Jurnal Ilmu Pengetahuan dan Teknologi*, **33**(1), pp.68-75.
- Hamuna, B., R.H.R. Tanjung., Suwito, H.K. Maury dan Alianto. 2018. Kajian Kualitas Air Laut dan Indeks Pencemaran Berdasarkan Parameter Fisika-Kimia Di Perairan Distrik Depapre, Jayapura. *Jurnal Ilmu Lingkungan*. **16**(1) : 35-43.
- Hasanah, H. 2016. Teknik-Teknik Observasi (Sebuah Alternatif Metode Pengumpulan Data Kualitatif Ilmu-Ilmu Sosial). *Jurnal at-Taqaddum*. **8**(1): 21-46.
- Johnny, F., Zafran., D. Roza, Dan K. Mahardika. 2003. Hematologis Beberapa Spesies Ikan Laut Budi Daya. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. **9**(4): 63-71
- Kurniawan, Andri. 2012. Penyakit Akuatik. UBB Press: Pangkal Pinang.
- Lestari, E., T.R. Setyawati., A.H. Yanti. 2017. Profil Hematologi Ikan Gabus (*Channa striata* Bloch, 1793). *Protobiont*. **6** (3) : 283 – 289.
- Lusiyanti, Y. and SYAIFUDIN, M., 2014, September. Penerapan efek interaksi radiasi dengan sistem biologi sebagai dosimeter biologi. In *Jurnal Forum Nuklir*. Vol. **2**(1): 1-15.
- Mahardika, K., Mastuti, I., Sudewi, S., Asih, Y.N., Muzaki, A. and Giri, I.N.A. 2019. Aplikasi vaksin bivalen (VNN dan GSDIV) pada pemeliharaan larva ikan kerapu sunu, *Plectropomus leopardus*. *Jurnal Riset Akuakultur*. **13**(4) : 337-346.
- Masitha, A., U. Yanuhar and A. M. S. Hertika. 2019. *In-Vivo Test of Chlorella Vulgaris* Extract as Heat Shock Proteins Induction of Cantang Grouper (*Ephinephelus Fuscoguttatus-Lanceolatus*) Infected By Viral Nervous Necrosis. *Journal of Fisheries and Marine Research*. **3**(1) : 22-31.
- Mehra, S. and Chadha, P., 2021. Naphthalene-2-sulfonate induced toxicity in blood cells of freshwater fish *Channa punctatus* using comet assay, micronucleus assay and ATIR-FTIR approach. *Chemosphere*, **265**: 129147.
- Mulyanti, S. and Putri, H.M., 2011. Pengendalian infeksi silang di klinik gigi. *Jakarta: EGC*.
- Navarro-Flores, M.J., Ventura-Canseco, L.M.C., Meza-Gordillo, R., del Rosario Ayora-Talavera, T. and Abud-Archila, M., 2020. Spray drying encapsulation of a native plant extract rich in phenolic compounds with combinations of maltodextrin and non-conventional wall materials. *Journal of Food Science*

- and Technology, 57(11), pp.4111-4122.
- Ni'mah, H., Suminto Dan T. Susilowati. 2017. Pengaruh Pemberian Diet Mikroalga Yang Berbeda (*Chlorella Vulgaris*, *Chaetoceros Calcitrans*, *Nannochloropsis Oculata* Dan *Tetraselmis Chuii*) Terhadap Pertumbuhan Dan Reproduksi *Diaphanosoma Brachyurum*. *Journal Of Aquaculture Management And Technology*. Vol 6 (3) :96-105.
- Noor, N. Md., Simon K.D, Zaidi C.C. Mazlan A.G. 2018. Effects of Salinities and Diets on Growth of Juvenile Hybrid Grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* x *E. lanceolatus*. Turkish. *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 18: 1045-1051.
- Novianti, T. 2019. Kandungan Betakaroten Dari Mikroalga *Chlorella Vulgaris* Yang Dikultur Dengan Perlakuan Sumber Cahaya Dan Kepadatan Awal Inokulum (Kai) Yang Berbeda. *Jurnal Biologi Dan Pendidikan Biologi* Vol 4(1): 46-61.
- Nugroho, E.D. and Rahayu, D.A., 2018. *Penuntun Praktikum Bioteknologi*. Deepublish.
- Nugroho, R. A. dan F. M. Nur. 2018. Potensi Bahan Hayati Sebagai Immunostimulan Hewan Akuatik. Deepublish. Sleman
- Nurchayyo, W. 2018. Parasit Pada Ikan. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Purnomo, D., Sugiharto, S. and Isroli, I., 2015. Total leukosit dan diferensial leukosit darah ayam broiler akibat penggunaan tepung onggok fermentasi *rhizopus oryzae* pada ransum. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan (Indonesian Journal of Animal Science)*. 25(3): 59-68.
- Putri, D.I.L., A. Tumulyadi dan Sukandar. 2013. Tingkah Laku Pemijahan, Pembenihan, Pembesaran Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) Di Balai Budidaya Air Payau Situbondo. *PSPK STUDENT JOURNAL*. I (1) : 11-15
- Putri, R.R., Basuki, F. and Hastuti, S., 2013. Profil Darah Dan Kelulushidupan Ikan Nila Pandu F5 (*Oreochromis niloticus*) yang Diinfeksi Bakteri *Streptococcus agalactiae* dengan Kepadatan Berbeda. *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 1(2), pp.47-56.
- Radji, M., 2012. Vaksin DNA: Vaksin generasi keempat. *Pharmaceutical Sciences and Research (PSR)*, 6(1), pp.28-37.
- Radzikowski, S., 1985. Replication, division and mechanisms controlling the variable DNA content in the heteromeric macronucleus of *Chilodonella steinii* (Ciliata). *Archiv für Protistenkunde*, 130(4): 381-396.
- Rahmadina. 2020. *Biologi Taksonomi Invertebrata*. Medan: Fakultas Sains Dan Teknologi UINSU Medan.
- Rahmaningsih, S. 2018. Hama dan Penyakit Ikan. Yogyakarta. Deepublish.
- Regista., Ambeng., M. Litaay dan M.R. Umar. 2017. Pengaruh pemberian

- vermikompos cair *Lumbricus rubellus* Hoffmeister pada pertumbuhan *Chlorella* sp. *Jurnal Biologi Makassar*. **2(1)**: 1-8.
- Safar, H. Patrick U.N., Anita L., Susan L.H., Charlotte, J. 2016. Enhancement of Protein and Pigment Content in Two *Chlorella* Species Cultivated on Industrial Process Water. *Journal of Marine Science and Engineering*. **4**, 84.
- Samsisko, R, L, W., H. Suprpto dan S. Sigit. 2014. Respon hematologis Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) pada suhu media pemeliharaan yang berbeda. *Journal of Aquaculture and Fish*. **3(1)** : 36-43
- Sánchez, A. dan Vázquez, A. 2017. Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety* **1**, 29–46.
- Sani, K. dan Maftukhatusolikah. 2015. Pengaruh *Capital Adequacy Ratio* (CAR) dan *Quick Ratio* (QR) Terhadap *Return On Assets* (ROA) pada Bank Umum Syariah di Indonesia 2011-2013. *I-Economics Journal*. **1 (1)**.
- Saparuddin.,A. Ridwan Dan Z. Arham. 2017. Efektivitas Ekstrak Daun Macaranga Tanarius Dalam Menginaktivasi *Viral Nervous Necrosis* Ikan Kerapu Cantang. *Biowallacea*. **4 (1)**: 519-526.
- Saparuddin.2018.Pengaruh Ekstrak Etanol Terhadap Peningkatan Konsentrasi Hemoglobin dan Nilai Hematokrit Ikan Kerapu Cantang. *Jurnal Saintifik*. **4(1)**: 39-46.
- Sari,E,M., M.Nurilmala Dan A.Abdullah. 2017. Profil Asam Amino Dan Senyawa Bioaktif Kuda Laut. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Kelautan Tropis*. **9 (2)**: 605-617
- Sasongko, As., S. Anggoro Dan M. Yusuf. 2019. Kajian Bioekologi Ikan Kerapu Lumpur (*Epinephelus Coioides*) Di Area Karang Kretek Perairan Ujung Negro Kabupaten Batang. Researchgate.
- Sembiring, S.B.M., Haryanti, H., Permana, I.G.N., Mahardika, K. and Sugama, K., 2017. KORELASI GENOTIP ALLOZYMEDAN FRAGMENTEN INFEKSIVIRAL NERVOUS NECROSIS (VNN) PADA KERAPU BEBEK, *Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*, **10(1)**, pp.13-20.
- Sembiring,S.B.M., G.S.Wibawa.,K.Mahardika.,Z.Widiastuti, dan Haryanti.2018. Prevalensi Infeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN) Dan Iridovirus Pada Hatcheri Dan Budidaya Ikan Laut. *Media Akuakultur*.**13 (2)**:83-90
- Shabrina.,D.A.,S.Hastuti dan Subandiyono.2018. Pengaruh Probiotik Dalam Pakan Terhadap Performa Darah, Kelulushidupan, Dan Pertumbuhan Ikan Tawes (*Puntius javanicus*). *Jurnal Sains Akuakultur Tropis*: **2(2)**:26- 35.
- Soemarjati, W., A. B. Muslim, R. Susiana dan C. Saparinto. 2015. Bisnis dan Budidaya Ikan Kerapu. Penebar Swadaya Grup: Jakarta. 154 Hal.
- Sudaryatma, P. E., Lestari, A. T., Sunarsih, N. L., Widiarti, K. S., Hidayah, S. N., Srinoto, D. 2012. Imunositokimia Streptavidin Biotin: Deteksi Dini *Viral Nervous Necrosis* Virus pada Lendir Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus*

- fuscoguttatus*). *JSV*. **30**(1): 99 -109.
- Suhermanto, A., PENGARUH TOTAL FENOLTERIPANG PASIR (*Holothuria scabra*) TERHADAP RESPON IMUN NON SPESIFIK IKAN MAS (*Cyprinus carpio*). *Bumi Lestari Journal of Environment*, **13**(2).
- Sukmadinata, S.N., 2005. Metode Penelitian. *Bandung: PT remaja rosdakarya*.
- Sunaryo dan Marmi. 2018. Ketahanan Hidup Benih Ikan Kerapu Bebek (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) Pada Habitat Air Tawar. *Proceeding of Biology Education*. **2**(1):36-41.
- Susmiarsih, T. P. 2018. Kajian DNA rekombinan pada vaksin DNA dan vaksin subunit protein. *Majalah Kesehatan Pharma Medika*. **10**(2): 108-128.
- Syukri, M. and Ilham, M., 2016. Pengaruh salinitas terhadap sintasan dan pertumbuhan larva udang windu (*Penaeus monodon*). *Jurnal Galung Tropika*. Vol. **5**(2): 86-96.
- Tang G. dan Paolo M.S. 2011. Vitamin A, Nutrition, and Health Values of Algae: Spirulina, Chlorella, and Dunaliella. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*, **1**, 111-118.
- Thenawidjaja, M., W. T. Ismaya dan D. S. Retnoningrum. 2017. Protein – Serial Biokimia Mudah dan Menggugah. Gramedia. Jakarta
- Wardana, I. K., dan Tridjoko. 2015. Mengetahui Lebih Dekat Kerapu Bebek (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) Hasil Budidaya. *Media Akuakultur*. **10**(1): 23-29
- Wirawan, R. 2011. Pemeriksaan Laboratorium Hematologi. Jakarta: Badan Penerbit FKUI.
- Wiyatno, F.H., S. Subekti dan R. Kusdarwati. 2012. Identifikasi Dan Prevalensi Ektoparasit Pada Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) Di Karamba Jaring Apung Unit Pengelola Budidaya Laut Situbondo. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. **4** (1): 103-108
- Yanuar, U. 2011. The Function of Receptor Protein Humpback Grouper *Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus* in Expression and Proliferation of CD4 and CD8 cells in Defence Immunity of Viral Nervous Necrotic Infection
- Yanuar, U., 2011. Respon Immun Sel Interleukin-4 (IL-4) Pada Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) Yang Dipapar Protein Immunogenik *Vibrio Harveyi*. *Jurnal Kelautan: Indonesian Journal of Marine Science and Technology*, **4**(2), pp.126-134.
- Yanuar, U., E. Gusmawan., 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.
- Yanuar, U., R. Christiawan, M. Mahmudi, A.M.S. Hadi, D. Arfiati. 2015. Heat Shock

Protein (Hsp) Response Within RNA Viral Nervous Necrosis (VNN) that Infect of the Humpback grouper *Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*. *Agricultural and Medical Sciences*.10-15.

Yanuhar,U. 2017 Mikroalga Potensial Untuk Industri. Malang.Universitas Negeri Malang.

Yanuhar,U., N.R.Caesar dan M. Musa. 2019. Identification of Local Isolate of Microalgae *Chlorella Vulgaris* using Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Large Subunit (rbcl) Gene. *Annual Basic Science International Conference (BaSIC 2019)*. 1-6.

Yenong, R.E.2010. *Viral Nervous Necrosis (Betanodavirus)*infection in fish University ofFlorida IFAS Extension Florida. 1-7.

Zorriehzahra, M.E.J., M. Ghasemib, M. Ghiasi, S.Haghighi Karsidani, G. Bovo, A. Nazari, M. Adel, V. Arizza, K. Dhama. 2016. Isolation and confirmation of viral nervous necrosis (VNN) disease in golden grey mullet (*Liza aurata*) and leaping mullet (*Liza saliens*) in the Iranian waters of the Caspian Sea. *Veterinary Microbiology* 190, 27–37.

Zulkarnain,L,A.,S.Hastuti Dan Sarjito.2017. Pengaruh Penambahan Vitamin C Pada Pakan Sebagai Immunostimulan Terhadap Performa Darah, Kelulushidupan, Dan Pertumbuhan Ikan Tawes (*Puntius Javanicus*). *Journal Of Aquaculture Management And Technology*. 6(3): 159-168



LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat dan Bahan Penelitian

No.	Parameter	Nama Alat	Keterangan
1.	Sterilisasi	Autoklaf	<i>Exsitu</i>
		Bunsen	
		Sprayer	
		Washing bottle	
		Beaker glass 250 ml	
		Erlenmeyer 250 ml	
		Kain Serbet	
2.	Aklimatisasi	Ikan kerapu cantang	<i>Insitu</i>
		berukuran 8-10 cm	
		Bak pemeliharaan	
		Aerator	
3.	Uji Tantang In Vivo VNN pada Ikan	Ikan kerapu	<i>Insitu</i>
		Ikan kerapu VNN	
4.	Uji In Vivo Vaksin Rekombinan p-PERCv	Feeding tube	<i>Insitu</i>
5.	Analisa sel makronuklei dan mikronuklei	Sampel darah	<i>Exsitu</i>
		Akuades	
		Pewarna giemsa	
		Object glass	
		Cover glass	
		Mikroskop	
6.	Suhu	DO meter	<i>Insitu</i>
7.	pH	pH meter	<i>Insitu</i>
8.	DO (<i>Dissolved Oxygen</i>)	DO meter	<i>Insitu</i>
9.	Salinitas	Refraktometer	<i>Insitu</i>
		Pipet tetes	

Sumber: Dokumentasi Pribadi (2021)

Lampiran 2. Dokumentasi Penelitian



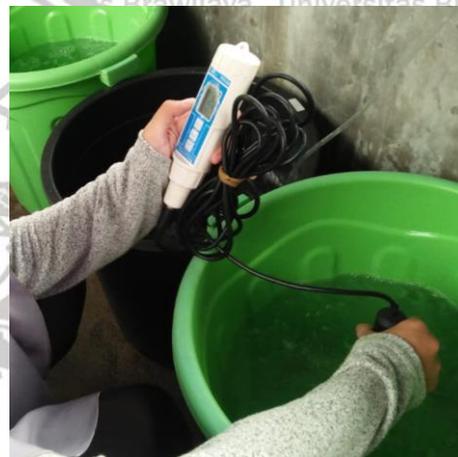
Penyiapan Alat dan Bahan



Bak Perlakuan



Pengukuran Suhu



Pengukuran DO



Pengamatan Ikan



Sipon Air pada Bak



Pembuatan Pakan Ikan Rucah



Pemberian Pakan Ikan Rucah



Pengambilan Darah Ikan

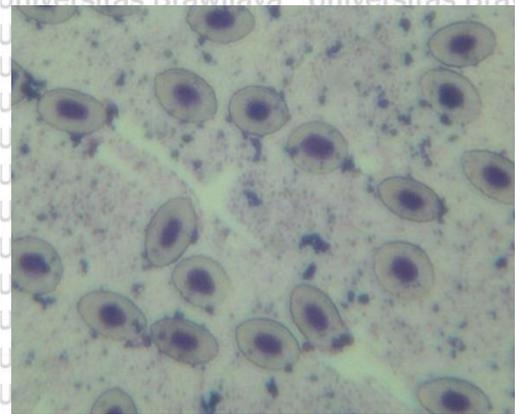


Pemberian Vaksin

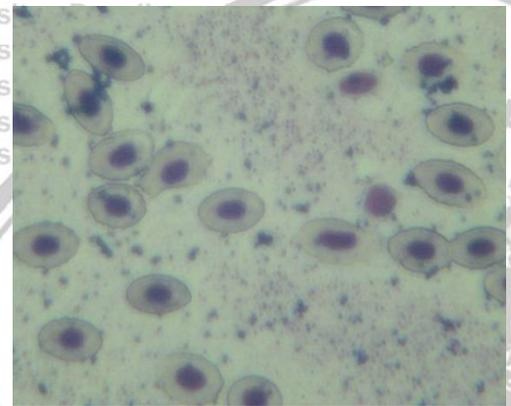
Lampiran 3. Hasil Pengamatan Sel Mikronuklei



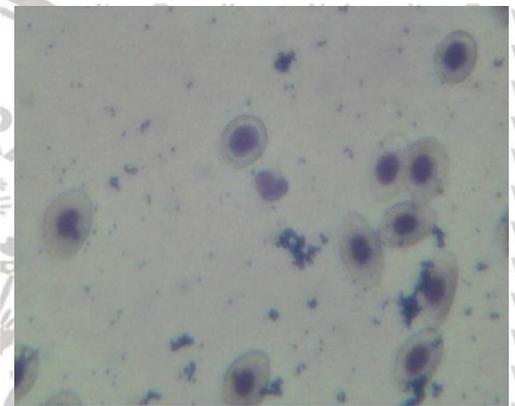
Perlakuan K- (A)



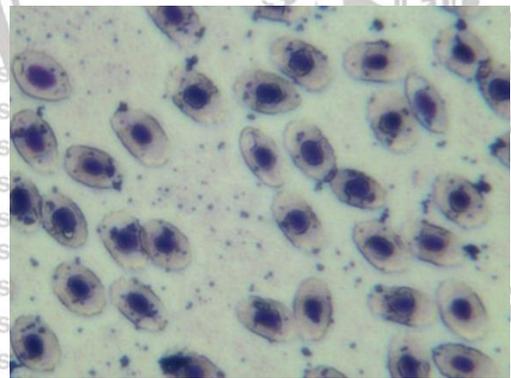
Perlakuan K- (B)



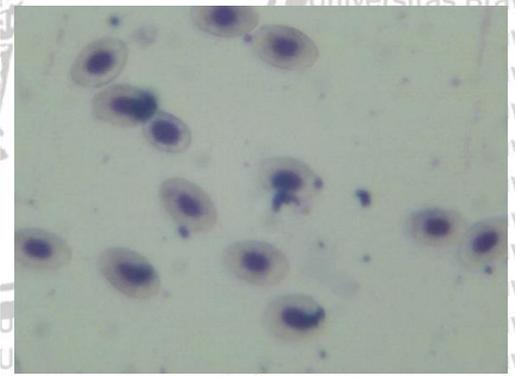
Perlakuan C1 (C)



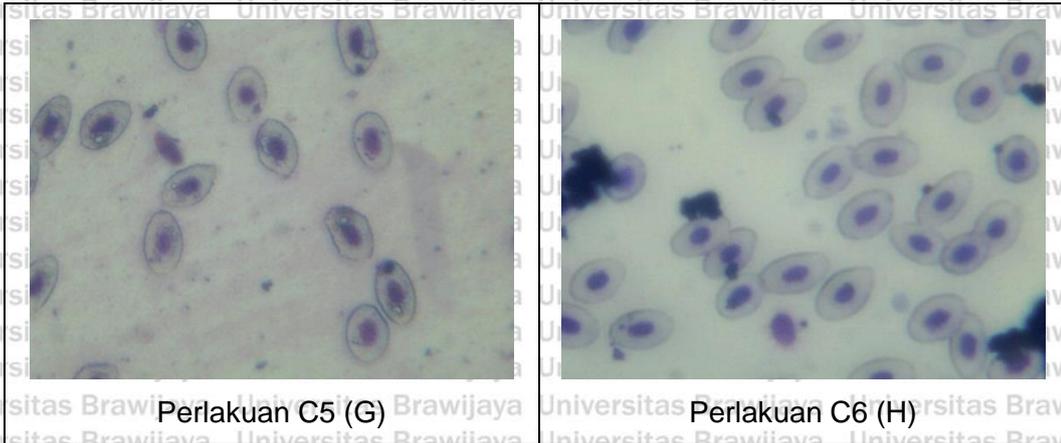
Perlakuan C2 (D)



Perlakuan C3 (E)



Perlakuan C4 (F)



Lampiran 4. Syntax yang digunakan dalam Software R

RAK

```
RAK<-aov(Mikronuklei~perlakuan+hari, data=data_agi)
summary(RAK)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
perlakuan  7 231.11   33.02  13.737 1.11e-09 ***
hari        7  43.86    6.27   2.607  0.0227 *
Residuals 49 117.77    2.40
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Hasil Uji Tukey untuk Perlakuan

```
Tukey <- HSD.test(RAK,"perlakuan", console=TRUE)

Study: RAK ~ "perlakuan"

HSD Test for Mikronuklei

Mean Square Error: 2.40338

perlakuan, means
      Mikronuklei      std r Min Max
C1s Brawijaya 10.500 1.9272482 8  8  14
C2s Brawijaya 12.750 1.4880476 8  11 15
C3s Brawijaya 14.000 0.7559289 8  13 15
C4s Brawijaya 11.125 1.1259916 8  10 13
C5s Brawijaya 10.625 2.6152028 8  8  15
C6s Brawijaya 11.625 1.4078860 8  10 14
K+  16.500 2.4494897 8  14 21
K-  11.750 0.7071068 8  11  13

Alpha: 0.05 ; DF Error: 49
Critical Value of Studentized Range: 4.476579
Minimum Significant Difference: 2.45365
```

Treatments with the same letter are not significantly different.

Mikronuklei groups		
K+	16.500	a
C3	14.000	b
C2	12.750	bc
K-	11.750	bc
C6	11.625	bc
C4	11.125	c
C5	10.625	c
C1	10.500	c

Boxplot untuk Perlakuan

```

grup<-Tukey$groups
grup <- tibble::rownames_to_column(grup, "perlakuan")
grup <- grup[order(grup$perlakuan),]
notasi<-grup$groups
a <- boxplot(data_agi$Mikronuklei ~ data_agi$perlakuan ,
ylim=c(min(data_agi$Mikronuklei) ,
1.1*max(data_agi$Mikronuklei)), ylab="Mikronuklei"
,xlab="Perlakuan", main="")
over <- 0.1*max( a$stats[nrow(a$stats),] )
perlakuan=as.factor(data_agi$perlakuan)
text( c(1:nlevels(perlakuan)) , a$stats[nrow(a$stats),]+over ,
notasi)

```

Hasil Uji Tukey untuk Hari

```

Tukey <- HSD.test(RAK,"hari", console=TRUE)

Study: RAK ~ "hari"
HSD Test for Mikronuklei
Mean Square Error: 2.40338
hari, means
Mikronuklei      std r Min Max
0      14.000  1.069045 8  12  15
1      13.000  1.309307 8  11  15
2      12.875  1.356203 8  11  15
3      12.250  1.982062 8  10  16
4      12.125  1.959410 8  10  16
5      11.625  2.875388 8   8  17
6      11.375  3.420004 8   8  19
7      11.625  4.172615 8   8  21

Alpha: 0.05 ; DF Error: 49
Critical Value of Studentized Range: 4.476579

```

Minimum Significant Difference: 2.45365

Treatments with the same letter are not significantly different.

Mikronuklei groups		
0	14.000	a
1	13.000	ab
2	12.875	ab
3	12.250	ab
4	12.125	ab
5	11.625	ab
7	11.625	ab
6	11.375	b

Boxplot untuk Hari

```

grup<-Tukey$groups
grup <- tibble::rownames_to_column(grup, "hari")
grup <- grup[order(grup$hari),]
notasi<-grup$groups
a <- boxplot(data_agi$Mikronuklei ~ data_agi$hari ,
ylim=c(min(data_agi$Mikronuklei) ,
1.1*max(data_agi$Mikronuklei)), ylab="Mikronuklei" ,xlab="Hari
pengamatan ke-", main="")
over <- 0.1*max( a$stats[nrow(a$stats),] )
hari=as.factor(data_agi$hari)
text( c(1:nlevels(hari)) , a$stats[nrow(a$stats),]+over ,
notasi)

```