

Status Hematologi pada Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.)
yang Terinfeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN) Dengan
Pemberian Rekombinan *Chlorella Vulgaris*

SKRIPSI

Oleh :

SUWANTORO

NIM. 175080101111028



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



Status Hematologin pada Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.) 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 :

SUWANTORO

NIM. 175080101111028



PROGRAM STUDI MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2021

SKRIPSI

Status Hematologi pada Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.) yang Terinfeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN) Dengan Pemberian Rekombinan *Chlorella Vulgaris*

Oleh :

SUWANTORO

NIM. 175080101111028

Telah dipertahankan didepan penguji pada tanggal 14 Juli 2021 dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Mengetahui,
Ketua Jurusan MSP



(Dr. Ir. M. Firdaus, MP.)

NIP.19680919 200501 1 001

Tanggal : 7/22/2021

Menyetujui,
Dosen Pembimbing

(Dr. Uun Yanuhar, S. Pi., M. Si.)

NIP. 19730404 200212 2 001

Tanggal : 7/22/2021



PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Suwantoro

NIM : 17508010111028

Judul Skripsi : Status Hematologi pada Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus sp.*) 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 bertanggungjawab.

Malang, 04 Juli 2021



Suwantoro
NIM.17508010111028

IDENTITAS TIM PENGUJI

Judul : Status Hematologi pada Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.) yang Terinfeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN) Dengan Pemberian Rekombinan *Chlorella Vulgaris*.

Nama Mahasiswa : Suwantoro

NIM : 175080101111028

Program Studi : Manajemen Sumberdaya Perairan

PENGUJI PEMBIMBING

Pembimbing 1 : Dr. Uun Yanuhar, S. Pi., M. Si.

Pembimbing 2 : -

PENGUJI BUKAN PEMBIMBING

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

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

Tanggal Ujian : 14 Juli 2021

UCAPAN TERIMA KASIH

Disampaikan Terima Kasih Kepada :
Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat
Deputi Bidang Penguatan Riset dan Inovasi Nasional

Yang Telah Membiayai Penelitian

Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi (PTUPT) Sesuai dengan Kontrak Penelitian Nomor : 197/SP2H/LT/DRPM/2021, tanggal 18 Maret 2021.

Dengan Judul :

“Produksi dan Aplikasi Vaksin Rekombinan Protein Peridinin P-Percv Chlorella vulgaris untuk Immunostimulan terhadap Virus RNA pada Komoditas Ikan Laut Unggul”

Sebagai Ketua Pelaksana **Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si**

Anggota Tim Penelitian Sebagai Berikut :

1. Nico Rahman Caesar
2. Nur Sakinah Junirahma
3. Suwantoro
4. Muchamad Zam Zam
5. Dila Muna Firdaus
6. Ihda Zulvia Nur Mawaddah
7. Nimas Alificynthiea
8. Delima Ayu Faradilla
9. Jihan Salsabila

Ketua Pelaksana



Dr. Uun Yanuhar, S. Pi., M. Si.

NIP. 19730404 200212 2 001

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Allah SWT yang telah memberikan berkat, rahmat, kesehatan, kelancaran dan kemudahan dalam prosesnya menyelesaikan Laporan Skripsi ini.
2. Orang tua yang telah memberikan doa, motivasi dan semangat sehingga mampu menyelesaikan laporan ini.
3. Ketua Program Studi Manajemen Sumberdaya Perairan Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M. Si. yang telah membantu dan mendukung kegiatan skripsi.
4. Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.Si, selaku dosen pembimbing dan Prof. Dr. Heru Suryanto, ST. MT yang telah memberikan arahan, nasihat, motivasi dan bimbingan kepada saya.
5. Nico Rahman Caesar dan Nina Nur Sakinah Junirahma selaku asisten Bu Uun Yanuhar yang senantiasa memberikan arahan, motivasi dan bimbingan selama kegiatan Skripsi ini berlangsung.
6. Teman-teman tim (*Ephinephelus* sp.) yaitu M. Zam Zami, Nimas Alificynthia, Delima Faradila, Jihan Salsabila, Ihda Zulvia, Dila Muna Firdaus dan Choirul Huda yang telah mau bekerja keras bersama dengan sangat baik dan saling memberikan support satu sama lain.
7. Teman-teman Angkatan Manajemen Sumberdaya Perairan (Eridanus) 2017 dan teman-teman "Koorop VVIP" yang telah bekerjasama dengan baik, yang banyak membantu dalam penyusunan laporan skripsi.

RINGKASAN

Suwantoro. Status Hematologi pada Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.) Yang Terinfeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN) Dengan Pemberian Rekombinan *Chlorella Vulgaris* (dibawah bimbingan **Dr. Uun Yanuhar, S. Pi., M. Si.**)

Penyakit yang sering menginfeksi ikan kerapu salah satunya yaitu *Viral Nervous Necrosis* (VNN) yang dapat menyebabkan kematian massal pada ikan kerapu stadia larva dan juvenile. Pengobatan VNN dilakukan dengan bahan alami salah satunya dengan senyawa bioaktif mikroalga laut. Mikroalga yang memiliki kandungan bahan aktif cukup tinggi yaitu *Chlorella vulgaris*. *C. vulgaris* merupakan jenis mikroalga yang memiliki banyak komponen dan juga memiliki nutrisi yaitu Fragmen Pigmen Protein yang berupa *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP). PCP berguna untuk meningkatkan sistem kekebalan tubuh ikan. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui Status Hematologi pada Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.) Yang Terinfeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN) Dengan Pemberian Rekombinan *C. Vulgaris*. Sampel ikan kerapu didapatkan dari UD. Giso Bangkit, Kab. Situbondo.

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan perlakuan vaksin rekombinan pada ikan kerapu cantang (*Epinephelus* sp.). K- (A): Ikan kerapu sehat, K+ (B): Ikan kerapu sehat dengan penginfeksi VNN, C1 (C): Ikan kerapu sehat dengan pemberian vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* 33 µl, C2 (D): Ikan kerapu sehat dengan pemberian vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* 66 µl, C3 (E): Ikan kerapu sehat dengan pemberian vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* 112 µl, C4 (F): Ikan kerapu cantang dengan penginfeksi VNN dan pemberian vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* 33 µl, C5 (G): Ikan kerapu dengan penginfeksi VNN dan pemberian vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* 66 µl, C6 (H): Ikan kerapu dengan penginfeksi VNN dan pemberian vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* 112 µl. Pemberian vaksin coating menggunakan CFA hari ke-0 hingga hari ke-4 dilanjutkan dengan pemberian coating IFA. Adapun dosis konsentrasi coating vaksin rekombinan baik untuk CFA dan IFA yaitu dosis 8.5 µl perlakuan pemberian vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* 33 µl, 16.5 µl perlakuan pemberian vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* 66 µl, 28 µl perlakuan pemberian vaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* 112 µl. Di dapatkan hasil penelitian yaitu hasil eritrosit terbaik pada perlakuan perlakuan ikan C5 (G) hari ke-6 dengan jumlah eritrosit 300000 sel/mm³. Hasil Leukosit terbaik pada perlakuan ikan C6 (H) hari ke-6 dengan jumlah leukosit 100000 sel/mm³. Hemoglobin diperoleh hasil tertinggi pada perlakuan ikan C6 (H) hari ke-4 dengan konsentrasi hemoglobin 5,3 gram%. Limfosit diperoleh hasil terbaik pada perlakuan ikan sehat hari ke-7 dengan presentase 60%. Basofil diperoleh hasil terbaik pada perlakuan ikan C3 (E) hari ke-3 dan C5 (G) hari ke-7 dengan presentase 17%. Neutrofil diperoleh hasil terbaik pada perlakuan ikan C6 (H) hari ke-7 dengan presentase 8%. Monosit diperoleh hasil terbaik pada perlakuan ikan C2 (D) hari ke-3 dengan presentase 4%. Sedangkan pada analisa kualitas air dikondisikan homogen diperoleh hasil pengukuran suhu berkisar antara 30-31°C, pH berkisar antara 7,50-7,58, oksigen terlarut (DO) berkisar antara 17,2-19,2 ppm dan salinitas juga berkisar antara 30 ppt.

SUMMARY

Suwantoro. Hematological Status of Cantang Grouper (*Epinephelus* sp.) Infected with Viral Nervous Necrosis (VNN) with Recombinant *Chlorella Vulgaris* (under the guidance of **Dr. Uun Yanuhar, S. Pi., M. Si**).

One of the diseases that often infects groupers is Viral Nervous Necrosis (VNN) which can cause mass death in grouper larvae and juvenile stages. VNN treatment is carried out with natural ingredients, one of which is marine microalgae bioactive compounds. Microalgae which has a fairly high content of active ingredients, namely *Chlorella vulgaris*. *C. vulgaris* is a type of microalgae that has many components and also has nutrients, namely Protein Pigment Fragments in the form of Peridinin Chlorophyll Protein (PCP). PCP is useful for boosting the fish's immune system. The purpose of this study was to determine the Hematological Status of Cantang Grouper (*Epinephelus* sp.) Infected with Viral Nervous Necrosis (VNN) with Recombinant *C. vulgaris*. Grouper fish samples were obtained from UD. Giso Bangkit, Kab. Situbondo.

This study used an experimental method with recombinant vaccine treatment on cantang grouper (*Epinephelus* sp.). K- (A): Healthy grouper, K+ (B): Healthy grouper with VNN infection, C1 (C): Healthy grouper with recombinant *Chlorella vulgaris* vaccine 33 I, C2 (D): Healthy grouper with vaccine Recombinant *Chlorella vulgaris* 66 µl, C3 (E): Healthy grouper with recombinant *Chlorella vulgaris* vaccine 112 I, C4 (F): Cantang grouper with VNN infection and administration of recombinant *Chlorella vulgaris* vaccine 33 I, C5 (G): Grouper with VNN infection and recombinant *Chlorella vulgaris* vaccine 66 I, C6 (H): Grouper with VNN infection and 112 I recombinant *Chlorella vulgaris* vaccine. The coating vaccine was given using CFA on day 0 to day 4, followed by IFA coating. The dose of recombinant vaccine coating concentration for CFA and IFA is 8.5 I for treatment with recombinant *Chlorella vulgaris* vaccine 33 I, 16.5 I for treatment with recombinant *Chlorella vulgaris* vaccine 66 I, 28 µl for treatment with recombinant *Chlorella vulgaris* vaccine for 112 I. The results of the study were the best erythrocyte results on the 6th day C5 (G) fish treatment with the number of erythrocytes 300000 cells/mm³. The best leukocyte results were on the 6th day of treatment with fish C6 (H) with a leukocyte count of 100000 cells/mm³. Hemoglobin obtained the highest results on the treatment of fish C6 (H) day 4 with a hemoglobin concentration of 5.3 gram%. Lymphocytes obtained the best results on the 7th day healthy fish treatment with a percentage of 60%. Basophils obtained the best results on the treatment of fish C3 (E) on the 3rd day and C5 (G) on the 7th day with a percentage of 17%. Neutrophils obtained the best results on the 7th day C6 (H) fish treatment with a percentage of 8%. Monocytes obtained the best results in the treatment of fish C2 (D) on the 3rd day with a percentage of 4%. Meanwhile, in the analysis of water quality in homogeneous conditions, the results of temperature measurements ranged from 30-310C, pH ranged from 7.50-7.58, dissolved oxygen (DO) ranged from 17.2-19.2 ppm and salinity also ranged from 30 ppt.

KATA PENGANTAR

Puji serta syukur penulis panjatkan atas kehadiran Allah SWT karena atas berkat dan rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi yang berjudul "**Status Hematologi Darah (Eritrosit, Leukosit, Hemoglobin,**

Limfosit) pada Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.) yang Terinfeksi *Viral*

Nervous Necrosis (VNN) Dengan Pemberian Rekombinan *Chlorella Vulgaris*

Secara *In Vivo*" melalui program payung riset PTUPT 2019-2021. Skripsi ini

disusun sebagai salah satu syarat untuk meraih gelar sarjana di Fakultas

Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang.

Penulis menyadari bahwa laporan skripsi ini masih jauh dari sempurna,

oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran dari semua pihak yang

bersifat membangun agar tulisan ini dapat bermanfaat bagi pihak yang

membutuhkan.

Malang, 23 Juni 2021

Suwantoro

DAFTAR ISI

	Hal
PERNYATAAN ORISINALITAS	i
IDENTITAS TIM PENGUJI	ii
UCAPAN TERIMA KASIH	iii
RINGKASAN	v
SUMMARY	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	1
DAFTAR LAMPIRAN	2
1. PENDAHULUAN	3
1.1 Latar belakang	3
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan	5
1.4 Kegunaan.....	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Ikan Kerapu Cantang (<i>Epinephelus</i> sp.)	7
2.1.1 Klasifikasi Ikan Kerapu Cantang (<i>Epinephelus</i> sp.)	7
2.1.2 Morfologi Ikan Kerapu Cantang (<i>Epinephelus</i> sp.)	8
2.1.3 Reproduksi Ikan Kerapu Cantang (<i>Epinephelus</i> sp.)	9
2.1.4 Makanan Ikan Kerapu Cantang (<i>Ephinephelus</i> sp.).....	9
2.1.5 Habitat Ikan Kerapu Cantang (<i>Ephinephelus</i> sp.).....	10
2.2 Hematologi Ikan Kerapu Cantang (<i>Ephinephelus</i> sp.)	10
2.3 VNN (<i>Viral Nervous Necrosis</i>)	14
2.3.1 Gejala Klinis VNN pada Ikan Kerapu Cantang (<i>Ephinephelus</i> sp.)	15
2.3.2 Transmisi atau Mekanisme Infeksi VNN (<i>Viral Nervous Necrosis</i>)	16
2.3.3 Deteksi Viral Nervous Necrosis (VNN)	18
2.4 Vaksin Rekombinan dari Virus.....	20
2.5 Vaksin Rekombinan <i>Chlorella vulgaris</i>	21
2.6 Produksi Antibodi IgM terhadap Perlakuan Pemberian Vaksin Rekombinan	22
2.7 Parameter Kualitas Air.....	23
2.7.1 Parameter Fisika.....	23
2.7.2 Parameter Kimia	24
3 METODE PENELITIAN	26
3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan.....	26
3.2 Metode Penelitian.....	26
3.2.1 Data Primer.....	26
3.2.2 Data Sekunder.....	28
3.3 Prosedur Penelitian.....	28
3.3.1 Persiapan Alat Dan Bahan.....	28
3.3.2 Sterilisasi Alat	28
3.3.3 Penyediaan Kultur Alga.....	29
3.3.4 Desain Penelitian	30
3.3.5 Produksi Protein Rekombinan <i>C. vulgaris</i>	32



3.3.6 Aklimatisasi Ikan Kerapu Cantang (<i>Ephinephelus</i> sp.).....	32
3.3.7 Uji <i>In-Vivo</i> Vaksin Rekombinan Pada Ikan Kerapu Cantang (<i>Ephinephelus</i> sp.).....	33
3.3.8 Uji Tantang VNN Pada Ikan Kerapu Cantang (<i>Ephinephelus</i> sp.)	34
3.3.9 Analisis Hematologi Ikan Kerapu Cantang (<i>Ephinephelus</i> sp.)....	34
3.3.9 Pengukuran Kualitas Air.....	37
3.3.10 Analisis Data.....	39
4. Hasil dan Pembahasan.....	40
4.1 Aklimatisasi dan Uji <i>In-Vivo</i> Ikan Kerapu Cantang (<i>Ephinephelus</i> sp.)....	40
4.2 Respon Hematologi Ikan Kerapu Cantang (<i>Ephinephelus</i> sp.).....	42
4.2.1 Jumlah Sel Darah Merah (Eritrosit)	42
4.2.2 Jumlah Sel Darah Putih (Leukosit).....	44
4.2.3 Jumlah Hemoglobin (Hb)	45
4.2.4 Diferensial Leukosit.....	46
4.3 Analisis Kualitas Air Ikan Kerapu Cantang (<i>Ephinephelus</i> sp.)	55
4.4 Analisis Data	57
5. Kesimpulan dan Saran	66
5.1 Kesimpulan	66
5.2 Saran	67
DAFTAR PUSTAKA.....	68
LAMPIRAN.....	76



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Ikan Kerapu Cantang	7
2. a). Panjang Ikan Kerapu 6cm, b).Berat Ikan Kerapu 4gr.....	8
3. Virus Nodaviridae.....	15
4. Chlorella vulgaris	22
5. Kultur Mikroalga C. Vulgaris ditambah keterangan	29
6. Desain Penelitian.....	31
7. Ikan Kerapu Dalam Masa Aklimatisasi.....	40
8. a). Hasil pengamatan eritrosit dengan mikroskop perbesaran 400X, b). Eritrosit immanature (panah) dan eritrosit mature.....	43
9. a). Hasil Pengamatan Leukosit dengan Mikroskop Perbesaran 400X, b). Leukosit (Sel Darah Putih)	45
10. Grafik Hasil Perhitungan Hemoglobin (Hb) Ikan Kerapu	45
11. Grafik Diferensial Leukosit Perlakuan Ikan Sehat (Ikan Kerapu Sehat Tanpa Penginfeksi VNN).....	47
12. Grafik Diferensial Leukosit perlakuan Ikan VNN (Ikan Kerapu Sehat Dengan Penginfeksi VNN)	47
13. Grafik Diferensial Leukosit Perlakuan Ikan C1 (Ikan kerapu sehat tanpa penginfeksi VNN dengan pemberian vaksin rekombinan C. Vulgaris konsentrasi 33 µl + 8,5 µl CFA (pada hari ke-0) serta pemberian vaksin rekombinan C. Vulgaris konsentrasi 33 µl + 8,	48
14. Grafik Diferensial Leukosit Perlakuan Ikan C2 (Ikan kerapu sehat tanpa penginfeksi VNN dengan pemberian vaksin rekombinan C. Vulgaris konsentrasi 66 µl + 16,5 µl CFA (pada hari ke-0) serta pemberian vaksin rekombinan C. Vulgaris konsentrasi 66 µl + 1.....	48
15. Grafik Diferensial Leukosit Perlakuan Ikan C3 (Ikan kerapu sehat tanpa penginfeksi VNN dengan pemberian vaksin rekombinan C. Vulgaris konsentrasi 112 µl + 28 µl CFA (pada hari ke-0) serta pemberian vaksin rekombinan C. Vulgaris konsentrasi 112 µl + 2.....	49
16. Grafik Diferensial Leukosit Perlakuan Ikan C4 (Ikan kerapu sehat dengan penginfeksi VNN dan pemberian vaksin rekombinan C. Vulgaris konsentrasi 33 µl + 8,5 µl CFA (pada hari ke-0) serta pemberian vaksin rekombinan C. Vulgaris konsentrasi 33 µl + 8,5 µ.....	49
17. Grafik Diferensial Leukosit Perlakuan Ikan C5 (Ikan kerapu sehat dengan penginfeksi VNN dan pemberian vaksin rekombinan C. Vulgaris konsentrasi 66 µl + 16,5 µl CFA (pada hari ke-0) serta pemberian vaksin rekombinan C. Vulgaris konsentrasi 66 µl + 16,.....	50
18. Grafik Diferensial Leukosit Perlakuan Ikan C6 (Ikan kerapu sehat dengan penginfeksi VNN dan pemberian vaksin rekombinan C. Vulgaris konsentrasi 112 µl + 28 µl CFA (pada hari ke-0) serta pemberian vaksin rekombinan C. Vulgaris konsentrasi 112 µl + 28.....	50
19. Profil Limfosit Ikan kerapu.....	51
20. Profil Basofil Ikan Kerapu.....	52
21. Profil Neutrofil Ikan Kerapu.....	53
22. Profil Monosit Ikan Kerapu.....	54



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil Pengamatan Tingkah Laku Hewan Uji	41
2. Tabel Hasil Perhitungan Sel Darah Merah (eritrosit)	43
3. Tabel Hasil Perhitungan Sel Darah Putih (leukosit)	44
4. Hasil Pengukuran Kualitas Air Ikan Kerapu Cantang (Ephinephelus sp.)	55
5. Analisa Annova Jumlah Sel Darah Merah (Eritrosit)	57
6. Analisa Annova Jumlah Sel Darah Putih (Leukosit)	58
7. Hasil Uji Tukey HSD Sel Darah Merah (Eritrosit)	59
8. Hasil Uji Tukey HSD Sel Darah Putih (Leukosit)	59
9. Analisa Annova Hemoglobin (Hb)	61
10. Analisa Annova Limfosit	66
11. Analisa Annova Basofil	67
12. Analisa Annova Neutrofil	64
13. Analisa Annova Monosit	65



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Lokasi Penelitian.....	76
2. Alat dan Bahan Penelitian.....	76
3. Hasil Pengukuran Jumlah Sel Darah Merah (Eritrosit).....	79
4. Hasil pengukuran Jumlah Sel Darah Putih (Leukosit).....	79
5. Hasil Pengukuran Konsentrasi Hemoglobin (Hb).....	80
6. Hasil Perhitungan Diferensial Leukosit.....	80
7. Hasil pengukuran kualitas air ikan kerapu cantang (Ephinephelus sp.).....	83



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Kerapu merupakan salah satu sumber daya perikanan Indonesia yang paling berharga, dengan nilai ekonomi tinggi dan permintaan ekspor yang signifikan. Jenis ikan kerapu sangat beragam, salah satunya adalah Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.). Sangat penting untuk berkultivasi karena banyaknya permintaan. Namun, ada kendala dalam memproduksi kerapu ini, salah satunya adalah tingkat kelangsungan hidup yang rendah. Tingkat kelangsungan hidup yang rendah disebabkan oleh penyebaran penyakit dalam budidaya, yang dihasilkan oleh berbagai faktor lingkungan, termasuk kualitas air yang buruk, yang membuat ikan Kerapu Cantang rentan terhadap infeksi virus dan bakteri, stres, dan akhirnya kematian (Noor *et al.*, 2018).

Viral Nervous Necrosis (VNN) yang dapat menyebabkan kematian massal pada ikan kerapu terutama pada stadium larva dan juvenil merupakan salah satu penyakit yang sering menyerang ikan kerapu. VNN melemahkan sistem saraf ikan, menyebabkan ikan kehilangan kontrol saraf, kelemahan gerak, dan kematian (Yanuhar, 2011). Dalam penelitian Jaramillo *et al.*, (2018). VNN menargetkan sistem organ saraf mata dan otak, menyebabkan anomali pada ikan yang terkena, menurut para ahli. Sehingga ikan berenang melingkar, mengapung di permukaan dengan perut menghadap ke atas, dan memiliki pigmentasi warna yang lebih gelap.

Pengamatan visual terhadap perilaku dan gejala klinis ikan dapat digunakan untuk mendiagnosis keberadaan VNN. Secara mikroskopis, hematologi darah kerapu dapat diperiksa untuk informasi lebih lanjut (Cozta dan Thompson 2016). Karena hematologi erat kaitannya dengan patologi, maka dapat digunakan untuk mengamati status kesehatan ikan, terutama untuk memperoleh gambaran tentang status kesehatan ikan apakah sehat atau sakit.

Zat alami, seperti bahan kimia bioaktif yang terdapat pada mikroalga laut, seperti *Chlorella vulgaris*, merupakan salah satu strategi untuk memerangi VNN. *Chlorella vulgaris* adalah spesies mikroalga yang antara lain mengandung protein, vitamin, mineral, karbohidrat, lipid, klorofil, dan beta karoten. *C. vulgaris* terdiri dari 58 persen protein, 12-26 persen lemak, 22 persen lemak, dan 4-6 persen karbohidrat. *C. vulgaris* berwarna hijau karena memiliki banyak klorofil a dan b, serta karoten dan xantofil di dalam selnya. Karena sel *C. vulgaris* tidak memiliki flagela dan memiliki protoplasma berbentuk cangkir, mereka tidak dapat bergerak secara aktif (Yanuhar, 2017). *C. vulgaris* memiliki efisiensi fotosintesis 8 persen dan konsentrasi klorofil 28,9 gram per kilogram biomassa. -karoten, astaxanthin, cantaxanthin, lutein, klorofil-, klorofil-, pheophytin-, dan violaxanthin adalah beberapa pigmen yang ditemukan di *C. vulgaris*. Selanjutnya, *Chlorella vulgaris* mengandung banyak nutrisi, termasuk karotenoid dan protein. Protein adalah zat yang paling umum di *C. vulgaris*, terhitung 60% dari total.

Pigment Protein Fragment (FPP), yang diperoleh dari sel dengan mengisolasi protein, adalah salah satu nutrisi lain yang ditemukan dalam *C. vulgaris*. *Peridinin Chlorophyl Protein* (PCP), pigmen yang berfungsi sebagai pemanen cahaya dalam proses fotosintesis, dapat ditemukan pada FPP dari mikroalga *C. vulgaris* (Habshi, 2016). PCP mengandung peridinin, yang merupakan komponen penting. Kemampuan PCP untuk merangsang kekebalan pada ikan kerapu cantang (*Epinhephelus* sp.) sebagai antioksidan kemudian ditentukan oleh hasil produksi PCP ini (Agostini *et al.*, 2018).

Akibatnya, kontrol kualitas air yang komprehensif, termasuk faktor fisik, kimia, dan vaksin, diperlukan untuk manajemen penyakit virus. Selanjutnya salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk menunjang kehidupan ikan adalah dengan pemberian protein rekombinan dari mikroalga. Kelangsungan hidup cenderung

meningkat dengan pemberian protein rekombinan. Selanjutnya, pengiriman protein rekombinan yang diperoleh dari *C. vulgaris* dapat digunakan sebagai pilihan untuk mengatasi kesulitan virus VNN.

1.2 Rumusan Masalah

Gangguan infeksi, khususnya infeksi (VNN) yang disebabkan oleh virus, bakteri, dan mikroorganisme parasit, terus mengganggu kegiatan budidaya Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.), khususnya pembenihan dan pembesaran kerapu. Oleh karena itu, diperlukan teknik vaksinasi dengan vaksin supernatan protein rekombinan pada tubuh ikan kerapu cantang. Berikut rumusan masalah dalam penelitian ini, berdasarkan uraian sebelumnya:

1. Bagaimana keadaan hematologi Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.) yang terinfeksi VNN?
2. Bagaimana pengaruh pemberian protein rekombinan *Chlorella vulgaris* pada Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.) yang terinfeksi VNN terhadap hematologi Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.) yang terinfeksi VNN?

1.3 Tujuan

Berikut ini adalah tujuan pemeriksaan status hematologi darah Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.) yang terinfeksi *viral nervous necrosis* (VNN) setelah pemberian protein rekombinan *chlorella vulgaris*:

1. Menganalisis kondisi hematologi Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.) yang terinfeksi VNN.
2. Menganalisis respon in-vivo kerapu terinfeksi VNN terhadap injeksi *Chlorella vulgaris* rekombinan pada hematologi Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.).

1.4 Kegunaan

Penelitian ini dapat digunakan sebagai sumber dan solusi untuk permasalahan ikan kerapu yang terserang *Viral Nervous Necrosis*, khususnya

Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp). Penelitian ini juga dapat diterapkan pada pengobatan *Viral Nervous Necrosis* (VNN) yang menyerang berbagai spesies ikan.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.)

2.1.1 Klasifikasi Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.)

Menurut Rahmaningsih dan Ari (2013), ikan kerapu memiliki prospek masa depan yang sangat baik. Kerapu termasuk dalam subfamili *Epinephelinae*, yang mencakup 161 spesies dari 15 genera. Pada umumnya ikan kerapu merupakan hermaprodit protogini, artinya ikan juvenil berjenis kelamin betina dan matang menjadi jantan. Menurut Subyakto dan Cahyaningsih (2003), kerapu dapat diklasifikasikan sebagai berikut:



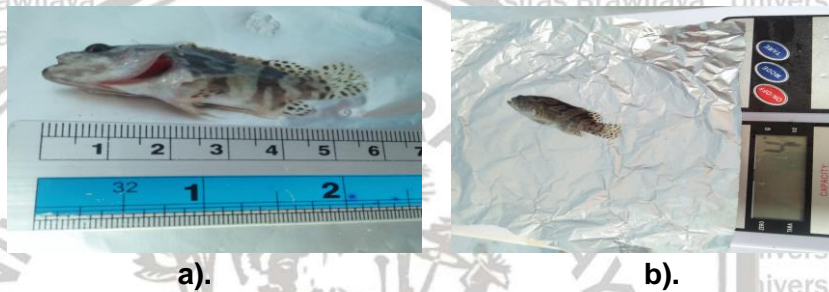
Gambar 1. Ikan Kerapu Cantang (Dokumentasi PTUPT, 2021)

Keterangan : Panjang Ikan 8 cm dan berat ikan 6 gr

Filum : Chordata
Subfilum : Vertebrata
Kelas : Osteichthyes
Subkelas : Actinopterigi
Ordo : Percomorphi
Subordo : Percoidea
Family : Serranidae
Genus : *Epinephelus*
Spesies : *Epinephelus* sp.

2.1.2 Morfologi Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.)

Lebar tubuh kerapu cantang ini lebih kecil dari panjang dan tinggi tubuhnya, dan kerapu genus *Epinephelus* ditutupi dengan bercak coklat, kuning, putih, atau merah. Tubuh dilapisi sisik ctenoid dan sirip kecil. Mulut ikan kerapu besar, condong ke atas, dan bibir bawah agak menonjol di atas bibir atas. Kerapu memiliki gigi yang tajam dan kuat di rahang atas dan bawahnya. Sirip perut terletak di bawah sirip dada. Sirip ekor ikan kerapu bulat, sedangkan sirip punggung soliter dan memanjang, dengan jari-jari keras dan lunak yang hampir identik (Kordi, 2001).



Gambar 2. a). Panjang Ikan Kerapu 6cm, b). Berat Ikan Kerapu 4gr (Dokumentasi PTUPT, 2021).

Kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*), kerapu kertang (*Epinephelus lanceolatus*), kerapu batik (*Epinephelus polypekadion*), kerapu bebek (*Chromileptes altivelis*), dan lain-lain memiliki morfologi yang berbeda. Bentuk tubuh pipih, lebar tubuh kurang dari panjang dan tinggi tubuh, mulut lebar, sirip ekor melingkar merupakan beberapa morfologi ikan kerapu. Perutnya tersembunyi di bawah sirip dada, dan tubuhnya ditutupi sirip kecil berlapis sisik stenoid. Selanjutnya, kerapu cantang memiliki panjang tubuh 6 cm, berat badan 4 g, dan diameter 4,8 cm (Mariskha dan Abdulgani, 2012).

Mulut ikan kerapu besar dan condong ke depan, dengan bibir bawah menjulur ke atas. Rahang atas dan bawah masing-masing memiliki deretan gigi dua baris yang tajam dan kokoh, dengan gigi terbesar di tepi depan. Sirip ekor ikan ini biasanya membulat (*rounded*). Perut bagian bawah agak putih, dan tubuhnya

memiliki bintik-bintik merah kecoklatan dengan latar belakang coklat. Ada tambahan 4-6 baris warna gelap yang membentang sampai ke ekor. Tubuhnya ditutupi sisik-sisik kecil berkilau dengan pola bergaris-garis (Fajriani, 2011).

2.1.3 Reproduksi Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.)

Ikan kerapu merupakan hermaphrodit protogini yang betina saat dewasa hingga dewasa (maturitas gonad) dan kemudian berubah menjadi jantan saat sudah tua. Dalam kondisi alami, transisi dari perempuan ke laki-laki membutuhkan waktu yang lama. Setelah mencapai umur 2,0–2,5 tahun, peralihan dari betina ke jantan terjadi pada kerapu cantang. Ikan biasanya masih betina setelah berumur 1,5 sampai 2,5 tahun. Ikan jantan adalah mereka yang telah mencapai umur 2,5 tahun (Khordi dan Andi Tamsil, 2010). Ada dua cara untuk menentukan jenis kelamin ikan kerapu jantan dan betina: memanfaatkan tabung mikro (kanulasi) yang mampu menghisap telur atau sperma dan menggunakan pendekatan *sequencing*. Saat ikan kerapu betina dipijat, ia akan melepaskan telurnya, namun kerapu jantan tidak.

Aktivitas pemijahan, umur, indeks jenis kelamin, dan ukuran ikan kerapu semuanya berperan dalam perubahan jenis kelamin. Di Balai Perikanan Budidaya Air Payau Situbondo sendiri induk jantan kerapu kertang berukuran sangat besar yaitu kerapu cantang mencapai 100 kg sedangkan kerapu macan betina mencapai kurang lebih 4,5 kg. Ikan kerapu bertelur pada malam hari di habitat aslinya, antara jam 8 malam dan jam 3 pagi untuk menarik perhatian, kerapu jantan biasanya akan berenang melingkar kemudian mengikuti kerapu betina. Kerapu jantan akan mengeluarkan sperma setelah kerapu betina melepaskan telurnya, dan sperma akan membuahi sel telur (Subyakto dan Cahyaningsih, 2003).

2.1.4 Makanan Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.)

Kerapu merupakan ikan karnivora yang memakan semua jenis ikan kecil-kecil (Rahmaningsih, 2016). Makanan yang dikirim ke ikan kerapu di kolam memiliki

kebiasaan dilahap sebelum sampai ke dasar. Jadi pakan sudah habis sampai ke dasar tambak, dan jika melihat pakan di dasar tambak, itu artinya ikan kerapu sudah mulai penuh. Jenis *Crustaceae* (udang) termasuk rebon, dogol, dan krosok, serta ikan kecil seperti tembang, teri, dan belanak, menjadi favorit ikan kerapu.

Ikan rucah, seperti ikan lidah, ikan tembang, teri, dan berbagai jenis ikan kecil lainnya, biasanya dijual dengan harga Rp. 3000-4000/kg di hatchery Bancar Mutiara Pantai. Pakan ini berasal dari pengumpul ikan di pelabuhan. Namun, terkadang diperoleh langsung dari nelayan setelah mereka selesai memancing. Ikan rucah yang diumpangkan ke ikan biasanya berumur 3 minggu saat pertama kali ditebar.

2.1.5 Habitat Ikan Kerapu Cantang (*Ephinephelus* sp.)

Secara umum, ikan kerapu merupakan ikan yang hidup di dasar perairan dengan kisaran habitat yang meliputi pantai (*coastal area*) dan perairan karang (*coral reef*). Kerapu adalah ikan *euryhaline*, yang berarti mereka dapat bertahan hidup di salinitas mulai dari 12 hingga 35 bagian per juta, tetapi mereka membutuhkan 22 hingga 32 bagian per juta untuk berkembang. Habitat ikan kerapu ditemukan di perairan Indonesia. Padang, Bengkulu, Kepulauan Seribu, Karimunjawa, Bawean, Flores, Kalimantan Timur, dan Sulawesi Selatan.

Ikan kerapu menurut Kordi (2001), dapat hidup di lingkungan berbatu. Suhu antara 24 dan 31°C, salinitas antara 30 dan 33 ppt, kadar oksigen terlarut lebih dari 3,5 ppm, dan pH antara 7,8 dan 8,0 sangat ideal untuk pertumbuhan kerapu.

2.2 Hematologi Ikan Kerapu Cantang (*Ephinephelus* sp.)

Hematologi adalah disiplin ilmu yang mempelajari darah, khususnya struktur, fungsi, dan kualitas komponen sel darah, serta aliran darah. Hematologi sering digunakan untuk mendeteksi perubahan fisiologis yang disebabkan oleh lingkungan yang penuh tekanan, dan juga terkait dengan status kesehatan ikan, parameter yang digunakan secara luas sebagai indeks dalam menentukan status kesehatan

ikan. Total sel darah merah, sel darah putih, hemoglobin, dan limfosit biasanya diperiksa untuk melihat tingkat stres, sedangkan kadar kortisol dan glukosa darah sering diukur untuk melihat tingkat stres (Samsisko *et al.*, 2014).

Hematologi adalah ilmu yang mempelajari tentang komponen darah dan kelainan fungsi sel darah. Hematologi terkait dengan patologi, dan digunakan untuk menentukan apakah ikan itu sehat atau sakit. Sel darah, khususnya leukosit atau sel darah putih, memiliki peran dalam sistem kekebalan tubuh ikan (Johnny *et al.*, 2003). Hematologi dapat digunakan untuk mendeteksi perubahan fisiologis akibat cekaman lingkungan, serta perubahan kesehatan ikan. Total sel darah merah, sel darah putih, hemoglobin, dan hematokrit semuanya digunakan sebagai indeks untuk menentukan status kesehatan ikan. Sedangkan kadar kortisol dan glukosa darah diperiksa untuk mengetahui tingkat stres (Samsisko *et al.*, 2014).

a. Eritrosit

Sel yang paling umum adalah eritrosit (sel darah merah). Inti eritrosit diletakkan di tengah sitoplasma dan akan tampak bening kebiruan bila diwarnai dengan Giemsa. Peran utama eritrosit adalah untuk mengangkut hemoglobin dan dengan demikian oksigen dari paru-paru ke jaringan. Ukuran sel darah itu sendiri juga berkontribusi pada jumlah eritrosit yang sangat besar. Ukuran dan jumlah eritrosit sangat terkait, dengan jumlah eritrosit menurun seiring dengan peningkatan ukuran eritrosit, dan sebaliknya (Yuni *et al.*, 2019).

Karena ikan telah beradaptasi dengan suhu media pemeliharaan lingkungannya, nilai eritrositnya mengalami penurunan. Stres pada ikan menyebabkan peningkatan nilai eritrosit darah. Keadaan lingkungan yang buruk yang tidak lagi sesuai untuk kehidupan ikan, seperti kurangnya oksigen di dalam air, dapat menyebabkan ikan menjadi stres. Peningkatan sel darah merah merupakan upaya ikan untuk mempertahankan homeostasis tubuh guna meningkatkan

kemampuan hemoglobin dalam mengikat oksigen. Ikan yang hidup di perairan rendah oksigen akan mengalami hematopoiesis yang menyebabkan eritrositnya meningkat untuk mengimbangi penambahan oksigen (Zulkarnain *et al.*, 2017).

b. Leukosit

Sel darah putih, juga dikenal sebagai leukosit, adalah jenis sel darah yang membantu produksi antibodi. Peningkatan leukosit menandakan peningkatan produksi antibodi. Ketika tubuh tidak sehat, lebih banyak leukosit dibuat, dan jumlah leukosit dalam sirkulasi darah lebih kecil daripada jumlah eritrosit. Leukosit berperan penting dalam pertahanan seluler dan humoral organisme melawan racun asing. Sel darah putih membantu dalam memerangi infeksi. Jumlah eritrosit dan leukosit tergantung pada spesies, kondisi makanan, dan faktor lainnya. Selanjutnya, komponen organik seperti glukosa, lemak, urea, dan asam urat, serta faktor lingkungan dan musim, semuanya berpengaruh signifikan terhadap kuantitas eritrosit dan leukosit (Yuni *et al.*, 2019).

Pada ikan, leukosit merupakan salah satu sistem pertahanan tubuh yang non spesifik. Leukopenia mengacu pada penurunan jumlah leukosit, sedangkan leukositosis mengacu pada peningkatan jumlah leukosit. Jumlah leukosit pada ikan akan terpengaruh jika kesehatan ikan terganggu. Jika ikan terinfeksi virus, jumlah leukosit dalam tubuhnya akan tinggi, dan ikan akan berusaha melawan virus dengan meningkatkan jumlah leukosit. Jumlah leukosit dalam tubuh ikan akan kembali normal jika tidak terinfeksi virus (Saparuddin *et al.*, 2017).

c. Hemoglobin (Hb)

Pigmen merah yang membawa oksigen hemoglobin ditemukan dalam sel darah merah. Hemoglobin adalah protein dengan kandungan zat besi yang tinggi. Tugas hemoglobin adalah mengikat oksigen, yang kemudian digunakan untuk membuat energi dalam proses katabolisme. Jumlah hemoglobin dalam darah

menentukan kemampuan darah untuk mengikat oksigen. Ketika ikan terinfeksi virus VNN, mereka mengeluarkan bahan kimia beracun yang mengganggu aliran darah yang bertanggung jawab untuk mengangkut nutrisi dan oksigen, mengurangi kemampuan hemoglobin untuk mengikat oksigen (Saparuddin, 2018). Hemoglobin (Hb) bertanggung jawab untuk membawa gas oksigen utama dari insang ke seluruh sel dan organ tubuh, serta mentransfer nutrisi ke dalam sel dan mengeluarkan sisa metabolisme. Kadar Hb yang rendah dapat mengindikasikan kekurangan protein dalam pakan, defisiensi nutrisi, atau infeksi pada ikan. Sebaliknya, kadar Hb yang tinggi menunjukkan bahwa ikan mengalami stres (Yuni *et al.*, 2019).

Metode Sahli dapat digunakan untuk menghitung konsentrasi hemoglobin pada ikan kerapu tikus. Temuan prosedur ini diberikan dalam gram persen setelah menganalisis kesamaan warna sampel perlakuan dengan warna standar pada instrumen sahli (Saparuddin, 2018). Purwanto *et al.*, (2019) mengklaim menggunakan metode Sahli untuk menghitung kadar hemoglobin. Tabung Sahlinometer yang diisi dengan larutan HCl 0,1 N sampai 0°C digunakan untuk mengukur kadar hemoglobin (garis bawah tabung Sahlinometer). Akuades ditambahkan secara bertahap dengan dropper droplet sambil diaduk dengan glass stirrer sampai warna identik dengan rona standar. Konsentrasi hemoglobin diukur dalam g/dL atau g%.

d. Diferensial Leukosit

Metode Blaxhall dan Daisley (1973) digunakan untuk menghitung jenis leukosit, yang meliputi pengambilan darah ikan, pembuatan preparat apusan darah pada slide, pengeringan, kemudian fiksasi dengan larutan metanol 95 persen, pembilasan dengan air suling, pengeringan, dan pewarnaan dengan Giemsa. 50 persen selama 2 menit. Setelah itu dibilas dan dikeringkan sebelum diperiksa di bawah mikroskop pada perbesaran 400X. Limfosit, basofil, neutrofil, dan monosit

termasuk di antara leukosit yang ditemukan. Kemudian hitung hingga 100 sel dan gunakan rumus berikut untuk menghitung :

$$\text{Jumlah Leukosit Total (\%)} = \text{Komponen Sel Leukosit}/100 \times 100\%$$

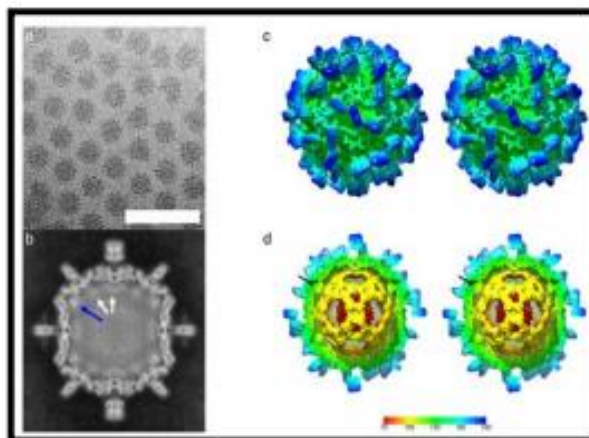
2.3 VNN (*Viral Nervous Necrosis*)

Bakteri *betanodavirus*, juga dikenal sebagai *Viral Nervous Necrosis*, menyebabkan kematian massal pada lebih dari 50 spesies ikan budidaya yang bernilai ekonomi tinggi di Indonesia dan di seluruh dunia (Liu *et al.*, 2015). Virus ini termasuk dalam famili *Nodaviridae*, Genus *Betanodavirus*, dan merupakan virus neuropatogenik yang menyebabkan *Viral Nervous Necrosis* (VNN) dan kerusakan sistem saraf pusat pada ikan. *Betanodavirus* secara tradisional telah dibagi menjadi empat genotipe berdasarkan urutan RNA2 mereka: *Neural necrosis virus of the striped jack*, *tiger puffer nerve necrosis virus*, *nervous necrosis virus of the redspot grouper nerve (RGNNV)*, dan *nervous necrosis virus of the barfin flounder*. Perilaku berenang yang tidak terkoordinasi atau tak terduga, serta hilangnya nafsu makan, merupakan indikator klinis infeksi VNN pada ikan (Su *et al.*, 2015).

Betanodavirus adalah virus RNA bulat yang kecil dan tidak berlapis. 180 molekul protein kapsid tunggal (CP) yang disintesis dari segmen RNA2 membungkus genom RNA bipartit untai tunggal (+). Segmen RNA1 VNN mengkodekan RNA *polymerase-dependent RNA (RdRp)*, yang bertanggung jawab untuk replikasi genom virus dan dapat mengaktifkan interferon tipe I dalam sel ikan melalui faktor regulasi interferon 3 (Zhou *et al.*, 2019).

Dengan memaparkan ikan yang sakit ke air yang terkontaminasi VNN dan spesies lain seperti bakteri air, *Viral Nervous Necrosis* (VNN) dapat menyebar secara horizontal. *Betanodavirus* juga dapat disebarkan oleh makanan alami seperti plankton. *Betanodavirus* dapat ditularkan secara vertikal ke keturunan telur yang

dibuahi melalui indukan atau benih ikan yang diperoleh pada awalnya (Yanuar *et al.*, 2016).



Gambar 3. Virus Nodaviridae (Kok Lian Ho *et al.*, 2017)

Keterangan : a). Populasi Nodaviridae, b). Kapsid tampak dari depan, c). Morfologi pada partikel dinding virus dan d). Penampang internal virus.

VNN pertama kali ditemukan pada tahun 1990 di pembenihan ikan kakatua Jepang (*Opregnathus fasciatus*) dan dipelihara di Australia, tetapi juga menginfeksi *D. Labrax*, kerapu (*Epinephelus akaara*), *Pseudocaranx dentex*, dan guppy (*Poecilia reticulata*). VNN ini dapat ditemukan pada berbagai sistem budidaya, baik di laut maupun di darat, baik pada suhu hangat maupun dingin (Toffan *et al.*, 2017). VNN telah mengidentifikasi hampir semua habitat budidaya ikan laut di daerah tropis, terutama pada periode juvenil (Novriadi *et al.*, (2014).

2.3.1 Gejala Klinis VNN pada Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus sp.*)

Menurut Nita *et al.* (2019), Penelitian indikator awal VNN adalah perilaku berenang yang tidak teratur yang disebabkan oleh hilangnya keseimbangan, yang menyebabkan ikan bergerak secara spiral di dekat puncak air. Selain perubahan pigmentasi dan rona yang lebih dalam yang menunjukkan situasi stres, ikan yang terinfeksi tidak menunjukkan gejala yang terlihat pada permukaan tubuh atau insang. Kerapu yang terkena juga dapat mengalami perut kembung, serta kebiasaan menyimpang termasuk lesu dan anoreksia.

Ikan yang terinfeksi umumnya menunjukkan ketidakteraturan dalam berenang, kandung kemih yang tidak teratur, penglihatan, dan kolorektosis dapat dideteksi setidaknya dengan gejala klinis menurut Wang *et al.*, (2019). Warna terang di hati, saluran pencernaan kosong dengan usus yang dipenuhi cairan kehijauan, dan bercak merah di limpa adalah tanda-tanda makroskopik dari kondisi tersebut. Serangan VNN pada larva dan remaja telah terbukti membunuh hingga 95% larva dan 30% remaja.

Kerapu Cantang (*Ephinephelus* sp.) yang terinfeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN) akan menunjukkan gejala klinis yang berbeda, menurut penelitian yang dilakukan oleh Zorriehzakra, (2020). Hal ini berkaitan dengan umur ikan, kualitas perairan saat itu, dan daya tahan tubuh ikan. Kerapu Cantang muda lebih rentan terhadap *Viral Nervous Necrosis* (VNN) (*Ephinephelus* sp.). Hal ini disebabkan oleh lemahnya daya tahan tubuh Kerapu Cantang (*Ephinephelus* sp.) muda.

2.3.2 Transmisi atau Mekanisme Infeksi VNN (*Viral Nervous Necrosis*)

Sebagai titik awal injeksi, VNN berpotensi menyerang Sistem Saraf Pusat (SSP) melalui sirkulasi darah. Infeksi VNN dapat menyebar baik dalam arah vertikal maupun horizontal. VNN merupakan virus yang menyerang larva ikan dan menyebar secara vertikal. Telah terdeteksi di jaringan ovarium, sperma, telur yang dibuahi, dan larva yang menetas. Kehadiran virus dalam sperma juga telah dibuktikan, dengan infeksi sel telur berikutnya selama pembuahan. Virus diperkirakan dibawa dalam gonad ibu serta organ lain (hati, ginjal, lambung, dan usus), dengan multiplikasi virus terjadi selama stres pemijahan. Selama pemijahan, virus dilepaskan dari gonad induk dan saluran pencernaan, menginfeksi telur, sperma, atau larva. Infeksi horizontal terjadi pada media hidup ikan melalui badan air. Setelah berhasil memasuki sel inang, virus akan berkembang biak di lokasi yang dianggap dapat diterima, yang biasanya adalah kantung renang. Selain itu, efek

replikasi virus akan meluas dari sumsum tulang belakang ke otak, lalu ke retina.

Virus VNN masuk ke saluran hidung dan kemudian berjalan ke saraf penciuman, umbi jaringan otak, medula oblongata, dan akhirnya retina (Cozta dan Thompson, 2016).

Menurut Wahyudi *et al.* (2018), mekanisme VNN dapat masuk dan direspon, yaitu sinyal bahaya dari infeksi virus yang dapat mengaktifkan APC (*antigen presenting cell*). Molekul reseptor protein yang diproduksi oleh sel-sel stres, seperti interferon dan protein kejutan panas, digunakan dalam model ini. Gen Hsp (*Heat shock protein*) telah dipelajari di sejumlah organisme yang berbeda. Setelah stimulasi sublethal yang berbahaya, respons sengatan panas adalah mekanisme yang dilestarikan secara evolusioner untuk mempertahankan homeostasis seluler.

Fisiologi ikan, pertumbuhan dan penuaan, fisiologi stres dan endokrinologi, imunologi, fisiologi lingkungan, ketahanan stres, dan aklimatisasi semuanya dipengaruhi oleh protein kejutan panas. Protein *heat shock* diperlukan dalam metabolisme protein dan memiliki peran konstitutif dalam sel-sel yang tidak berada di bawah tekanan. Infeksi virus menekan spesies akuatik, menyebabkan kelainan dan gangguan pada homeostasis protein sebagai akibat dari sintesis protein stres seluler.

Dalam penelitian Sudaryatma *et al.* (2012), menemukan bahwa virus penyebab VNN dapat menginfeksi ikan melalui tiga cara: melalui sel epitel saluran pencernaan, melalui akson pada permukaan sel, dan melalui sirkulasi darah. Ikan yang terinfeksi virus VNN melalui injeksi intramuskular menginfeksi ikan dengan bereplikasi di sitoplasma atau nukleus serat otot rangka, kemudian menyebar dan bereproduksi di sistem saraf tepi, dan akhirnya langsung masuk ke sistem saraf pusat. Ikan kohabitasi dapat terinfeksi VNN setelah virus masuk ke dalam air melalui kontak dengan permukaan tubuh (lendir, sirip, dan otot), termasuk melalui

mulut, yang dapat menginfeksi sel epitel pada sistem saluran pencernaan. Ini disebut sebagai "penyakit yang ditularkan melalui air". Virus yang masuk ke dalam tubuh melalui kulit dapat berkembang biak secara langsung di epitel permukaan saluran pencernaan kemudian masuk ke sistem saraf pusat melalui sistem saraf tepi (Saraf Vagus).

Strategi serangan yang digunakan VNN dimulai dengan penempelan virus diduga ke sel inang target melalui glikosaminoglikan dan protein heat shock. Salah satu syarat virus untuk masuk ke sel inang dan menyebarkan infeksi adalah virus tersebut menempel pada sel yang rentan. Virus ini akan melepaskan materi genetik virus untuk memanipulasi sel inang setelah berhasil memasuki sel yang rentan. Ini diperlukan untuk replikasi virus untuk maju ke langkah berikutnya. Virus akan mengendalikan kondisi biologis sel inang, dan akan mulai mengaktifkan pertahanan bawaan sel inang, sinyal di sel inang, serta transkripsi dan translasi di sel inang. Virus akan bereplikasi di sel inang mitokondria. Ini menyebabkan stres pada retikulum endoplasma dan meningkatkan regulasi protein glukosa sepanjang fase awal hingga pertengahan perbanyakan virus (GRP). Virus VNN kemudian akan terus bereplikasi dan memproduksi protein virus, yang mengakibatkan kerusakan mitokondria. Akibatnya, potensial membran mitokondria (MMP) hilang, dan sitokrom C dilepaskan. Setelah langkah ini berhasil diselesaikan, infeksi VNN terjadi, yang mengakibatkan kematian sel inang (Low *et al.*, 2017).

2.3.3 Deteksi Viral Nervous Necrosis (VNN)

Berikut metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi virus VNN dalam penelitian ini :

a. Ekstraksi RNA (VNN)

Pada penelitian ini, RNA diekstraksi dari organ target ikan kerapu cantang untuk mendapatkan RNA virus saraf nekrosis virus. Organ otak merupakan organ

target penyebaran VNN pada benih ikan kerapu cantang. Berikut tahapan berdasarkan (SNI 7546,1: 2015):

1. Masukkan organ target sebanyak 20-50 mg ke dalam tabung mikro 1,5 ml.
2. Tuang 500 l larutan ekstraksi kit RNA (TRIzol®) ke dalam tabung mikro, giling hingga halus dengan penggiling pastel, dan diamkan selama 5 menit pada suhu 25-30°C.
3. Tambahkan 100 l kloroform dan vortex selama 15 detik sebelum diinkubasi selama 2-3 menit pada suhu kamar.
4. Sentrifugasi pada suhu 40°C selama 15 menit dengan kecepatan 12000 x g (12000 rpm r = 6 cm).
5. Pindahkan 200 liter supernatan ke microtube segar, kemudian tambahkan 200 liter isopropanol dan vortex selama 15 detik.
6. Pada 40°C, sentrifus pada 12000 x g selama 10 menit.
7. Supernatan dikumpulkan dan langsung digunakan, kemudian disimpan dalam deep freezer pada suhu -200C, atau -800C jika akan digunakan dalam waktu lama.

b. Amplifikasi

Setelah ekstraksi RNA, dilakukan proses amplifikasi dengan Go Taq® Green Master Mix (promega) dan primer:

F2 : 5'-CGTGTCAGTCATGTGTCGCT-3'

R3 : 5'-CGAGTCAACACGGGTGAAGA-3'

NF2 : 5'-GTTCCCTGTACAACGATTCC-3'

NR3 : 5'-GGATTTGACGGGGCTGCTA-3'

Pada 294 bp, pasangan primer spesifik VNN F2 dan R3 dan NF2 dan NR3 diidentifikasi.

2.4 Vaksin Rekombinan dari Virus

Vaksin rekombinan terdiri dari antigen yang diproduksi oleh protein rekombinan. Vaksin yang efektif dalam mencegah infeksi penyakit virus pada ikan laut dan dapat diproduksi secara komersial di Indonesia merupakan upaya alternatif yang dimulai dengan inventarisasi penyakit dan penyediaan vaksin yang efektif dalam mencegah infeksi penyakit virus pada ikan laut dan dapat diproduksi secara komersial di Indonesia. Di Indonesia, penyakit virus pada ikan laut dapat diproduksi secara komersial. Mayoritas vaksinasi komersial untuk budidaya ikan laut berasal dari negara lain. Vaksin virus terhadap isolat lokal masih belum tersedia secara luas. Item yang diproduksi secara genetik, seperti protein rekombinan, saat ini tersedia sebagai vaksinasi. Karena diduga vaksinasi rekombinan dapat menghasilkan residu pada manusia setelah memberi makan ikan, penggunaan vaksin rekombinan dalam budidaya ikan terus menimbulkan pro dan kontra. Namun, memilih vaksin rekombinan adalah hal yang berbeda karena vaksin inaktif yang dibuat dengan perbanyakan virus *in vitro* sulit dibuat, tidak stabil, dan biaya penyimpanan isolat virus tinggi. Memasukkan gen virus ke dalam vektor yang diproduksi dalam sel bakteri yang kompeten menghasilkan vaksin rekombinan. Teknik kloning mahal, tetapi biaya pembuatannya rendah karena pemeliharaan dan perbanyakan gen rekombinan dapat dilakukan terus-menerus dengan menumbuhkan sel bakteri yang mengandung gen rekombinan.

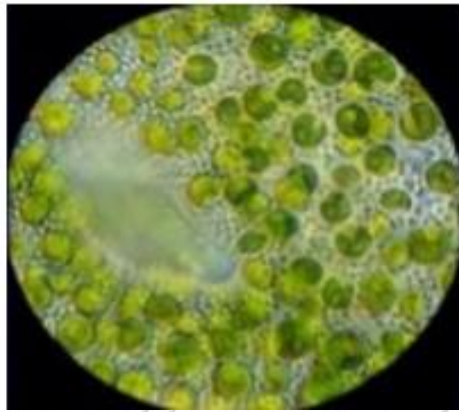
Vaksin VNN jack bergaris (isolat dari *piscine Nodavirus*) juga telah terbukti meningkatkan jumlah antibodi spesifik rT2 hingga 20 hari setelah imunisasi. Setelah ditantang dengan virus VNN, ternyata vaksin rekombinan VNN terbukti efisien dalam meningkatkan kekebalan larva kerapu lumpur dengan RPS: 64,2 persen - 69,5 persen (Lin *et al.*, 2007). Isolat vaksin kapsid protein VNN rekombinan dari

Indonesia juga telah diteliti dan dibuat di laboratorium, dan terbukti dapat melindungi kerapu itik dari infeksi VNN (Mahardika *et al.*, 2016).

Di laboratorium, vaksin protein rekombinan yang dibuat dari dinding sel dan virus GSDIV MCP (*major capsid protein*) juga terbukti berhasil. Menurut RPS (*relative persentase kelangsungan hidup*) yang diperoleh, vaksin ini mampu meningkatkan daya tahan tubuh kerapu bebek terhadap infeksi virus GSDIV, khususnya 40 persen -58 persen tanpa bahan pembantu dan 50 persen -70 persen dengan bahan pembantu (Mahardika *et al.*, 2016). Vaksin rekombinan GSDIV digunakan bersama dengan vaksinasi *polivalen Vibrio sp.* Setelah ditantang dengan virus GSDIV (tiga bulan pasca vaksinasi), titer antibodi dan nilai RPS Kerapu Cantang (*Ephinephelus sp.*) meningkat hingga 84 persen (Zafran, 2016). Penggunaan vaksinasi ini pada fase awal budidaya ikan di pembenihan dianggap penting untuk meningkatkan daya tahan ikan sebelum dimasukkan ke dalam kolam atau keramba jaring apung.

2.5 Vaksin Rekombinan *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris adalah mikroalga uniseluler mikroskopis hijau yang selnya memiliki diameter 3-8 mikrometer, berbentuk bulat seperti bola dan bulat telur, tidak memiliki flagela dan karenanya tidak dapat bergerak secara aktif, dan memiliki dinding sel selulosa dan pektin. Ada satu nukleus dan satu kloroplas di setiap sel. *Chlorella vulgaris* adalah ganggang di seluruh dunia yang dapat ditemukan di air payau, laut, dan air tawar. Dinding sel kaku mikroalga *Chlorella* terdiri dari selulosa dan pektin. Satu nukleus dan satu kloroplas ditemukan di setiap sel. *Chlorella* dapat bergerak sangat lambat sehingga memberikan kesan tidak bergerak (Apriliyanti *et al.*, 2016). *C. vulgaris* diklasifikasikan sebagai berikut menurut Yanuhar *et al.*, (2019):



Sumber : (Randrianarison *et al.*, 2018)

Gambar 4. *Chlorella vulgaris*

Keterangan : Sel berbentuk bulat seperti bola

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

C. vulgaris adalah mikroalga bersel tunggal (uniseluler) soliter yang juga dapat ditemukan dalam koloni atau kelompok. *C. vulgaris* memiliki bentuk bulat atau elips dengan diameter 2-12 mikron. *C. vulgaris* berwarna hijau karena memiliki banyak klorofil a dan b, serta karoten dan xantofil di dalam selnya. Karena sel *C. vulgaris* tidak memiliki flagela dan memiliki protoplasma berbentuk cangkir, mereka tidak dapat bergerak secara aktif (Yanuhar dan Khumaidi, 2017).

2.6 Produksi Antibodi IgM terhadap Perlakuan Pemberian Vaksin Rekombinan

Teknologi mikroenkapsulasi digunakan untuk menguji reaksi vaksinasi rekombinan pada ikan kerapu yang diuji dengan vaksin fersiti agar menghasilkan respon yang optimal dan terukur. Adanya titer antibodi yang dihasilkan dalam tubuh

inang ditunjukkan dengan adanya respon antibodi IgM pada ikan. Pembentukan sel imun seperti makrofag dapat digambarkan dengan respon IgM yang terukur seperti sitokin, limfokin, interleukin, dan kelompok diferensiasi sel untuk beberapa nama. Tingginya respon protein hemaglutinin dapat ditunjukkan dengan salah satu pengukuran titer antibodi *in-vivo* dari terapi vaksin. Adanya proliferasi antigen-antibodi menunjukkan bahwa antibodi yang dihasilkan dalam sel inang atau hewan uji memiliki respons sensitivitas yang tinggi.

Hal ini dapat ditunjukkan oleh fakta bahwa semakin tinggi titer antibodi yang dihasilkan, semakin banyak sel eritrosit, leukosit, dan limfosit yang berproliferasi.

2.7 Parameter Kualitas Air

2.7.1 Parameter Fisika

a. Suhu

Karena ikan bersifat poikilothermic, artinya mereka mengikuti suhu air di habitatnya, suhu adalah salah satu elemen terpenting di perairan. Suhu ini berpotensi mengubah nafsu makan, laju metabolisme, kelarutan oksigen, dan pertumbuhan spesies akuatik. Hal ini sesuai dengan literatur, menurut Mulyani *et al.*, (2014), suhu dapat mengubah rasa lapar ikan; jika suhu naik, nafsu makan ikan juga meningkat; di sisi lain, jika suhu turun, proses polusi dan metabolisme melambat. Akibatnya, suhu memiliki dampak yang signifikan terhadap pertumbuhan dan kelangsungan hidup biota air; Secara umum, kenaikan suhu mendorong ikan untuk tumbuh lebih cepat. Jika suhu di kolam berfluktuasi secara dramatis, baik terlalu tinggi maupun terlalu rendah, dapat mengakibatkan kematian.

Setiap aktivitas organisme dapat dilakukan secara maksimal jika disimpan pada suhu yang tepat. Kisaran suhu ideal untuk ikan kerapu, menurut Dedi (2018) adalah 25 – 32°C. Akibat suhu ideal tersebut, pertumbuhan ikan kerapu terus berlanjut. Suhu dapat memiliki efek tidak langsung pada biota air dengan

mempengaruhi kelarutan oksigen dalam air; semakin tinggi suhu, semakin rendah kelarutan oksigen dalam air, dan sebaliknya.

2.7.2 Parameter Kimia

a. Derajat Keasaman (pH)

Derajat keasaman atau kebasaaan suatu larutan diukur dalam pH, yang merupakan satuan pengukuran. Aktivitas ion hidrogen dalam larutan ditunjukkan dengan derajat keasaman, atau pH, air. Pada suhu tertentu, konsentrasi ion hidrogen (dalam mol per liter) dinyatakan. Semakin tinggi jumlah ion H⁺, semakin rendah konsentrasi ion H⁻, sehingga air bersifat asam (pH<7).

Kisaran pH yang menguntungkan untuk kelangsungan hidup kerapu menurut Qomariyah *et al.* (2017), adalah antara 6,5 dan 9. Karena pH berdampak pada kehidupan mikroorganisme di dalam air, maka berdampak pada kesuburan air. Oksigen terlarut akan berkurang di perairan asam, Karena oksigen terlarut yang berkurang, laju pernapasan kerapu cantang meningkat dan nafsu makannya turun. Ketika air bersifat basa, kebalikannya terjadi.

b. Oksigen Terlarut (*Dissolved oxygen*)

Karena oksigen terlarut (DO) terlibat dalam penghancuran unsur organik dan anorganik, ini merupakan indikator penting kualitas air. Semua tubuh membutuhkan oksigen terlarut untuk respirasi, metabolisme, atau pertukaran bahan kimia yang menyediakan energi untuk pertumbuhan dan reproduksi. Oksigen terlarut memiliki dampak yang signifikan terhadap kehidupan organisme, termasuk ikan, dan oleh karena itu diperlukan untuk keberadaannya di dalam air. Aktivitas kerapu cantang bergantung pada oksigen terlarut. Menurut Megawati (2014), oksigen terlarut dalam air digunakan oleh makhluk air untuk respirasi dan penguraian bahan organik oleh mikroorganisme. Difusi dan proses fotosintesis fitoplankton merupakan sumber utama oksigen dalam air laut. Oksigen terlarut adalah tanda kesuburan air dan

salah satu pendukung utama kehidupan laut. Ini karena adanya oksigen, yang dibutuhkan bakteri untuk mengubah bahan organik menjadi bahan anorganik..

Kisaran oksigen terlarut yang optimum untuk kelangsungan hidup ikan kerapu, menurut Qomariyah *et al.* (2017), >5 ppm. Meskipun ikan tertentu dapat bertahan hidup di perairan dengan kadar oksigen terlarut serendah 3 ppm. Namun, sebagian besar biota air, khususnya ikan, dapat tumbuh dan berkembang secara efektif pada kisaran oksigen terlarut 5 ppm. Beberapa spesies ikan yang dapat bertahan hidup pada kadar oksigen terlarut <4 ppm kehilangan nafsu makan dan menjadi kurus.

Jika ini terus berlanjut, sistem kekebalan ikan akan memburuk, dan ikan akan mati.

c. Salinitas

Konsentrasi semua ion terlarut dalam air dikenal sebagai salinitas. Karbonat, klorida, bikarbonat, sulfat, natrium, kalsium, dan magnesium termasuk di antara ion-ion ini. Untuk ikan, tekanan osmotik air dipengaruhi oleh salinitas. Tekanan osmotik pada ikan meningkat dengan meningkatnya salinitas.

Menurut Affan (2011), kerapu tumbuh subur pada kisaran salinitas 27 hingga 34 bagian per seribu. Ini adalah salinitas yang dapat ditahan oleh kerapu, termasuk kerapu macan, kartang, cantang, dan batik. Menurut Nursida (2011), salinitas air yang digunakan untuk kegiatan pembenihan harus antara 28 dan 32 ppt untuk meningkatkan pertumbuhan ikan. Agar ikan dapat tumbuh dan berkembang dengan tepat dan cepat.

3 METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret - Juni 2021. Pengambilan sampel dan pengamatan Kerapu Cantang (*Ephinephelus* sp.) di UD. Giso Bangkit Situbondo, Lab. Biomol, Lab. BIOSAINS, Balai BKIPM Juanda Surabaya II, dan Lab. BPBAP Situbondo Jawa Timur.

3.2 Metode Penelitian

Metode eksperimental digunakan dalam penelitian ini. Menambahkan bahwa penelitian eksperimental dapat dianggap sebagai pendekatan penelitian yang digunakan untuk menentukan pengaruh beberapa perlakuan pada variabel lain di bawah pengaturan terkontrol, penelitian eksperimental adalah penelitian yang bertujuan untuk menemukan pengaruh faktor-faktor tertentu pada variabel lain dengan kontrol yang ketat. Penelitian eksperimental menggunakan eksperimen yang terorganisir dengan cermat untuk mendapatkan informasi yang dibutuhkan untuk menjawab pertanyaan penelitian. Peneliti memodifikasi suatu stimulan, perlakuan, atau setting eksperimental selama percobaan, kemudian mengamati efek dari perlakuan tersebut (Sugiyono, 2012).

3.2.1 Data Primer

Data yang diperoleh atau dikumpulkan langsung di lapangan oleh orang yang melakukan penelitian atau yang bersangkutan disebut sebagai data primer. Hematologi Kerapu Cantang (*Ephinephelus* sp.) yang terserang *Viral Nervous Necrosis* (VNN) dengan pemberian protein rekombinan *Chlorella vulgaris* merupakan data primer yang dikumpulkan dalam penelitian ini. Data primer dikumpulkan dengan wawancara langsung dengan informan menggunakan

kuesioner menurut Pentury *et al.*, (2016). Data ini diperoleh secara langsung dengan mengamati dan mencatat apa yang telah dilakukan di lapangan.

a. Observasi dan Pengamatan

Menurut Black dan Champion (1999), observasi adalah pendekatan alami yang penerapannya harus disesuaikan dengan kondisi dan kebutuhan peneliti, serta signifikansi topik dan tujuan penelitian secara keseluruhan. Pengamatan ini digunakan untuk memastikan bahwa data yang dikumpulkan di lapangan akurat.

b. Wawancara

Wawancara adalah kegiatan yang melibatkan percakapan verbal dengan tujuan mengumpulkan informasi. Anda tidak hanya akan menerima tampilan lengkap, tetapi Anda juga akan mendapatkan informasi yang berguna (Black and Champion, 1999). Wawancara adalah suatu strategi pengumpulan data yang digunakan peneliti untuk memperoleh informasi dari orang-orang yang dapat menyumbangkan informasi kepada mereka melalui diskusi dan pertemuan tatap muka. Wawancara membutuhkan komunikasi yang efektif dan efisien antara peneliti dan subjek sehingga pada akhirnya dapat diperoleh data yang akurat (Kartikasari *et al.*, 2016).

c. Dokumentasi

Dokumentasi adalah metode pengumpulan informasi dari sisa-sisa tertulis seperti arsip, seperti buku-buku tentang teori, pendapat, perselisihan, dan hukum, dengan menganalisis, mendokumentasikan, dan menggandakan dokumen atau catatan (Subakti *et al.*, 2016). Semua jenis tindakan yang mendukung penelitian hematologi ikan kerapu cantang (*Epinhephelus* sp.) yang terinfeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN) dengan pemberian protein rekombinan *Chlorella vulgaris* akan didokumentasikan selama penelitian.

3.2.2 Data Sekunder

Data sekunder dikumpulkan dari sumber sekunder seperti laporan literatur pendukung, organisasi pemerintah, pihak swasta yang terkait, dan masyarakat umum. Data sekunder adalah informasi atau data yang telah diperoleh dan dilaporkan untuk tujuan tertentu atau sebagai pengetahuan ilmiah oleh seseorang (Sani dan Maftukhatusolikah, 2015).

3.3 Prosedur Penelitian

Ada berbagai langkah yang harus dilakukan sebelum melakukan penelitian, antara lain:

3.3.1 Persiapan Alat Dan Bahan

Penelitian ini memanfaatkan teknologi mutakhir. Tujuannya adalah untuk membuat tugas penelitian lebih mudah, dan waktu yang dihabiskan untuk melakukannya lebih singkat dan lebih efisien. **Lampiran 1** berisi daftar alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini.

3.3.2 Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat merupakan salah satu hal terpenting yang harus dilakukan sebelum melakukan penelitian di laboratorium. Sterilisasi dilakukan dengan tujuan menghilangkan semua jenis kuman berbahaya dari peralatan penelitian untuk memperoleh data yang benar dan dapat diterima. Menurut Waluyo (2008), bahan atau peralatan steril yang digunakan dalam mikrobiologi harus memusnahkan bakteri yang tidak diantisipasi keberadaannya, menyebabkan gangguan atau kerusakan pada media, serta mengganggu kehidupan dan proses yang sedang dikerjakan. Sterilisasi didefinisikan sebagai prosedur fisik, kimia, atau mekanis yang menghancurkan semua jenis kehidupan, terutama mikroba.

3.3.3 Penyediaan Kultur Alga

Kultur *Chlorella vulgaris* dapat dilakukan dalam tiga tahap: skala carboy, skala menengah, dan skala massa. Kultur *Chlorella vulgaris* ukuran carboy merupakan kultur skala kecil yang terdiri dari kultur agar, tabung reaksi, Erlenmeyer, dan carboy yang dilakukan dalam toples 10 liter. Kegiatan budidaya pada ukuran sedang dilakukan di bak fiber dengan volume 1 ton (1000 liter) dan diisi air hingga 1/3 volume bak fiber. Di ruang terbuka, kultur skala menengah dilakukan. Atap ruangan terbuat dari fiber, sehingga sinar matahari tidak langsung dapat masuk.

Budidaya *Chlorella vulgaris* secara besar-besaran, yang dilakukan di kolam beton (Menegol *et al.*, 2017).



Gambar 5. Kultur Mikroalga *C. Vulgaris* (Dokumentasi PTUPT, 2021)
Keterangan : a). Kultur Mikroalga dalam Tabung Gelas 2000mL, b). Proses Penyaringan Mikroalga *C. Vulgaris*.

Kultur mikroalga *Chlorella vulgaris* diperoleh dari budidaya mikroalga *Chlorella vulgaris*. Hasil yang dikumpulkan dan disaring dari budaya ini kemudian digunakan. Setelah itu dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan larutan jernih dari biomassa mikroalga *Chlorella vulgaris*. Biomassa mikroalga *Chlorella vulgaris* berupa pellet dan larutan bening berupa supernatan merupakan hasil sentrifugasi. Supernatan dihilangkan, hanya menyisakan pelet, yang selanjutnya digunakan untuk membuat vaksin rekombinan (Rafaelina *et al.*, 2016).

3.3.4 Desain Penelitian

Desain penelitian Status Hematologi Darah (Eritrosit, Leukosit, Hemoglobin, Limfosit) pada Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.) Yang Terinfeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN) Dengan Pemberian Rekombinan *Chlorella Vulgaris* Secara *In Vivo* dengan 8 perlakuan sebagai berikut :

K⁻ (A) : Ikan kontrol negatif, ikan kerapu sehat tanpa penginfeksian VNN maupun pemberian vaksin protein rekombinan *C. vulgaris*.

K⁺ (B) : Ikan kontrol positif, ikan kerapu sehat dengan penginfeksian VNN dan tanpa pemberian vaksin rekombinan *C. Vulgaris*.

C1 (C) : Ikan kerapu sehat tanpa penginfeksian VNN dengan pemberian vaksin rekombinan *C. Vulgaris* konsentrasi 33 µl + 8,5 µl CFA (pada hari ke-0) serta pemberian vaksin rekombinan *C. Vulgaris* konsentrasi 33 µl + 8,5 µl IFA (pada hari ke-4).

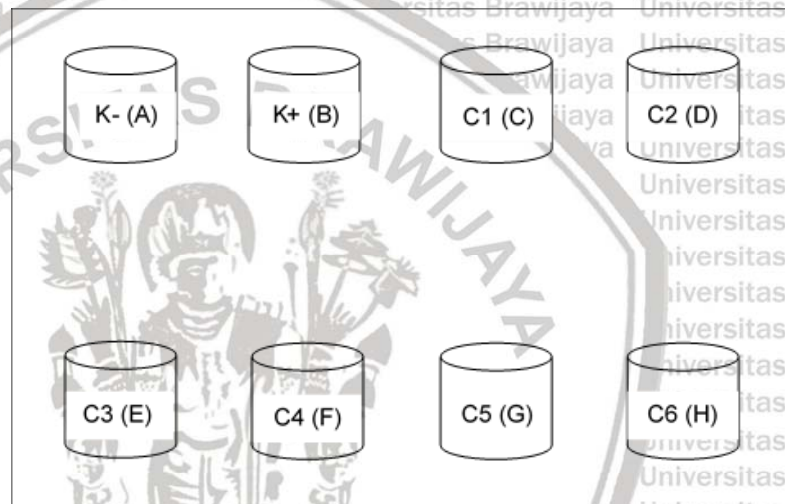
C2 (D) : Ikan kerapu sehat tanpa penginfeksian VNN dengan pemberian vaksin rekombinan *C. Vulgaris* konsentrasi 66 µl + 16,5 µl CFA (pada hari ke-0) serta pemberian vaksin rekombinan *C. Vulgaris* konsentrasi 66 µl + 16,5 µl IFA (pada hari ke-4).

C3 (E) : Ikan kerapu sehat tanpa penginfeksian VNN dengan pemberian vaksin rekombinan *C. Vulgaris* konsentrasi 112 µl + 28 µl CFA (pada hari ke-0) serta pemberian vaksin rekombinan *C. Vulgaris* konsentrasi 112 µl + 28 µl IFA (pada hari ke-4).

C4 (F) : Ikan kerapu sehat dengan penginfeksian VNN dan pemberian vaksin rekombinan *C. Vulgaris* konsentrasi 33 µl + 8,5 µl CFA (pada hari ke-0) serta pemberian vaksin rekombinan *C. Vulgaris* konsentrasi 33 µl + 8,5 µl IFA (pada hari ke-4).

C5 (G) : Ikan kerapu sehat dengan penginfeksi VNN dan pemberian vaksin rekombinan *C. Vulgaris* konsentrasi 66 μ l + 16,5 μ l CFA (pada hari ke-0) serta pemberian vaksin rekombinan *C. Vulgaris* konsentrasi 66 μ l + 16,5 μ l IFA (pada hari ke-4).

C6 (H) : Ikan kerapu sehat dengan penginfeksi VNN dan pemberian vaksin rekombinan *C. Vulgaris* konsentrasi 112 μ l + 28 μ l CFA (pada hari ke-0) serta pemberian vaksin rekombinan *C. Vulgaris* konsentrasi 112 μ l + 28 μ l IFA (pada hari ke-4). Desain penelitian seperti pada **Gambar 6**.



Gambar 6. Desain Penelitian (Dokumentasi PTUPT, 2021)

3.3.5 Produksi Protein Rekombinan *C. vulgaris*

Produksi *C. vulgaris* merupakan hasil penelitian (Yanuhar, 2015; Yanuhar et al., 2020). Uji nanodrop digunakan untuk mengetahui konsentrasi hasil isolasi.

Vaksin rekombinan kemudian diproduksi dan diperbanyak menggunakan teknik kloning, yaitu dengan transformasi menjadi *E. Coli* menggunakan vektor pTA2, dan dikonfirmasi dengan RT-PCR menggunakan primer T3 (3'-CTTTAGTGA GGTTAAT-5') dan T7 Promoter (3'-TAATACGACTCACTATAGGG-5') untuk mendeteksi gen vaksin rekombinan dalam DNA plasmid. Kemudian hasil kloning dan propagasi disimpan dalam bentuk stok gliserol, yang selanjutnya digunakan fase pelet (DNA plasmid) sebagai perlakuan dalam penelitian ini sebagai protein rekombinan *C. vulgaris*.

3.3.6 Aklimatisasi Ikan Kerapu Cantang (*Ephinephelus* sp.)

Ikan Kerapu Cantang (*Ephinephelus* sp.) digunakan sebagai ikan uji dengan ukuran panjang 5 sampai 10 cm. Jumlah ikan pada setiap media adalah dua belas ekor. Di UD Giso Bangkit Situbondo dilakukan aklimatisasi. Menurut Yanuhar (2011), proses aklimatisasi pada Kerapu Cantang (*Ephinephelus* sp.) adalah ikan tidak segera diberi perlakuan karena membutuhkan waktu untuk menyesuaikan diri dengan media pemeliharaan yang baru. Setelah ikan tampak sehat dan agresif, pengobatan diberikan. Perlakuan diberikan secara adlibitum yaitu diberikan sedikit demi sedikit sampai ikan kenyang, dengan tujuan untuk meminimalkan pengendapan sisa perlakuan yang tidak termakan di dasar kolam sehingga mengakibatkan penurunan kualitas air di kolam ikan. Selanjutnya dilakukan pengukuran kualitas air seperti suhu, pH, DO, dan salinitas untuk menjaga kondisi lingkungan kerapu cantang.

3.3.7 Uji *In-Vivo* Vaksin Rekombinan Pada Ikan Kerapu Cantang (*Ephinephelus* sp.)

Menurut Alimuddin *et al.* (2014), protein rekombinan dapat diberikan dengan tiga cara: (1) dengan injeksi, (2) dengan perendaman/perendaman, dan (3) dengan pemberian oral. Yanuhar *et al.*, (2019), diekstraksi secara kasar dari mikroalga laut dan kemudian diberikan secara oral kepada ikan kerapu dengan ukuran 7-10 cm (metode oral). Uji *In-vivo* dilakukan secara oral (Sonde) dengan menggunakan *feeding tube* selama masa penelitian. Karena pengujian *In-vivo* akan langsung masuk ke saluran pencernaan dalam tubuh ikan, metode sonde digunakan karena menghasilkan temuan terbaik. Pada hari ke 0 dan 5, partisipan diberikan ekstrak kasar dari mikroalga sebanyak tiga kali. Dosis perlakuan adalah 33 g/mL ekstrak *Chlorella vulgaris* (hasil uji klinis). Dosis yang berbeda mengacu pada Irawanto *et al.*, (2018) yang menggunakan dosis yang berbeda yaitu 33 μ l, 66 μ l, dan 112 μ l. Pada setiap siklus, dosis ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* yang diberikan dihitung dengan membandingkan dosis stok ekstrak kasar hasil spektrofotometri dengan bobot ikan.

Dosis ekstrak kasar *C. vulgaris* disesuaikan dengan bobot badan ikan, menurut Mashita *et al.*, (2019). Perhitungan dosis ini dilakukan untuk mencapai hasil yang sebaik mungkin. Sedangkan menurut Mashita *et al.*, (2019); Irawanto *et al.*, (2018), VNN diberikan kepada ikan kerapu dengan memotong pakan dari ikan yang terinfeksi menjadi potongan-potongan kecil dan memberikannya secara oral.

3.3.8 Uji Tantang VNN Pada Ikan Kerapu Cantang (*Ephinephelus* sp.)

Uji tantang dengan VNN dilakukan pada hari ke-5 dan ke-10, menurut Mahardika dan Mastuti (2019). Dalam penelitian ini, VNN diberikan secara oral pada sampel ikan kerapu cantang dengan memotong kecil-kecil daging ikan yang positif terinfeksi VNN sebanyak 5 gram per ekor. Kemudian dilakukan observasi, dengan tujuan untuk melihat perubahan perilaku ikan kerapu cantang (*Ephinephelus* sp.) dari normal menjadi menyimpang, serta gejala spesifik seperti berenang yang tidak menentu.

3.3.9 Analisis Hematologi Ikan Kerapu Cantang (*Ephinephelus* sp.)

a. Eritrosit

Protein hemoglobin, yang membawa sebagian besar oksigen (O₂) dan sebagian kecil karbon dioksida, merupakan komponen utama eritrosit (CO₂). Organ hematopoietik, yang meliputi ginjal dan limpa, memproduksi eritrosit. Jumlah eritrosit yang dapat berfungsi dengan baik berkurang jika organ ini tidak mampu membuat darah untuk menggantikan darah yang telah terinfeksi oleh patogen. Setelah bakteri terinfeksi VNN, jumlah eritrosit menurun. Organ hematopoietik pada ginjal dan limpa dapat memproduksi eritrosit untuk menggantikan sel eritrosit yang terinfeksi VNN hingga meningkat menjadi jumlah eritrosit normal ketika jumlah sel yang terinfeksi dan VNN dalam sel darah berkurang (Saparuddin *et al.*, 2017).

Larutan Hayem adalah larutan yang digunakan untuk menghitung eritrosit (berfungsi untuk membunuh sel darah putih). Yanuhar *et al.*, (2019) menggunakan perhitungan berikut untuk mengkonversi jumlah sel darah merah yang dihitung:

$$\sum \text{Erythrocyte} = \text{Sel Eritrosit yang dihitung} \times \text{pengencer} : \text{Volume}$$

b. Leukosit

Sel darah putih, sering dikenal sebagai leukosit, adalah sel darah dengan nukleus. Karena termasuk kromatin, yang membawa DNA, inti sel dalam leukosit bertugas mengangkut materi genetik. Sel darah putih memiliki butiran dalam sitoplasmanya, yang digunakan untuk sintesis protein dan proses sintesis lainnya. Jumlah sel darah putih dalam tubuh ikan dapat digunakan untuk menentukan kesehatan ikan secara keseluruhan (Firani, 2018).

Menurut Utami *et al.* (2013), sampel darah dicampur dengan larutan Turk dan skala 11 digunakan untuk menghitung jumlah leukosit. Darah diaduk dalam pipet dengan cara mengayunkan tangan yang memegang pipet dengan gerakan angka delapan selama 3-5 menit, hingga tercampur rata. Tetesan pertama larutan darah dalam pipet dibuang, diikuti dengan penempatan sampel darah pada hemositometer dan terakhir penutup kaca penutup. Jumlah leukosit dapat ditentukan sebanyak lima kotak dengan menggunakan rumus di bawah ini:

$$\text{Total Leukosit} : \text{Jumlah sel leukosit terhitung} \times 50 \text{ sel/mm}^3$$

c. Hemoglobin (Hb)

Tabung sahli digunakan untuk menempatkan sampel darah dan HCL, pipet sahli digunakan untuk mengambil sampel darah dengan cara dihisap, pipet digunakan untuk meneteskan larutan HCL ke dalam tabung sahli, dan timer digunakan untuk menentukan waktu perhitungan Hb pada ikan kerapu. Sedangkan bahan yang digunakan untuk mengamati hemoglobin adalah sampel darah ikan yang telah diberi anti koagulan HCL 0,1 N untuk pembentukan asam hemotin dan aquadest untuk pengenceran, bahan yang digunakan untuk mengamati hemoglobin adalah sampel darah ikan yang telah diberikan anti koagulan HCL 0,1 N untuk pembentukan asam hemotin dan aquadest untuk pengenceran. Metode

sahlinometer digunakan untuk mengetahui kadar hemoglobin menurut Putra, (2015). Ide dasar di balik prosedur ini adalah menggunakan asam klorida untuk mengubah hemoglobin dalam darah menjadi asam hemotin. Berikut ini adalah proses untuk memperkirakan konsentrasi hemoglobin:

1. Menghisap darah dari apendiks dengan pipet Sahli set ke skala 20 mm³.
2. Masukkan tabung hemoglobin ke dalam skala 10 dengan larutan HCL 0,1 N.
3. Putar tabung hemoglobin untuk menghomogenkan darah dengan larutan HCL.
4. Biarkan tabung pada rak hemoglobin selama 3-5 menit agar hemoglobin bereaksi dengan HCL dan menghasilkan asam hemotin.
5. Tambahkan aquadest sedikit demi sedikit sampai warna sama dengan warna biasa.
6. Skala strip gram/100 ml digunakan untuk menentukan jumlah hemoglobin dalam gram per 100 ml darah.

d. Diferensial Leukosit

Sediaan apus darah digunakan untuk melakukan perhitungan diferensial leukosit ikan kerapu. Langkah-langkah berikut diambil untuk mempersiapkan preparat apusan: Pada slide pertama, darah diendapkan pada permukaan yang bersih. Kaca objek kedua, yang berfungsi sebagai dudukan, diposisikan di depan kaca objek pertama, Ujung kaca objek ketiga kemudian diletakkan di atas kaca objek pertama, membentuk sudut 45°. Gelas objek ketiga didorong ke arah kaca objek kedua sampai lapisan kecil darah terbentuk, dan kemudian dikeringkan. Sampel difiksasi selama 5 menit dalam metanol 95 persen, kemudian diangkat dan dibiarkan kering di udara. Preparat diwarnai dengan larutan giemsa dan dibiarkan selama 15 menit dalam wadah pewarnaan. Kemudian diangkat, dibersihkan di bawah air mengalir, dan dikeringkan. Setelah itu, sampel yang telah disiapkan diperiksa di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Diferensial leukosit

(limfosit, basofil, neutrofil, dan monosit) dihitung hingga 100 sel, kemudian limfosit, basofil, neutrofil, dan monosit dihitung secara terpisah (Kurniawan *et al.*, 2013).

Menurut Amlacher (1970), proses pendugaan diferensial leukosit dimulai dengan memegang gelas objek dengan telunjuk dan ibu jari. Dengan menggunakan gelas objek bersih di sebelah kanan, cipratkan sedikit darah. Kemudian, pada sudut 300°, posisikan gelas objek lain di sebelah kiri tetesan darah. Tarik gelas objek ke kanan sampai bersentuhan dengan darah. Setelah darah menyebar di sepanjang tepi gelas item kedua, tekan ke kiri sambil mempertahankan sudut 300° untuk menghasilkan slide darah yang cukup tipis agar mudah diamati. Evaluasi kemudian dikeringkan di udara terbuka. Darah mungkin diwarnai dengan pewarna Giemsa agar lebih mudah dilihat.

Teknik pewarnaan darah dengan giemsa, menurut Hartika *et al.* (2014), darah yang baru dioleskan pada gelas objek terlebih dahulu dikeringkan di udara (*air fixation*), kemudian difiksasi selama 5 menit dalam larutan metanol. Setelah itu, preparat apus direndam selama 15 menit dalam larutan Giemsa encer (1:20). Setelah itu, bilas dengan air suling dan biarkan kering secara alami. Setelah itu, sampel yang telah disiapkan diperiksa di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x.

3.3.9 Pengukuran Kualitas Air

Kualitas air di budidaya kerapu seragam. Berikut ini adalah beberapa pengukuran kualitas air:

1. Suhu

Termometer batang digunakan untuk mengukur suhu (termometer Hg).

Metodologi pengukuran adalah sebagai berikut, sesuai dengan Pedoman BPAP 2019:

- Celupkan termometer Hg ke dalam air dengan membelakangi lampu selama 3 sampai 5 menit, atau sampai skala pada termometer Hg menunjukkan angka tertentu.
- Saat masih di dalam air, perhatikan skala yang ditunjukkan oleh termometer Hg dan hindari menyentuhnya dengan tangan.

2. Derajat Keasaman (pH)

Pengukuran pH dilakukan dengan kertas pH atau pH pen, menurut Aprilliyanti *et al.* (2015). Berikut ini adalah prosedur pengukuran:

- Siapkan kertas pH atau pH pen.
- Sebelum menggunakan air suling, kalibrasi terlebih dahulu kertas pH atau pH pen.
- Celupkan pH pen ke dalam air, lalu periksa angka di layar pH pen. Catat pembacaan skala atau angka pada layar pH pen.
- Distanalisasi kembali setelah digunakan.

3. Oksigen terlarut (*Dissolved oxygen*)

Pengukuran DO dilakukan dengan DO meter, menurut Putriana (2015).

Langkah-langkah berikut termasuk dalam proses pengukuran:

- Menyiapkan DO meter
- Kalibrasi DO meter menggunakan aquades
- Rendam DO meter dalam air sampel selama 1 sampai 2 menit
- Mengaktifkan perangkat dengan menekan tombol ON dan menunggu nomor di layar stabil
- Bila angka sudah stabil, tekan tombol HOLD
- Periksa skala pada DO meter dengan teliti dan catat nilai DO.

4. Salinitas

Pengukuran salinitas dilakukan dengan refraktometer, menurut Aprilliyanti et al. (2016). Berikut ini adalah prosedur pengukuran:

- Menyiapkan refraktometer
- Dengan menggunakan pipet, letakkan aquadest pada prisma refraktometer
- Bersihkan prisma refraktometer dengan cara yang sama dengan tisu
- Dengan menggunakan pipet, teteskan air sampel ke prisma refraktometer untuk menentukan tingkat salinitas
- Tutup prisma refraktometer secara perlahan dengan sudut 45°C agar tidak terbentuk gelembung udara pada kaca prisma refraktometer
- Perhatikan skala salinitas yang tertera pada refraktometer, khususnya angka di sebelah kanan.

3.3.10 Analisis Data

Rancangan Acak Kelompok (RAK) digunakan untuk menganalisis data Status Hematologi Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.) yang terinfeksi Viral Nervous Necrosis (VNN) dengan Pemberian Protein Rekombinan *Chlorella Vulgaris*. Hasil optimal dalam penelitian ini kemudian ditentukan menggunakan tes lanjutan Tukey HSD.

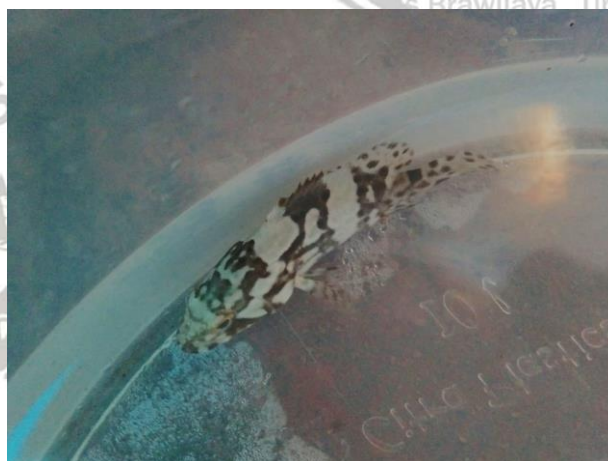
Hasil pengujian hematologi Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.) dan pengukuran kualitas air dapat ditampilkan dengan menggunakan tabel, gambar, dan grafik dari berbagai tahapan penelitian menjadi informasi untuk menentukan status hematologi Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.) yang terinfeksi *Viral Nervous Nekrosis* dengan pemberian protein rekombinan *Chlorella vulgaris*.

4 Hasil dan Pembahasan

4.1 Aklimatisasi dan Uji *In-Vivo* Ikan Kerapu Cantang (*Ephinephelus sp.*)

Aklimatisasi kerapu cantang (*Epinephelus sp*) dilakukan untuk mengurangi stres dan memungkinkan ikan menyesuaikan diri dengan lingkungan barunya.

Pemeliharaan dilakukan dengan menggunakan 24 ember 80 liter dalam penelitian ini. Ada 12 kerapu cantang di setiap ember. Setelah itu, lebih banyak aerasi ditambahkan. Masa aklimatisasi ini berlangsung selama tujuh hari. **Gambar 6** di bawah ini menunjukkan gambar proses aklimatisasi.



Gambar 7. Ikan Kerapu Dalam Masa Aklimatisasi (**Dokumentasi PTUPT, 2021**)

Keterangan : Ikan Dalam Proses Aklimatisasi di Ember.

Ikan kerapu cantang digunakan sebagai ikan uji dalam penelitian ini. Kerapu cantang yang digunakan bersumber dari salah satu tempat *hatchery* di Kabupaten Situbondo dengan ukuran panjang antara 10-12 cm. Karena benih kerapu cantang yang baru datang memerlukan aklimatisasi dengan media pemeliharaan yang baru, maka benih tersebut tidak diberi pakan secara langsung. Ikan-ikan tersebut kemudian dipuaskan selama beberapa waktu untuk menjaga rasa lapar mereka. Setelah ikan tampak sehat dan agresif, makanan diberikan.

Tahap perlakuan atau tahap uji *in vivo* ekstrak *C. vulgaris* pada ikan kerapu cantang dilakukan selama 15 hari setelah tahap aklimatisasi ikan selesai. Ikan

kerapu cantang berukuran 10-12 cm digunakan sebagai ikan uji. Teknik sonde digunakan untuk pemberian ekstrak *C. vulgaris* pada ikan kerapu cantang. Yanuhaar (2009) menggambarkan metode sonde sebagai “memberi makan ke dalam tubuh ikan dengan segera memasukkannya ke dalam mulut ikan”. Tiga dosis berbeda digunakan, termasuk 33 µl + 8,5 µl CFA, 66 µl + 16,5 µl CFA, dan 112 µl + 28 µl CFA. CFA (*Complete Freund's Adjuvant*) digunakan pada hari ke 0 sampai 4 dan IFA digunakan pada hari ke 5 sampai 7. (*Incomplete Freund's Adjuvant*). Pengamatan perilaku hewan uji dilakukan selama pemeliharaan untuk mengetahui perubahan dan perbedaan perilaku ikan pada setiap perlakuan. **Tabel 1** di bawah ini menunjukkan hasil aklimatisasi dan percobaan *in vivo* pada kerapu cantang untuk pengamatan perilaku pada ikan.

Tabel 1. Hasil Pengamatan Tingkah Laku Hewan Uji

Perlakuan	Aktivitas	Respon	Keterangan
K- (A)	Berenang didasar ember, terkadang bergereombol dekat aerasi	Respon terhadap gerakan dan pakan kurang, nafsu makan menurun	Infeksi VNN menimbulkan kematian dihari ke-7
K+ (B)	Aktif berenang	Respon terhadap gerakan dan pakan	Normal
C1 (C)	Aktif berenang, bergerombol dekat aerasi	Respon terhadap gerakan dan pakan	Normal
C2 (D)	Aktif berenang, bergerombol dekat aerasi	Respon terhadap gerakan dan pakan	Normal
C3 (E)	Aktif berenang, bergerombol dekat aerasi	Respon terhadap gerakan dan pakan	Normal
C4 (F)	Aktif berenang, bergerombol dekat aerasi	Respon terhadap gerakan kurang	Terjadi kematian di beberapa ikan

Perlakuan	Aktivitas	Respon	Keterangan
		tetapi masih merespon pakan	pada hari ke-9
C5 (G)	Aktif berenang, bergerombol dekat aerasi	Respon terhadap gerakan dan pakan	Tidak terjadi kematian pada ikan
C6 (H)	Aktif berenang, bergerombol dekat aerasi	Respon terhadap gerakan dan pakan	Tidak terjadi kematian pada ikan

Keterangan :

K- (A) : Ikan Sehat

K+ (B) : Ikan VNN (*Viral Nervous Necrosis*)

C1 (C) : Ikan 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 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 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 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 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 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.

4.2 Respon Hematologi Ikan Kerapu Cantang (*Ephinephelus* sp.)

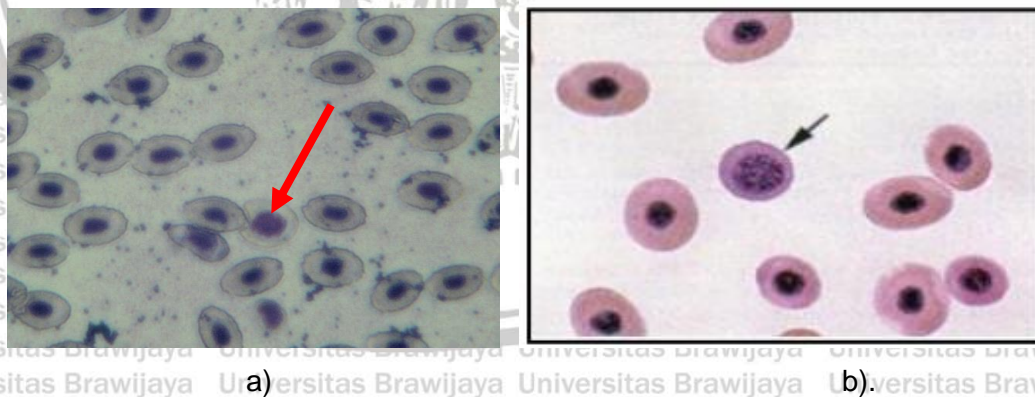
4.2.1 Jumlah Sel Darah Merah (Eritrosit)

Peningkatan sel darah merah, menurut Samsisko *et al.* (2015), merupakan upaya mengembalikan keseimbangan tubuh ikan guna meningkatkan kemampuan hemoglobin dalam mengikat oksigen. Ikan yang hidup di lingkungan rendah oksigen mengalami hematopoiesis, yang menyebabkan eritrosit mereka membesar untuk mengkompensasi kekurangan oksigen. Tingginya jumlah eritrosit dalam darah ikan diduga menunjukkan bahwa ikan tersebut stres. Keadaan lingkungan yang buruk yang tidak lagi sesuai untuk kehidupan ikan, seperti kurangnya oksigen di saluran air, dapat menyebabkan stres. **Tabel 2** menunjukkan hasil temuan perhitungan jumlah sel darah merah (eritrosit) pada ikan kerapu cantang (*Ephinephelus* sp.) berdasarkan pengamatan yang dilakukan pada ikan kerapu cantang (*Ephinephelus* sp.) dari hari pertama hingga hari ketujuh.

Tabel 2. Tabel Hasil Perhitungan Sel Darah Merah (eritrosit)

Perlakuan/Hari	1	2	3	4	5	6	7
Ikan Sehat K- (A)	600000	700000	650000	750000	650000	600000	660000
Ikan VNN K+ (B)	460000	460000	500000	450000	500000	550000	500000
Ikan C1 (C)	500000	550000	600000	650000	500000	520000	480000
Ikan C2 (D)	700000	600000	650000	600000	550000	450000	400000
Ikan C3 (E)	480000	500000	450000	550000	450000	400000	370000
Ikan C4 (F)	480000	550000	500000	480000	400000	360000	300000
Ikan C5 (G)	750000	600000	650000	500000	360000	300000	320000
Ikan C6 (H)	550000	650000	600000	550000	50000	450000	290000

Jumlah sel darah merah (eritrosit) ikan kerapu cantang (*Ephinephelus* sp.) pada hari 1-7 perlakuan dengan ikan sehat (A), ikan VNN (B), ikan C1 (C), ikan C2 (D), C3 ikan (E), ikan C4 (F), ikan C5 (G), dan ikan C6 (H) diperoleh hasil terbaik pada perlakuan hari ke-6 dengan ikan C5 (G) dengan jumlah eritrosit 300000 sel/mm³.



Gambar 8. a). Hasil pengamatan eritrosit dengan mikroskop perbesaran 400X (Dokumentasi PTUPT, 2021), b). Eritrosit immature (panah) dan eritrosit mature (Yuliani, 2010)

Eritrosit ikan memiliki nukleus, menurut Yanuhar *et al.* (2019), jumlah eritrosit bervariasi tergantung pada spesies, kondisi stres, dan suhu lingkungan, tetapi kisaran eritrosit biasanya berkisar antara 1,05 hingga 3,0 x 10⁶ sel/mm³.

4.2.2 Jumlah Sel Darah Putih (Leukosit)

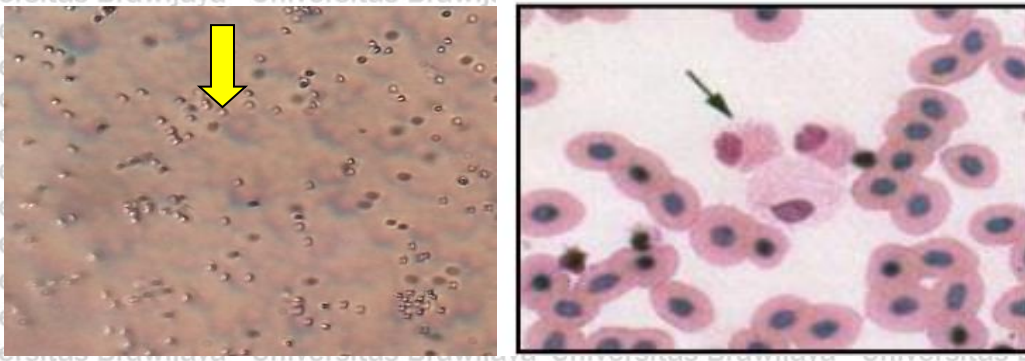
Kualitas air dan kesehatan tubuh ikan merupakan dua faktor yang mempengaruhi jumlah leukosit. Melalui sistem kekebalan dan respons lainnya, leukosit membantu menghilangkan zat asing dari tubuh, termasuk patogen yang menyerang. Untuk memfagosit mikroorganisme dan menghasilkan antibodi, ikan yang sakit akan menghasilkan sejumlah besar leukosit (Yanuhar et al., 2019).

Temuan perhitungan jumlah sel darah putih (leukosit) pada ikan kerapu cantang (*Ephinephelus* sp.) pada ikan kerapu cantang (*Ephinephelus* sp.) dapat dilihat pada **Tabel 3** berdasarkan pengamatan yang dilakukan pada ikan kerapu cantang (*Ephinephelus* sp.) pada hari pertama sampai hari ketujuh.

Tabel 3. Tabel Hasil Perhitungan Sel Darah Putih (leukosit)

Perlakuan/Hari	1	2	3	4	5	6	7
Ikan Sehat (A)	200000	300000	250000	350000	400000	250000	200000
Ikan VNN (B)	400000	450000	500000	400000	350000	300000	350000
Ikan C1 (C)	160000	165000	165000	180000	170000	250000	200000
Ikan C2 (D)	160000	150000	170000	160000	150000	200000	180000
Ikan C3 (E)	300000	350000	300000	400000	200000	175000	145000
Ikan C4 (F)	350000	400000	350000	300000	200000	180000	170000
Ikan C5 (G)	160000	170000	200000	150000	250000	230000	140000
Ikan C6 (H)	350000	400000	370000	280000	180000	100000	120000

Jumlah sel darah putih (leukosit) ikan kerapu cantang (*Ephinephelus* sp.) pada hari ke 1-7 perlakuan ikan sehat (A), ikan VNN (B), ikan C1 (C), ikan C2 (D), ikan C3 (E), ikan C4 (F), ikan C5 (G), dan ikan C6 (H) menunjukkan hasil terbaik pada hari ke-6 perlakuan dengan ikan C6 (H) yang memiliki jumlah leukosit 100000 sel/mm³.



a).

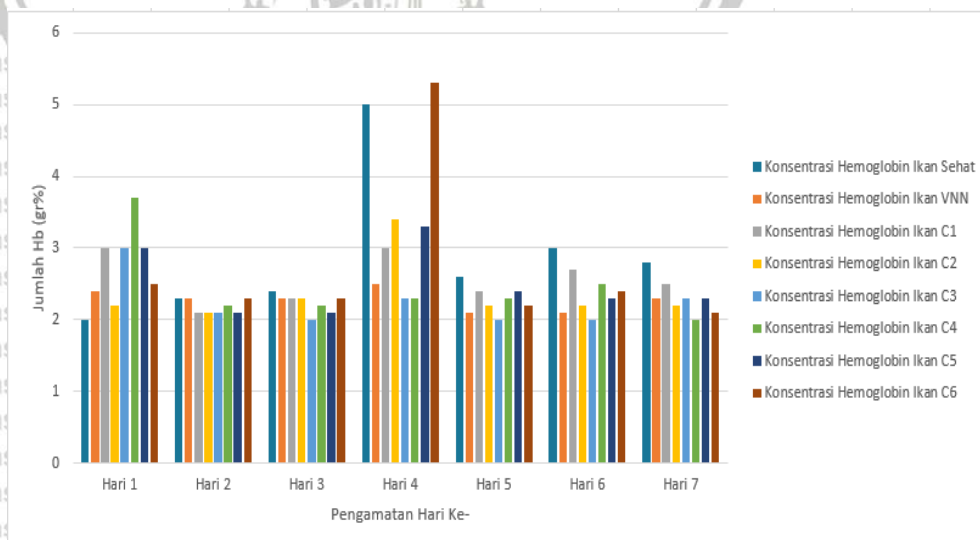
b).

Gambar 9. a). Hasil Pengamatan Leukosit dengan Mikroskop Perbesaran 400X (Dokumentasi PTUPT, 2021), b). Leukosit (Sel Darah Putih) (Yuliani, 2010)

Menurut Samsisko *et al.* (2014), menghitung jumlah leukosit sangat penting untuk menentukan status kesehatan ikan. Kortisol juga terkait dengan sistem kekebalan; itu menekan sistem imunologi, menghasilkan pengurangan jumlah keseluruhan leukosit.

4.2.3 Jumlah Hemoglobin (Hb)

Hasil perhitungan konsentrasi hemoglobin (gram persen) pada ikan kerapu cantang (*Ephinephelus sp.*) berdasarkan pengamatan yang dilakukan pada ikan kerapu cantang pada hari pertama hingga ketujuh ditampilkan pada **Gambar 10**.



Gambar 10. Grafik Hasil Perhitungan Hemoglobin (Hb) Ikan Kerapu

Keterangan : Hasil tertinggi pada perlakuan ikan C6 (H) hari ke-4

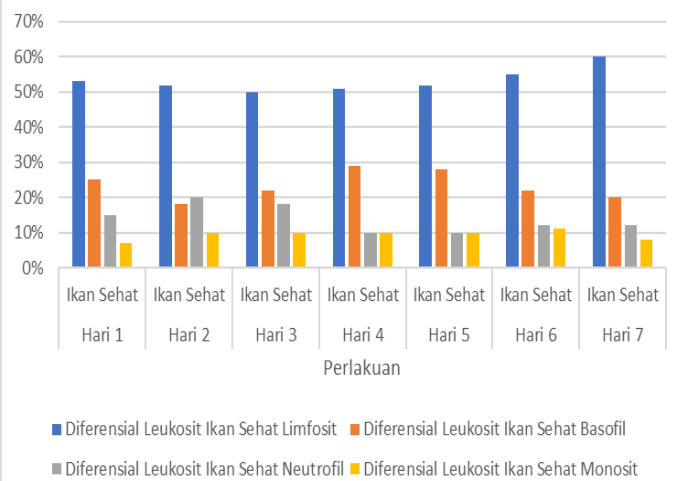
Hasil konsentrasi hemoglobin ikan kerapu cantang (*Ephinephelus* sp.) pada hari 1-7 perlakuan ikan sehat (A), ikan VNN (B), ikan C1 (C), ikan C2 (D), ikan C3 (E), C4 ikan (F), ikan C5 (G), dan ikan C6 (H) diperoleh hasil tertinggi pada hari ke-4 dengan konsentrasi hemoglobin 5,3 gram%.

Kadar normal hemoglobin ikan teleostei berkisar antara 12-14 gram persen, menurut Yuni *et al.*, (2019). Laju metabolisme melambat ketika kadar Hb rendah, dan jumlah energi yang dihasilkan rendah. Hal ini menyebabkan ikan menjadi lemah dan apatis, serta tampak seperti terjebak di dasar atau tersuspensi di bawah permukaan air (Pakingking *et al.*, 2018).

Hal ini sejalan dengan penelitian Yanuhar *et al.*, (2016). Kadar hemoglobin ikan turun sebagai akibat dari kemampuan yang tidak merata untuk mengikat oksigen metabolik untuk produksi energi. Jumlah eritrosit juga menurun ketika kadar hemoglobin turun. Kekurangan oksigen yang dibutuhkan menyebabkan pengurangan sel darah merah. Hb rendah menyebabkan metabolisme melambat, menghasilkan output energi yang rendah. Akibatnya, ikan menjadi lemah dan kehilangan nafsu makan. Ikan dapat dilihat di dekat bagian bawah atau menjuntai di bawah permukaan air.

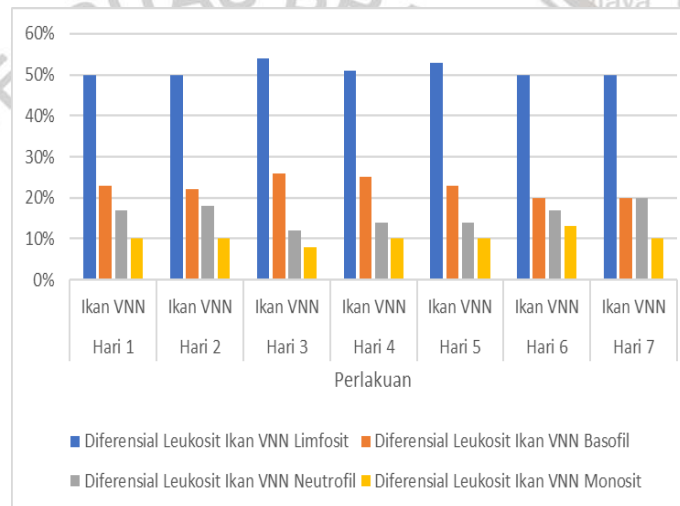
4.2.4 Diferensial Leukosit

Tujuan pengamatan diferensial leukosit adalah untuk mengetahui berapa persen perbedaan komponen sel leukosit. Hasil perhitungan diferensial leukosit (persen) pada ikan kerapu cantang (*Ephinephelus* sp.) disajikan pada grafik di bawah ini, berdasarkan pengamatan yang dilakukan pada ikan kerapu cantang (*Ephinephelus* sp.) dari hari pertama hingga hari ketujuh:



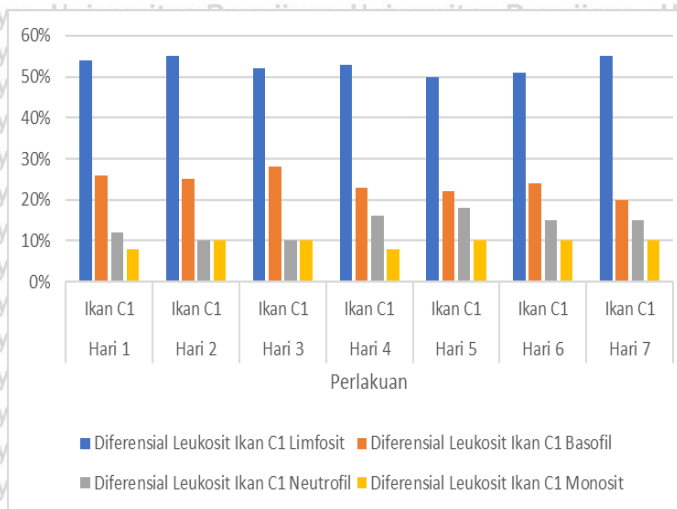
Gambar 11. Grafik Diferensial Leukosit Perlakuan Ikan Sehat (A) (Ikan Kerapu Sehat Tanpa Penginfeksi VNN).

Keterangan : Hasil tertinggi diperoleh pada perlakuan ikan sehat (A) pada hari ke-7 dengan persentase 60%.



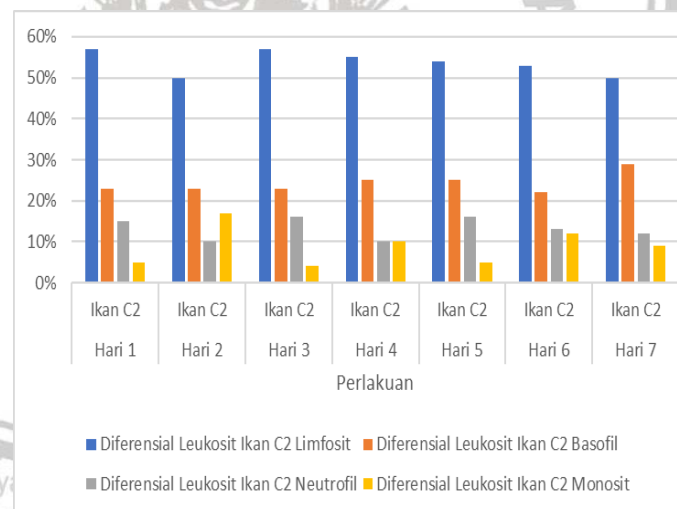
Gambar 12. Grafik Diferensial Leukosit perlakuan Ikan VNN (B) (Ikan Kerapu Sehat Dengan Penginfeksi VNN).

Keterangan : Hasil tertinggi yang diperoleh berdasarkan grafik diatas diperoleh pada perlakuan ikan VNN (B) pada hari ke-3 dengan presentase 54%.



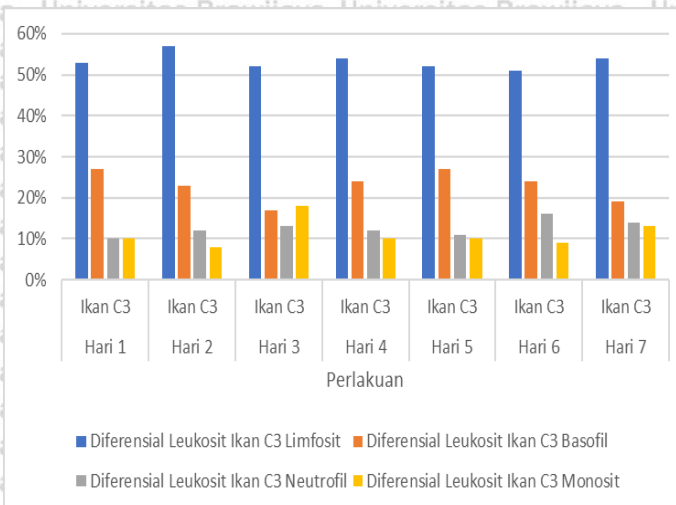
Gambar 13. Grafik Diferensial Leukosit Perlakuan Ikan C1 (C) (Ikan kerapu sehat tanpa penginfeksi VNN dengan pemberian vaksin rekombinan C. Vulgaris konsentrasi 33 μ l + 8,5 μ l CFA (pada hari ke-0) serta pemberian vaksin rekombinan C. Vulgaris konsentrasi 33 μ l + 8.

Keterangan : Hasil tertinggi yang diperoleh berdasarkan grafik diatas diperoleh pada perlakuan ikan C1 (C) hari ke-7 dengan presentase 55%.



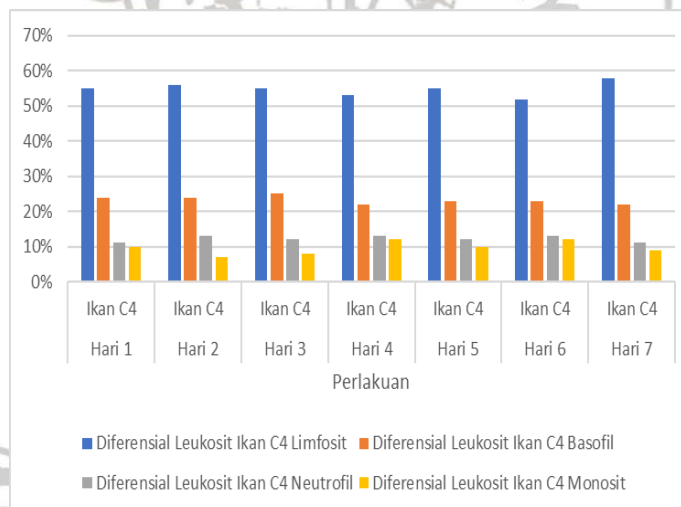
Gambar 14. Grafik Diferensial Leukosit Perlakuan Ikan C2 (D) (Ikan kerapu sehat tanpa penginfeksi VNN dengan pemberian vaksin rekombinan C. Vulgaris konsentrasi 66 μ l + 16,5 μ l CFA (pada hari ke-0) serta pemberian vaksin rekombinan C. Vulgaris konsentrasi 66 μ l + 1.

Keterangan : Hasil tertinggi yang diperoleh berdasarkan grafik diatas diperoleh pada perlakuan ikan C2 (D) hari ke-1 dengan presentase 57%.



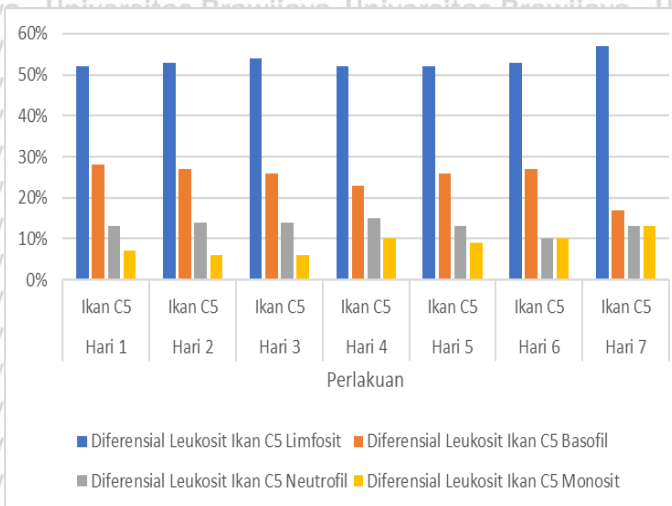
Gambar 15. Grafik Diferensial Leukosit Perlakuan Ikan C3 (E) (Ikan kerapu sehat tanpa penginfeksi VNN dengan pemberian vaksin rekombinan C. Vulgaris konsentrasi 112 μ l + 28 μ l CFA (pada hari ke-0) serta pemberian vaksin rekombinan C. Vulgaris konsentrasi 112 μ l + 2

Keterangan : Hasil tertinggi yang diperoleh berdasarkan grafik diatas diperoleh pada perlakuan ikan C3 (E) hari ke-2 dengan presentase 57%.



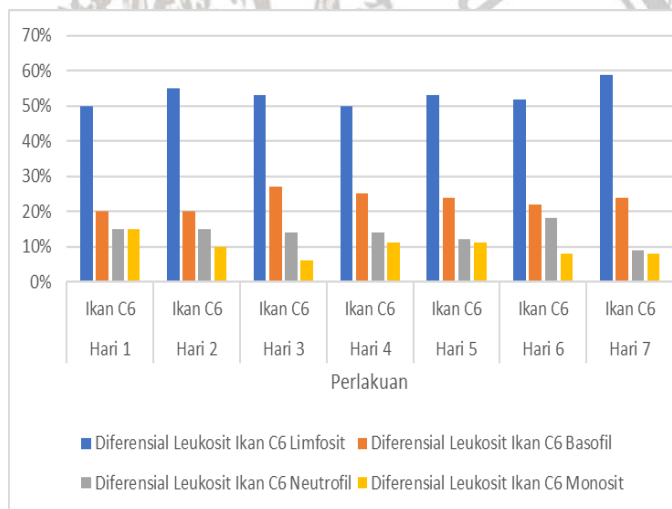
Gambar 16. Grafik Diferensial Leukosit Perlakuan Ikan C4 (F) (Ikan kerapu sehat dengan penginfeksi VNN dan pemberian vaksin rekombinan C. Vulgaris konsentrasi 33 μ l + 8,5 μ l CFA (pada hari ke-0) serta pemberian vaksin rekombinan C. Vulgaris konsentrasi 33 μ l + 8,5 μ

Keterangan : Hasil tertinggi yang diperoleh berdasarkan grafik diatas diperoleh pada perlakuan ikan C4 (F) hari ke-7 dengan presentase 58%.



Gambar 17. Grafik Diferensial Leukosit Perlakuan Ikan C5 (G) (Ikan kerapu sehat dengan penginfeksi VNN dan pemberian vaksin rekombinan C. Vulgaris konsentrasi 66 μ l + 16,5 μ l CFA (pada hari ke-0) serta pemberian vaksin rekombinan C. Vulgaris konsentrasi 66 μ l + 16,

Keterangan : Hasil tertinggi yang diperoleh berdasarkan grafik diatas diperoleh pada perlakuan ikan C5 (G) hari ke-7 dengan presentase 57%.



Gambar 18. Grafik Diferensial Leukosit Perlakuan Ikan C6 (H) (Ikan kerapu sehat dengan penginfeksi VNN dan pemberian vaksin rekombinan C. Vulgaris konsentrasi 112 μ l + 28 μ l CFA (pada hari ke-0) serta pemberian vaksin rekombinan C. Vulgaris konsentrasi 112 μ l + 28

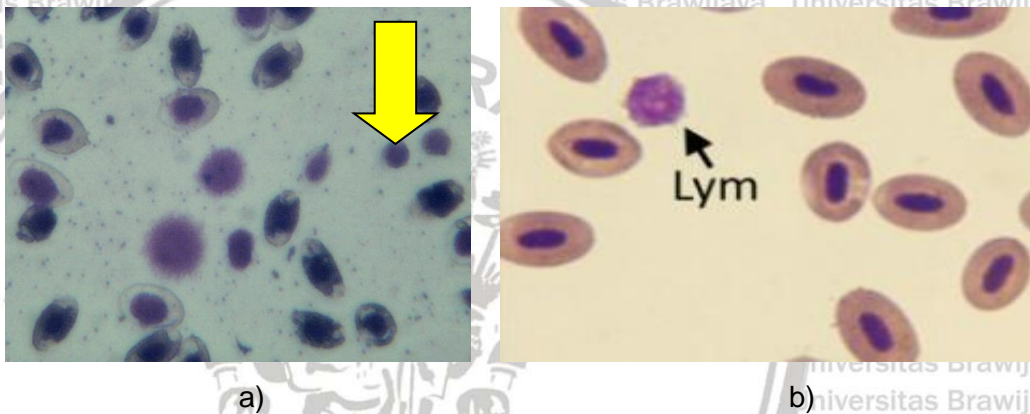
Keterangan : Hasil tertinggi yang diperoleh berdasarkan grafik diatas diperoleh pada perlakuan ikan C6 (H) hari ke-7 dengan presentase 59%.

Hasil perhitungan diferensial leukosit adalah sebagai berikut, seperti terlihat pada grafik di atas:

a) Limfosit

Limfosit adalah sel yang membuat antibodi, yang membantu sistem kekebalan tubuh melawan penyakit. Kira-kira 2-3 hari setelah injeksi antigen, peningkatan populasi limfosit akan mengakibatkan peningkatan produksi antibodi.

Karena limfosit menawarkan komponen imunologis untuk pertahanan tubuh, mereka memiliki potensi untuk menembus jaringan tubuh yang halus (Affandi dan Tang, 2002).



Gambar 19. a). Profil Limfosit Ikan kerapu dengan pengamatan mikroskop perbesaran 400x (Dokumentasi PTUPT, 2021), b). Limfosit (Suljevic, 2020).

Berdasarkan hasil perhitungan, persentase limfosit pada ikan kerapu cantang (*Ephinephelus* sp.) pada hari ke 1 sampai 7 diberi perlakuan ikan sehat (A), ikan VNN (B), ikan C1 (C), ikan C2 (D), ikan C3. ikan (E), ikan C4 (F), ikan C5 (G), dan ikan C6 (H). Persentase limfosit pada ikan sehat (A) pada hari ke-7 perlakuan adalah 60%.

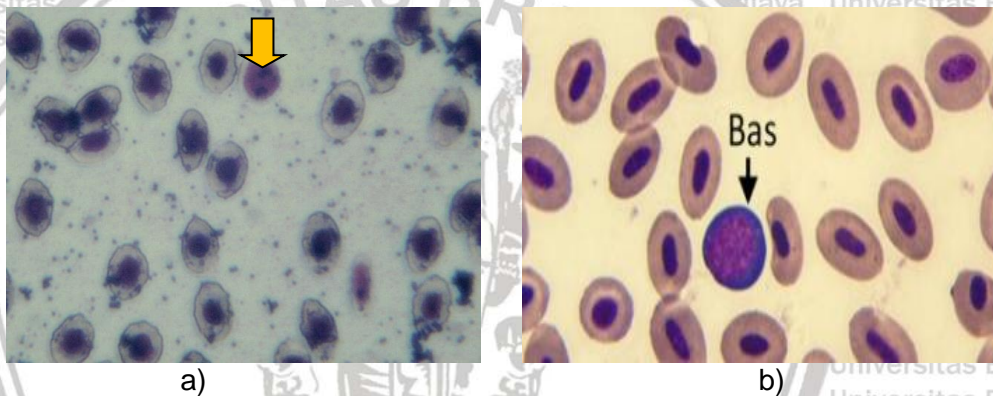
Limfosis mengacu pada peningkatan jumlah limfosit dalam aliran darah, sedangkan leukopenia mengacu pada pengurangan. Jumlah neutrofil yang rendah mengimbangi jumlah limfosit yang tinggi dalam aliran darah, dan sebaliknya.

Penangkapan ikan, pemindahan benih, dan pemeliharaan merupakan semua kegiatan yang dapat menyebabkan stres pada ikan, baik teleost maupun

elasmobranchii (Rachmawati *et al.*, 2010) dalam budidaya. Stres dan lingkungan yang tidak menyenangkan dapat menyebabkan peningkatan sekresi hormon kortisol, yang mengakibatkan penurunan jumlah limfosit yang beredar. Sebagian besar limfosit ditarik dari sirkulasi dan terkonsentrasi pada jaringan yang mengalami inflamasi, sehingga terjadi penurunan jumlah limfosit dalam darah tepi (Erika, 2008).

b) Basofil

Basofil berhubungan dengan penyakit akut dan berperan dalam infeksi parasit dan respon alergi (Jain, 1993). Basofil merupakan jenis sel darah putih yang jarang ditemukan dalam darah ikan (Nabib dan Pasaribu, 1989). Jumlah basofil yang ditemukan pada spesies ikan yang berbeda sangat bervariasi.



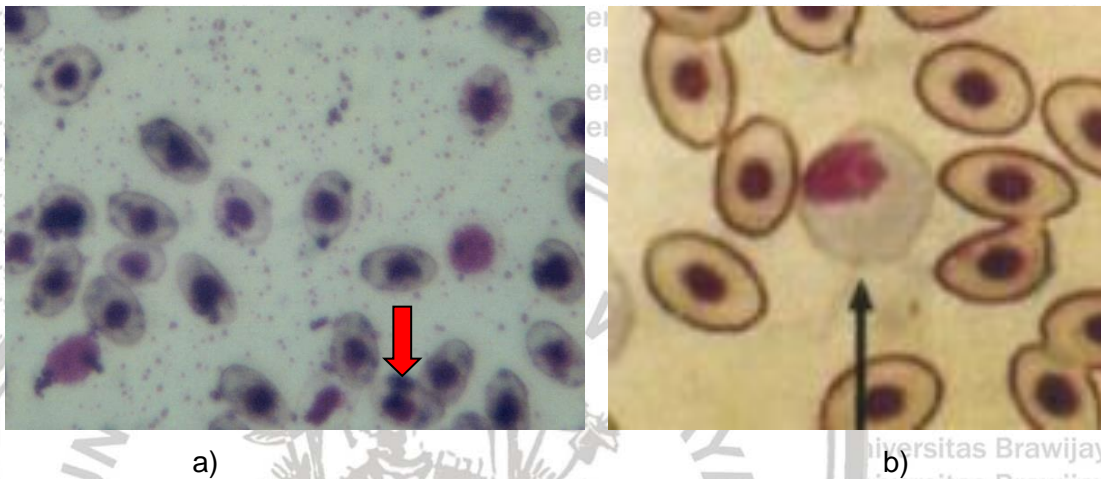
Gambar 20. a). Profil Basofil Ikan Kerapu Dengan Pengamatan Mikroskop Perbesaran 400x (Dokumentasi PTUPT, 2021), (b). Basofil (Suljevic, 2020).

Persentase basofil pada ikan kerapu cantang (*Ephinephelus* sp.) pada hari ke 1 sampai 7 dengan perlakuan ikan sehat (A), ikan VNN (B), ikan C1 (C), ikan C2 (D), ikan C3 (E) , ikan C4 (F), ikan C5 (G), dan ikan C6 (H) diperoleh hasil terbaik dengan persentase 17 persen pada perlakuan ikan C3 (E) pada hari ke-3 dan C5 (G) hari ke-7 dengan presentase 17%.

Persentase basofil dalam darah ikan, menurut Affandi dan Tang (2002), berkisar antara 0,17 hingga 0,194 persen dan berukuran 8-12 m. Hanya sejumlah kecil spesies ikan yang ditemukan memiliki basofil dalam sirkulasi darahnya, menurut Feldman *et al.*, (2000). Tes darah cenderung tidak mengungkapkan basofil.

c) Neutrofil

Leukosit fagosit pertama yang meninggalkan arteri darah, neutrofil memiliki enzim lisozim yang dapat membunuh organisme yang ditelannya (Irianto, 2005). Ketika infeksi bakteri muncul, jumlah neutrofil dalam darah biasanya meningkat, menurut Dellman dan Brown (1989), karena limfoid harus melepaskan leukosit untuk melawan infeksi.



Gambar 21. a). Profil Neutrofil Ikan Kerapu Dengan Pengamatan Mikroskop Perbesaran 400x (Dokumentasi PTUPT, 2021), b). Neutrofil (Johny *et al.*, 2003).

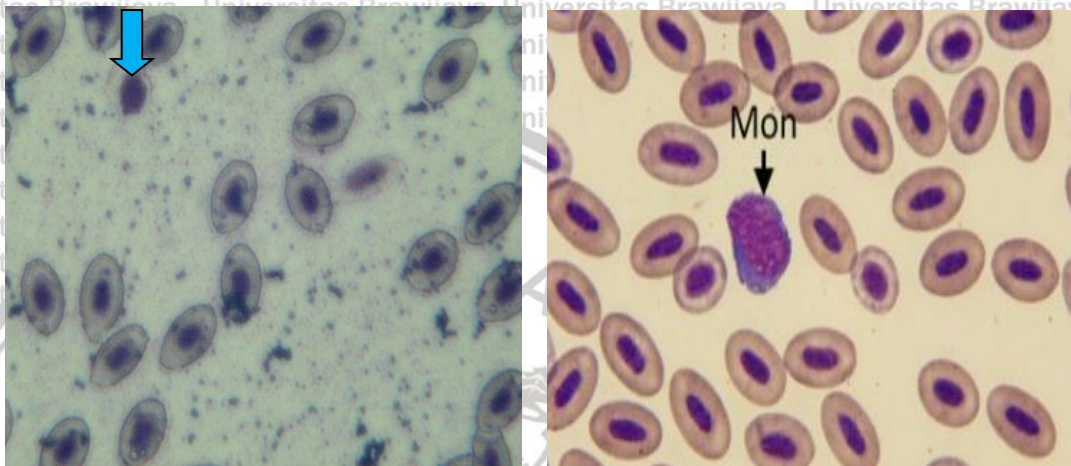
Persentase neutrofil pada ikan kerapu cantang (*Ephinephelus* sp.) pada hari ke 1 sampai 7 dengan perlakuan ikan sehat (A), ikan VNN (B), ikan C1 (C), ikan C2 (D), ikan C3 (E) , ikan C4 (F), ikan C5 (G), dan ikan C6 (H) mencapai hasil terbaik pada hari ke-7 perlakuan dengan ikan C6 (H) dengan persentase 8%.

Sel-sel neutrofil juga berkontribusi terhadap respons non-spesifik dengan memfagositosis patogen yang menyerang (Kresno 2001). Jumlah sel neutrofil dapat berkurang setelah infeksi, dan sel mati serta jaringan nekrotik, salah satunya mengandung neutrofil yang telah mati, mengalami autolisis dalam beberapa hari (Cahyaningsih *et al.*, 2007). Proporsi neutrofil dalam total leukosit bervariasi antara 2 dan 10%. (Kurniaji, 2015). Neutrofil ikan memiliki granula dalam sitoplasmanya

dan berbentuk bulat dengan inti tidak beraturan yang dapat mengisi sebagian ruang sitoplasma (berdiameter 9-13 m).

d) Monosit

Monosit adalah sel darah yang berkembang menjadi makrofag. Ketika diaktifkan, makrofag memiliki kemampuan fagositosis yang lebih besar daripada neutrofil, meskipun granulosit memiliki jumlah nilai yang lebih tinggi (Irianto, 2005).



a)

b)

Gambar 22. a). Profil Monosit Ikan Kerapu Dengan Pengamatan Mikroskop Perbesaran 400x (Dokumentasi PTUPT, 2021), b). Monosit (Suljevic, 2020).

Persentase monosit pada ikan kerapu cantang (*Ephinephelus* sp.) pada hari ke 1 sampai dengan 7 dihitung menggunakan hasil perhitungan dengan perlakuan ikan sehat (A), ikan VNN (B), ikan C1 (C), ikan C2 (D), ikan C3 (E), ikan C4 (F), ikan C5 (G), dan ikan C6 (H). Hasil terbaik diperoleh pada hari ke-3 perlakuan ikan C2(D) dengan persentase 4%.

Monosit dapat menembus dinding pembuluh darah kapiler, masuk ke jaringan, dan berkembang menjadi sel makrofag, menurut Affandi dan Tang (2002). Monosit bersirkulasi sebentar dalam aliran darah sebelum melewati membran kapiler dan masuk ke jaringan. Monosit memiliki kemampuan untuk pindah ke jaringan dan membentuk kompartemen ekstravaskular. Monosit ini tidak dapat dibedakan dari makrofag setelah mereka pindah ke berbagai organ dan melakukan bagian dalam

fagositosis dengan menghancurkan atau melisis sel bakteri. Monosit membentuk sekitar 0,1 persen dari total populasi leukosit yang bersirkulasi dalam darah ikan (Sani et al., 2014). Selama fase penyembuhan infeksi, terjadi peningkatan jumlah monosit karena kebutuhan jaringan untuk fagositosis makromolekul.

4.3 Analisis Kualitas Air Ikan Kerapu Cantang (*Ephinephelus sp.*)

Kesehatan ikan dipengaruhi oleh kualitas air. Pada perlakuan uji vaksin rekombinan, kualitas air dikondisikan dalam keadaan homogen. Suhu, pH, DO, dan salinitas digunakan untuk mengukur kualitas air kerapu cantang dalam penelitian ini.

Tabel 4 menunjukkan hasil pengukuran kualitas air. **Lampiran 2** berisi informasi tambahan tentang hasil pengukuran kualitas air penelitian ini.

Tabel 4. Hasil Pengukuran Kualitas Air Ikan Kerapu Cantang (*Ephinephelus sp.*)

Parameter	Kisaran
Suhu	30-31°C
pH	7,50-7,58
DO	17,2-19,2 ppm
Salinitas	30 ppt

Kualitas air merupakan salah satu variabel pendukung kinerja ekonomi, khususnya di bidang perikanan. Kualitas air pada media pemeliharaan dapat dipertahankan dengan mengganti air. Pergantian air total tidak disarankan karena dapat membuat ikan stres (Supriyadi dan Lentera, 2004). Suhu merupakan indikator kualitas air yang paling penting, dan memiliki dampak pada pertumbuhan ikan. Pengukuran suhu pada bahan pemeliharaan kerapu cantang menunjukkan kisaran 30-31°C. Pengukuran pH berada di kisaran 7,50 hingga 7,58. Hasil pengukuran oksigen terlarut (DO) berkisar antara 17,2 hingga 19,2 ppm. Sedangkan hasil pengukuran salinitas masuk dalam kategori biasa yaitu mulai dari 30 ppt. Penelitian ini menunjukkan bahwa kualitas air pada media pemeliharaan kerapu cantang sangat ideal. Data kualitas air dikondisikan dalam keadaan homogen.

Menurut Kordi (2008), kisaran suhu yang cocok untuk pemeliharaan kerapu berkisar 27-32°C, pH (keasaman) berkisar 7-8, oksigen terlarut (DO) berkisar 5-6 ppm, dan salinitas terbaik untuk pertumbuhan kerapu berkisar dari 25-35 ppt. Selain itu, beberapa sudut pandang salinitas yang sesuai untuk budidaya kerapu berada pada kisaran 30-35 ppt (Akbar dan Sudaryanto, 2001).



4.4 Analisis Data

Untuk menilai apakah ada pengaruh perlakuan yang berbeda terhadap perlakuan protein rekombinan *Chlorella vulgaris* yang diberikan kepada ikan kerapu, perlu dilakukan analisis varians (Anova). Rancangan Acak Kelompok (RAK) digunakan untuk menganalisis data, yang kemudian dianalisis menggunakan ANOVA. Terapi optimal dalam penelitian ini kemudian ditentukan menggunakan tes lanjutan Tukey HSD. Berikut hasil analisis data hematologi dan diferensial ikan kerapu cantang:

Tabel 5. Analisa Annova Jumlah Sel Darah Merah (Eritrosit)
Dependent Variable Hasil

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Connected Model	5.323E11 ^a	13	4.095E10	4.579	.000
Intercept	1.468E13	1	1.468E13	1.641E3	.000
Perlakuan	2.685E11	7	3.836E10	4.290	.001
Waktu	2.638E11	6	4.396E10	4.916	.001
Error	3.756E11	42	8.942E9		
Total	1.559E13	56			
Connected Total	9.079E11	55			

a. R Squared = .586 (Adusted R Squared = .458)

Tabel 6. Analisa Anova Jumlah Sel Darah Putih (Leukosit)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3.450E11 ^a	13	2.654E10	5.620	.000
Intercept	3.540E12	1	3.540E12	749.750	.000
Perlakuan Waktu	2.638E11	7	3.769E10	7.981	.000
Error	8.117E10	6	1.353E10	2.865	.020
Total	1.983.E11	42	4.722E9		
Connected Total	4.083E12	56			
	5.433E11	55			

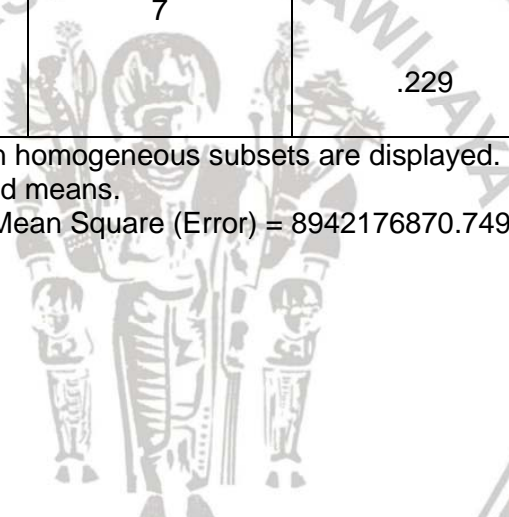
a. R Squared = .635 (Adjusted R Squared = .522)

Nilai Sig. didasarkan pada studi tabel di atas. Dalam analisis anova jumlah sel darah merah, di mana nilainya kurang dari 0,05, protein rekombinan yang dibuat berbeda secara substansial, sedangkan nilai Sig diperoleh dalam analisis anova jumlah sel darah putih adalah 0,000 jika hasilnya kurang dari 0,05, menunjukkan bahwa protein rekombinan yang disediakan sangat berbeda atau ada perbedaan. Kemudian lebih banyak penelitian dilakukan untuk melihat bagaimana efek dari berbagai terapi berbeda. Hasil uji Tukey HSD tercantum pada tabel di bawah ini:

Tabel 7. Hasil Uji Tukey HSD Sel Darah Merah (Eritrosit)

Perlakuan	N	Subset	
		1	2
Ikan C4	7	4.39E5	
Ikan C6	7	4.49E5	
Ikan C3	7	4.57E5	
Ikan VNN	7	4.89E5	
Ikan C5	7	4.97E5	
Ikan C1	7	5.43E5	5.43E5
Ikan C2	7	5.64E5	5.64E5
Ikan Sehat	7		6.59E5
Sig.		.229	.323

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
 Based on observed means.
 The error term is Mean Square (Error) = 8942176870.749.



Tabel 8. Hasil Uji Tukey HSD Sel Darah Putih (Leukosit)

Perlakuan	N	Subset	
		1	2
Ikan C2	7	1.67E5	
Ikan C1	7	1.84E5	
Ikan C5	7	1.86E5	
Ikan C6	7	2.57E5	
Ikan C3	7	2.67E5	
Ikan Sehat	7	2.79E5	2.79E5
Ikan C4	7	2.79E5	2.79E5
Ikan VNN	7		3.93E5
Sig.		.072	.060

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
 Based on observed means.
 The error term is Mean Square (Error) = 4721726190.477

Hasil uji Tukey HSD menunjukkan bahwa setiap perlakuan menghasilkan hasil yang berbeda. Tukey HSD dengan taraf signifikansi 0,05 digunakan untuk mengetahui perbedaan antara masing-masing perlakuan (interval kepercayaan 95 persen). Perlakuan ikan C4 (F) (kerapu sehat dengan infeksi VNN dan pemberian vaksin C rekombinan) merupakan perlakuan terbaik untuk jumlah sel darah merah.

Pada hari keempat, konsentrasi *Vulgaris* adalah 33 µl + 8,5 µl IFA. Sedangkan perlakuan terbaik untuk jumlah sel darah putih adalah pada ikan sehat K-(A) dan C4 (F) (ikan kontrol negatif, kerapu sehat tanpa infeksi VNN, atau pemberian vaksin protein rekombinan *C. vulgaris*), perlakuan terbaik untuk hitung sel darah merah untuk pengobatan ikan K- (B) sehat (ikan kontrol negatif, kerapu sehat tanpa infeksi VNN, atau pemberian vaksin protein rekombinan *C. vulgaris*) (ikan kerapu sehat dengan infeksi VNN). Konsentrasi *C. vulgaris* 33 µl + 8,5 µl CFA, dan pemberian

vaksin rekombinan (pada hari 0) dan vaksin rekombinan *C. vulgaris* (konsentrasi 33 μ l + 8,5 μ l IFA) pada hari ke-4.

Tabel 9. Analisa Anova Hemoglobin (Hb)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Connected Model	11.084 ^a	13	.853	3.239	.002
Intercept	351.001	1	351.001	1.333E3	.000
Perlakuan	2.279	7	.326	1.237	.305
Waktu	8.804	6	1.467	5.574	.000
Error	11.056	42	.263		
Total	373.140	56			
Connected Total	22.139	55			

a. R Squared = .501 (Adjusted R Squared = .346)

Nilai Sig. didasarkan pada studi tabel di atas. Pada analisis hemoglobin annova dengan nilai lebih besar dari 0,05 yaitu 0,305, menunjukkan bahwa protein rekombinan yang diberikan tidak berbeda nyata.

Tabel 10. Analisa Annova Limfosit

Dependent Variable Hasil

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Connected Model	108.161 ^a	13	8.320	1.542	.143
Intercept	158472.161	1	158472.161	2.936E4	.000
Perlakuan	51.696	7	7.385	1.368	.244
Waktu	56.464	6	9.411	1.744	.135
Error	226.679	42	5.397		
Total	158807.000	56			
Connected Total	334.939	55			

a. R Squared = .323 (Adjusted R Squared = .113)

Nilai Sig. didasarkan pada studi tabel di atas. Pada analisis anova limfosit adalah 0,244, dengan nilai lebih besar dari 0,05, menunjukkan bahwa protein rekombinan yang diberikan tidak berbeda nyata.

Tabel 11. Analisa Annova Basofil
Dependent Variable Hasil

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Connected Model	101.018 ^a	13	7.771	.926	.536
Intercept	31161.446	1	31161.446	3.712E3	.000
Perlakuan	25.839	7	3.691	.440	.871
Waktu	75.179	6	12.530	1.493	.204
Error	352.536	42	8.394		
Total	31615.000	56			
Connected Total	453.554	55			

a. R Squared = .223 (Adjusted R Squared = -.018)

Nilai Sig. didasarkan pada studi tabel di atas. Dalam studi basofil annova, di mana nilainya lebih besar dari 0,05, itu adalah 0,871, menunjukkan bahwa protein rekombinan yang disediakan tidak berbeda secara substansial.

Tabel 102. Analisa Anova Neutrofil
Dependent Variable Hasil

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Connected Model	75.875 ^a	13	5.837	.771	.685
Intercept	10287.161	1	10287.161	1.359E3	.000
Perlakuan	66.411	7	9.487	1.253	.297
Waktu	9.464	6	1.577	.208	.972
Error	317.964	42	7.571		
Total	10681.000	56			
Connected Total	393.839	55			

a. R Squared = .193 (Adjusted R Squared = -.057)

Nilai Sig. didasarkan pada studi tabel di atas. Dalam analisis anova neutrofil, adalah 0,297, dengan nilai lebih besar dari 0,05, menunjukkan bahwa protein rekombinan yang dipasok tidak jauh berbeda.

Tabel 113. Analisa Annova Monosit

Dependent Variable Hasil

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Connected Model	49.768 ^a	13	3.828	.501	.911
Intercept	5226.446	1	5226.446	684.291	.000
Perlakuan	28.839	7	4.120	.539	.800
Waktu	20.929	6	3.488	.457	.836
Error	320.786	42	7.638		
Total	5597.000	56			
Connected Total	370.554	55			

a. R Squared = .134 (Adjusted R Squared = .134)

Nilai Sig. didasarkan pada studi tabel di atas. Dalam analisis anova monosit dengan nilai lebih besar dari 0,05, itu adalah 0,800, menunjukkan bahwa protein rekombinan yang disediakan tidak jauh berbeda.

5 Kesimpulan dan Saran

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian Status Hematologi Darah pada Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.) yang Terinfeksi Viral Nervous Necrosis (VNN) dengan Pemberian Rekombinan *Chlorella Vulgaris*:

1. Hasil eritrosit terbaik berasal dari perlakuan ikan C5 (G) hari ke-6 yang memiliki jumlah eritrosit 300.000 sel/mm³, sedangkan hasil leukosit terbesar berasal dari perlakuan ikan C6 (H) hari ke-6 yang memiliki jumlah sel 100000 /mm³ jumlah leukosit, Sedangkan uji Tukey menunjukkan bahwa perlakuan ikan C6 (H) hari ke-4 memberikan hasil hemoglobin terbaik, dengan konsentrasi hemoglobin 5,3 gram%.
2. Limfosit paling baik pada perlakuan ikan sehat (A) pada hari ke-7, dengan persentase 60%, sedangkan basofil paling baik pada perlakuan ikan C3 (E) pada hari ke-3 dan C5 (G) pada hari ke-3. Hari ke-7, dengan persentase 17%. Uji Tukey mengungkapkan bahwa neutrofil memiliki hasil terbaik pada perlakuan ikan C6 (H) hari ke-7, dengan persentase 8%, uji Tukey mengungkapkan bahwa monosit memiliki hasil terbaik pada perlakuan ikan C2 (D) pada hari ketiga, dengan persentase 4%.

Dapat disimpulkan bahwa perlakuan terhadap ikan kerapu yang terinfeksi VNN dengan dosis yang berbeda dari masing-masing vaksin rekombinan didapatkan hasil hematologi dan diferensial leukosit yang bervariasi. Sedangkan data suhu berkisar antara 30-31°C, pH berkisar 7,50-7,58, oksigen terlarut (DO) berkisar 17,2-19,2 ppm, dan salinitas berkisar 30 ppt pada pemeriksaan kualitas air.

Penelitian ini menunjukkan bahwa kualitas air pada media pemeliharaan kerapu cantang sangat ideal. Hasil pengujian kualitas air dikondisikan homogen.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian skripsi berjudul “Status Hematologi Darah pada Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.) yang Terinfeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN) dengan Pemberian Rekombinan *Chlorella Vulgaris*,” Dimungkinkan untuk membuat rekomendasi, seperti mencari efek terbaik dari eritrosit, leukosit, hemoglobin, dan leukosit diferensial pada vaksin rekombinan *C. vulgaris*.



DAFTAR PUSTAKA

- Affan, J.M. 2011. Seleksi lokasi pengembangan budidaya dalam Keramba Jaring Apung (KJA) berdasarkan faktor lingkungan dan kualitas air di perairan Pantai Timur Kabupaten Bangka Tengah. *Jurnal Sains MIPA*. **17(3)** : 99-106.
- Agostinia, A., J. Niklasc., T. Schulteb., M. D. Valentina., M. Bortolusa., E. Hofmannb., W. Lubitz 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.
- Akbar, S dan Sudaryanto. 2001. *Pembenihan dan Pembesaran Kerapu Bebek*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- 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.
- Anderson, D. P dan A. Siwicki. 1993. Basic hematology and serology for fish health programs, second symposium on disease in asia aquaculture "aquatic animal health and environment". Asia Fisheries Society.
- Apriliyanti, S., T. R. Soeprbowati dan B. Yulianto. 2016. Hubungan kelimpahan *Chlorella sp.* dengan kualitas lingkungan perairan pada skala semia massal di BPBAP Jepara. *Jurnal Ilmu Lingkungan*. **14(2)** : 77-8.
- Aprilliyanti, S., T. R. Soeprbowati dan B. Yulianto. 2016. Hubungan kemelimpahan *Chlorella sp* dengan kualitas lingkungan perairan pada skala semi masal di BBBPAP Jepara. *JURNAL ILMU LINGKUNGAN*. **14(2)** : 77-81.
- Black, J. A., and D. J. Champion. 1999. *Metode dan Masalah Penelitian Sosial*. PT. Refika.
- Blaxhall, P. C., dan Daisley K. W. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *J. Fish Biology* 5:577-581.
- Costa, J. Z dan K. D. Thompson. 2016. Understanding the interaction between *Betanodavirus* and its host for the development of prophylactic measures for viral encephalopathy and retinopathy. *Fish & Shellfish Immunology*. **53** : 35-49.

Dedi, D., 2018. Pengaruh Pemberian Hormon Tiroksin Pada Pakan Pellet Megami Terhadap Pertumbuhan Benih Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-Lanceolatus*). *Intek Akuakultur*. **2**(2) : 33-48.

Drusch, S., Serfert, Y., Van Den Heuvel, A., & Schwarz, K. 2006. Physicochemical characterization and oxidative stability of fish oil encapsulated in an amorphous matrix containing trehalose. *Food Research International*, **39**, 807–815.

Dziezak, J. D. 1988. Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technology* (April), 136–151.

Ernawati dan Kembaren, R.F. 2005. Karakterisasi Protein Rekombinan. Makalah kursus singkat: Perkembangan terkini dan Prospek Protein Rekombinan dalam Bidang Industri. *School of Pharmacy ITB*, Bandung. 13-17 Desember 2005. o.1-12.

Hartika, R., Mustahal dan A. N. Putra. 2014. Gambaran darah Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) dengan penambahan dosis probiotik yang berbeda dalam pakan. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. **4**(1) : 259-267.

Irawanto, Y. E., U. Yanuhar and A. Kurniawan. 2018. *In-Vivo Test Of Spirulina Sp* As Inducer Of B-Actin In Cantang Grouper (*Epinephelus Fuscoguttatus-Lanceolatus*) Infected By *Viral Nervous Necrosis*. *Journal of Fisheries and Marine Research*. **2**(3) : 225-234.

Irianto, A. 2005. *Patologi Ikan Teleostei*. Cetakan Pertama. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

Ismi, A., Y.N. Asih dan D. Kusumawati. 2014. Peningkatan produksi dan kualitas benih kerapu dengan program hybridisasi. *Jurnal Oseanologi Indonesia*. **1**(1) : 1-5.

Jaramillo,D., S. Fielder., R. J. Whittington dan P. Hick. 2018. Host, agent and environment interactions affecting *Nervous necrosis virus* infection in Australian bass *Macquaria novemaculeata*. *J Fish Dis*. 1-14.

Kartikasari,I., M. Rusdi dan R. Asyhar .2016. A Problem-Based Instructional Design Model Contruction and Validation to Develop Students' Creativity. *Edu-Sains*. **5**(1) : 56-68.

Kembaren, R.F. dan Rachman, E. A. G. 2005. Karakterisasi Protein Rekombinan. Makalah kursus singkat: Perkembangan terkini dan Prospek Protein Rekombinan dalam Bidang Industri. *School of Pharmacy ITB*, Bandung. 13-17 Desember 2005. 27- 30.

Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia 2015 Nomor Kep.38/Men/2012 Tentang Pelepasan Ikan Kerapu Cantang.

Khumaidi, A. and Umiyah, A. 2019. Potensi antivirus *Viral Nervous Necrosis* ekstrak metanol *Amphora sp.* pada Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus sp.*). *Samakia : Jurnal Ilmu Perikanan*. **10**(2) : 114-120.

Koesharyani, I., Zafran dan I. Yuasa. 1999. Deteksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN) menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada ikan kerapu bebek. *Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Dinas Teknologi Budidaya Laut dan Pantai*. 237-240.

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

Kordi, M. G. H. K. 2008. *Budi daya perairan*. PT Citra Aditya Bakti, Bandung.

Laemml. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970. 15 : **227**(5259) : 680-5.

Lestari, A.T. and Sudaryatma, P.E., 2014. Studi imunositokimia darah dan suspensi organ Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) yang diinfeksi virus isolat lapang penyebab *Viral Nervous Necrosis*. *Jurnal Sain Veteriner*. ISSN, 1260421.

Lin, C-C., Lin, J.H-Y., Chen, M-S., & Yang, H-L. 2007. An oral nervous necrosis virus vaccine that induces protective immunity in larvae of grouper (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture*. **268** : 265-273.

Liu, X-D., Atarashi, T., Furuta, T., Yoshii, H., Aishima, S., Ohkawara, M., et al. 2001. Microencapsulation of emulsified hydrophobic flavours by spray drying. *Drying Technology*, 19, 1361–1374.

Liu, X.D., J.N.Huang., S.P.Weng., X.Q.Hu., W.J.Chen., Z.D.Qin., X.X.Dong., X.L.Liu., Y.Zhou., M.Asim., W.M.Wang and J.G.He. 2015. Infections of nervous necrosis virus in wild and cage-reared marine fish from South China Sea with unexpected wide host ranges. *Journal of Fish Diseases*. **38** : 533–540.

Mahardika, K. and Mastuti, I., 2019. Aplikasi vaksin bivalen (Vaksin Rekombinan Protein VNN dan GSDIV) pada Juvenil Kerapu Sunu, *Plectropomus leopardus* untuk pencegahan infeksi virus dan bakteri. *Prosiding Seminakel*. **1**(1).

Mahardika, K., Mastuti, I., Muzaki, A., & Sudewi. 2016. Addition of adjuvants in recombinant subunit vaccines for the prevention of grouper sleepy disease

- iridovirus (GSDIV) infection in humpback grouper, *Cromileptes altivelis*. *Indonesian Aquaculture Journal*. **11(2)** : 87-95.
- 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.
- Mahasri, G. dan Kismiyati. 2011. *Buku Ajar Parasit dan Penyakit Ikan I* (Ilmu Penyakit Protozoa pada Ikan dan Udang). Universitas Airlangga. Surabaya. hal. 3-4.
- 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.
- Megawati, C., M. Yusuf dan L. Maslukah. 2014. Sebaran kualitas perairan ditinjau dari zat hara, oksigen terlarut dan pH di Perairan Selat Bali Bagian Selatan. *Jurnal Oseanografi*. **3(2)** : 142-150.
- Morgeaux, S., Poirier, B., Ragan, C. I., Wilkinson, D., Arabin, U., Guinet-Morlot, F., ... Chapsal, J.-M. 2017. Replacement of in vivo human rabies vaccine potency testing by in vitro glycoprotein quantification using ELISA – Results of an international collaborative study. *Vaccine*. **35(6)** : 966–971. Doi : 10.1016 / j. vaccine. 2016. 12. 039.
- Mulyani, Y.S., Yulisman dan M. Fitriani. 2014. Pertumbuhan dan efisiensi pakan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang dipuasakan secara periodik. *Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia*. **2(1)** : 1-12.
- Munin, Aude & Florence Edwards-Lévy. 2011. Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. France: Pharmaceutical Journal ISSN 1999-4923. Hal 793-829
- Musa, M., M. Mahmudi dan S. Arsad. 2018. lbM peningkatan produksi ikan kerapu (*Epinephelus sp.*) melalui perbaikan teknologi semi-intensif di Tambak Desa Labuhan Kecamatan Brondong Kabupaten Lamongan. *ABDIMAS*. **22(1)** : 41-50.
- 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. lanceolattus*. Turkish. *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. **18** : 1045-1051.

Noviendri, D. and Sugiyono, S.G., 2006. Teknik Pemekatan, Purifikasi dan Karakterisasi Protein Rekombinan. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*. **1**(1) : 22-27.

Nursida, N.F. 2011. Polimorfisme ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) yang tahan bakteri *vibrio alginolyticus* dan toleransi salinitas rendah serta salinitas tinggi. Skripsi. FPIK-UNHAS: Makassar.

Pentury, E.F., J. Baroleh dan W. M. Wangke. 2016. Partisipasi Anggota Pada Kelompok Tani Susuripen Di Kelurahan Wailan Kecamatan Tomohon Utara Kota Tomohon. *Agri-Sosio Ekonomi Unsrat*. **12**(2): 165-178.

Pudiasuti, L., Pratiwi, T. and Santosa, H., 2013. Pembuatan dekstrin dari tepung tapioka secara enzimatis dengan pemanasan microwave. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*. 169-176.

Putriana, N., W. Tjahjaningsih Dan M. A. Alamsjah. 2015. Pengaruh penambahan perasan Paprika Merah (*Capsicum Annuum*) dalam pakan terhadap tingkat kecerahan warna Ikan Koi (*Cyprinus Carpio L.*). *Jurnal Ilmiah Perikanan Dan Kelautan*. **7**(2) : 189-194.

Qomariyah, N., H. Suprpto dan Sudarn. 2017. Pemberian vaksin formalin *killed cell* (fkc) *vibrio alginolyticus* untuk meningkatkan *survival rate* (sr), titer antibodi dan fagositosis leukosit pada kerapu cantang (*Epinephelus sp.*) Setelah uji tantang Bakteri *Vibrio alginolyticus*. *Jurnal Ilmiah Perikanan*. **9**(1) : 15-24.

Rafaelina, M., Rustam, Y. & Amini, S. (2016). Pertumbuhan dan Aktivitas Antioksidan dari Mikroalga *Porphyridium cruentum* dan *Chlorella sp.* *BIOMA*. **12**(1) : 12-21. DOI : 10.21009/Bioma.

Rahmaningsih, S. Dan A.I. Ari. 2013. Pakan dan pertumbuhan ikan kerapu cantang (*Epinephellus fuscoguttatus-lanceolatus*). *Ekologia*. **13**(2) : 25-30.

Rajan, J. J. S., P. E.P.T., Bhuvaneswari dan K. P. Jithendran. 2016. Design and evaluation of reverse transcription nested PCR primers for the detection of betanodavirus in finfish. *Virus Disease*. **27**(2) : 123-12.

Randrianarison, G dan M. A. Ashraf. 2018. Microalgae Plant (*Chlorella Sp.*) for Wastewater Treatment and Energy Production. *Ekoloji*. **27**(106): 14551465

Rosenberg, M. 1997. Penemu: The Regents of The University of California, a California Corporation. 11 Februari 1997. Milk Derived Whey Protein – Based Microencapsulating Agents and Method of Use. US Patent No. 5, 610, 760.

- Samsisko, R, L, W., H. Suprpto dan S. Sigit. 2014. Respon hematologis Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes Altivelis*) pada suhu media pemeliharaan yang berbeda. *Journal of Aquaculture and Fish*. **3**(1) : 36-43.
- Sani, K. dan Maftukhatusolikhah. 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, S., Ridwan, A. and Arham, Z., 2017. Efektivitas ekstrak daun macaranga tanarius dalam menginaktivasi *Viral Nervous Necrosis* Ikan Kerapu Tikus. *BioWallacea: Jurnal Penelitian Biologi (Journal of Biological Research)*. **4**(1) : 519-526.
- Saparuddin. 2018. Pengaruh ekstrak etanol terhadap peningkatan konsentrasi hemoglobin dan nilai hematokrit Ikan Kerapu Tikus. *Jurnal Saintifik*. **4**(1) : 39-46.
- Sastrosupadi, A. 2000. Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Setyowati, D. N. A. and Astriana, B. H. 2020. Profil darah ikan kakap putih yang diinfeksi bakteri *Vibrio* sp. dengan pemberian lidah buaya (*Aloe Vera*). *Jurnal Perikanan*. **10**(1). 55-69.
- Snyder, G K. dan Brandon, A S. 1999. Red Blood Cells: Centerpiece in the Evolution of the Vertebrate Circulatory System. *American Zoologist*. **39**(2): 189-198.
- Subakti,A., W.A. Kusuma Dan B. Mustafa. 2016. Analisis kualitas situs web pejabat pengelola informasi dan dokumentasi (ppid) perpustakaan nasional ri menggunakan netqual. *Jurnal Pustakawan Indonesia*. **15**(1-2) : 73-77.
- Subyakto, S. dan Cahyaningsih. 2003. Pembenihan Kerapu Skala Rumah. Depok : PT Agromedia Pustaka.
- Sudarno, S. and Qomariyah, N., 2017. Pemberian Vaksin *Formalin Killed Cell* (FKC) *Vibrio alginolitycus* untuk Meningkatkan *Survival Rate* (SR), Titer Antibodi dan Fagositosis Leukosit pada Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. **9**(1) :15-24.
- Sudaryatma, P. E., Artanti. T., Li. Ni. L. S., Ketut, S. W., Sulis, N. H dan Didik, S. 2012. *Imunositokimia Streptavidin Biotin* : deteksi dini *Viral Nervous Necrosis* virus pada lendir ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Jurnal Sain Veteriner*. **30**(1) : 0126-0421.

- Sugama, K., Tridjoko, B., Slamet, S., Ismi, E., Setadi dan S. Kawahara. 2001. Petunjuk teknis produksi benih ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*). BBRPBL, Pusris., DKP dan JICA.
- Sugiyono. 2012. Metode Penelitian Kuantitatif Kualitatif dan R&D. Bandung: Alfabeta.
- Sutarmat, T. Dan H.T. Yudha. 2013. Analisis keragaman pertumbuhan benih kerapu hibrida hasil hibridasi kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dengan kerapu kertang (*Epinephelus lanceolatus*) dan kerapu batik (*Epinephelus microdon*). *J. Ris. Akuakultur*. **8**(3) : 363-371.
- Sutrisno Koswara. (2005). Teknologi enkapsulasi flavor rempah-rempah, www.ebookpangan.com
- 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.
- Tiara, D., Tiho, M. and Mewo, Y.M., 2016. Gambaran kadar limfosit pada pekerja bangunan. *eBiomedik*. **4**(2).
- Utami, D. T., S. B. Prayitno., S. Hastuti., A. Santika. 2013. Gambaran parameter hematologis pada Ikan Nila (*Oreochromis Niloticus*) yang diberi vaksin Dna *Streptococcus Iniae* dengan dosis yang berbeda. *Journal Of Aquaculture Management And Technology*. **2**(4) : 7-20.
- Wahyudi, Y. A., U. Yanuhar and Maftuch. 2018. Expression of Hsp70 and β -actin genes as the immune response against viral nervous necrosis that infected asian seabass (*Lates calcalifer*). *J. Exp. Life Sci*. **8**(3) : 139–147.
- Winarno, F. G. 2004. Kimia Pangan dan Gizi. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Yanuhar, U dan A. Khumaidi. 2017. The application of pigment-protein fraction from *Nannochloropsis oculata* on β -actin response of *Cromileptes altivelis* infected with viral nervous necrosis. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. **16**(1) : 22–32.
- Yanuhar, U. 2011. The Function of Receptor Protein Humpback Grouper *Cromileptes altivelis* in Expression and Proliferation of CD4 and CD8 cells in Defence Immunity of *Viral Nervous Necrotis* Infection. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*. **1**(2).
- Yanuhar, U. 2016. *Mikroalga Laut Nannochloropsis oculata*. Malang. UB Press.

Yanuhar, U., Al-Hamidy, and N. R. Caesar. 2019. Treatment of *Chlorella sp.* extract on heat shock cluster (HSC) response from the tissue and bloodcells proliferation of *Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus* infected by Viral Nervous Necrosis The 1st International Conference on Fisheries and Marine Science IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 236 (2019) 012100. IOP Publishing doi : 10.1088/1755- 1315/236/1/012100.

Yanuhar, U., N.R. Caesar, N.S. Junirahma, Y. Deliza dan M. Musa. 2020. Water quality in floating net cages pond of humpback grouper (*Cromileptes altivelis*) infected by viral nervous necrosis. *Earth and Environmental Science*. **493**(1): 1-6.

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.

Yuni, K, P., H. Hasan, E. Prasetio. 2019. Studi hematologi Ikan Semah (*Tor Douronensis*), Jelawat (*Leptobarbus Hoeveni*), Tengadak (*Barbonymus Schwanenfeldi*), Biawan (*Helostoma Temmincki*), dan Botia (*Chromobotia Macracanthus*). *Jurnal Ruaya*. **7**(1) : 65-69.

Zafran. 2016. Efektivitas kombinasi vaksin bakteri polivalen dengan vaksin anti grouper sleepy disease iridovirus (GSDIV) pada ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Berita Biologi*. **15**(1) : 95-100.

Zorriehzahra, M. E. J., M. Ghasemib, M. Ghiasi, S. Haghghi 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.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Lokasi Penelitian



Lampiran 2. Alat dan Bahan Penelitian

a. Alat dan bahan pemeliharaan sampel Ikan Kerapu Cantang (*Ephinephelus* sp.)

No.	Kegiatan	Satuan	Alat	Bahan
1.	Pemeliharaan Ikan Sampel	Ekor	- Bak - Aerator	- Kertas label - Detergen

b. Alat dan bahan pengukuran kualitas air

No.	Parameter	Satuan	Alat	Bahan
1.	Suhu	°C	- Termometer	- Air sampel
			- Hg	- Tisu
2.	Salinitas	ppm	- Refraktometer	- Air sampel
			- Pipet Tetes	- Aquades
				- Tisu
3.	pH		- pH Meter	- Air sampel

			- Kotak Standart	
4.	DO (Dissolved oxygen)	Mg/l	- Botol DO - Pipet tetes - Biuret - Statif - Pipet Volume	- Air sampel - Aquades - MnCl ₂ - NaOH+KI - H ₂ SO ₄ - Amilum - Na ₂ S ₂ O ₃



c. Alat dan Bahan Uji Hematologi Ikan Kerapu Cantang (*Ephinephelus* sp.)

No.	Kegiatan	Alat	Bahan
1.	Pengambilan Darah	- S spuit 1 cc - Appendorf	- EDTA 10 %
2.	Pengukuran Total Eritrosit	- Pipet - S spuit 1 cc - Haemacytometer - Cover Glass - Mikroskop	- Larutan Hayem's
3.	Pengukuran Total Leukosit	- S spuit 1 cc - Pipet - Haemacytometer - Cover Glass - Mikroskop	- Larutan Turk's
4.	Pengukuran Konsentrasi Hemoglobin	- S spuit 1 cc - Pipet Tetes - Aquades - Haemometer	- Larutan HCL 0,1 N
5.	Pengukuran Diferensial Leukosit	- Mikroskop - Pipet Tetes - Cover Glass - S spuit 1 cc	- Larutan Giemsa

Lampiran 3. Hasil Pengukuran Jumlah Sel Darah Merah (Eritrosit)

Perlakuan/Hari	1	2	3	4	5	6	7
Ikan Sehat	600000	700000	650000	750000	650000	600000	660000
Ikan VNN	460000	460000	500000	450000	500000	550000	500000
Ikan C1	500000	550000	600000	650000	500000	520000	480000
Ikan C2	700000	600000	650000	600000	550000	450000	400000
Ikan C3	480000	500000	450000	550000	450000	400000	370000
Ikan C4	480000	550000	500000	480000	400000	360000	300000
Ikan C5	750000	600000	650000	500000	360000	300000	320000
Ikan C6	550000	650000	600000	550000	50000	450000	290000

Lampiran 4. Hasil pengukuran Jumlah Sel Darah Putih (Leukosit)

Perlakuan/Hari	1	2	3	4	5	6	7
Ikan Sehat	200000	300000	250000	350000	400000	250000	200000
Ikan VNN	400000	450000	500000	400000	350000	300000	350000
Ikan C1	160000	165000	165000	180000	170000	250000	200000
Ikan C2	160000	150000	170000	160000	150000	200000	180000
Ikan C3	300000	350000	300000	400000	200000	175000	145000
Ikan C4	350000	400000	350000	300000	200000	180000	170000
Ikan C5	160000	170000	200000	150000	250000	230000	140000
Ikan C6	350000	400000	370000	280000	180000	100000	120000

Lampiran 5. Hasil Pengukuran Konsentrasi Hemoglobin (Hb) (gr%)

Perlakuan/Hari	1	2	3	4	5	6	7
Ikan Sehat	2	2,3	2,4	5	2,6	3	2,8
Ikan VNN	2,4	2,3	2,3	2,5	2,1	2,1	2,3
Ikan C1	3	2,1	2,3	3	2,4	2,7	2,5
Ikan C2	2,2	2,1	2,3	3,4	2,2	2,2	2,2
Ikan C3	3	2,1	2	2,3	2	2	2,3
Ikan C4	3,7	2,2	2,2	2,3	2,3	2,5	2
Ikan C5	3	2,1	2,1	3,3	2,4	2,3	2,3
Ikan C6	2,5	2,3	2,3	5,3	2,2	2,4	2,1

Lampiran 6. Hasil Perhitungan Diferensial Leukosit

a. Diferensial Leukosit Ikan Sehat

Waktu	Sampel	Limfosit	Basofil	Neutrofil	Monosit
Hari 1	Ikan Sehat	53%	25%	15%	7%
Hari 2	Ikan Sehat	52%	18%	20%	10%
Hari 3	Ikan Sehat	50%	22%	18%	10%
Hari 4	Ikan Sehat	51%	29%	10%	10%
Hari 5	Ikan Sehat	52%	28%	10%	10%
Hari 6	Ikan Sehat	55%	22%	12%	11%
Hari 7	Ikan Sehat	60%	20%	12%	8%

b. Diferensial Leukosit Ikan VNN

Waktu	Sampel	Limfosit	Basofil	Neutrofil	Monosit
Hari 1	Ikan VNN	50%	23%	17%	10%
Hari 2	Ikan VNN	50%	22%	18%	10%
Hari 3	Ikan VNN	54%	26%	12%	8%
Hari 4	Ikan VNN	51%	25%	14%	10%
Hari 5	Ikan VNN	53%	23%	14%	10%
Hari 6	Ikan VNN	50%	20%	17%	13%
Hari 7	Ikan VNN	50%	20%	20%	10%

c. Diferensial Leukosit Ikan C1

Waktu	Sampel	Limfosit	Basofil	Neutrofil	Monosit
Hari 1	Ikan C1	54%	26%	12%	8%
Hari 2	Ikan C1	55%	25%	10%	10%
Hari 3	Ikan C1	52%	28%	10%	10%
Hari 4	Ikan C1	53%	23%	16%	8%
Hari 5	Ikan C1	50%	22%	18%	10%
Hari 6	Ikan C1	51%	24%	15%	10%
Hari 7	Ikan C1	55%	20%	15%	10%

d. Diferensial Leukosit Ikan C2

Waktu	Sampel	Limfosit	Basofil	Neutrofil	Monosit
Hari 1	Ikan C2	57%	23%	15%	5%
Hari 2	Ikan C2	50%	23%	10%	17%
Hari 3	Ikan C2	57%	23%	16%	4%
Hari 4	Ikan C2	55%	25%	10%	10%
Hari 5	Ikan C2	54%	25%	16%	5%
Hari 6	Ikan C2	53%	22%	13%	12%
Hari 7	Ikan C2	50%	29%	12%	9%

e. Diferensial Leukosit Ikan C3

Waktu	Sampel	Limfosit	Basofil	Neutrofil	Monosit
Hari 1	Ikan C3	53%	27%	10%	10%
Hari 2	Ikan C3	57%	23%	12%	8%
Hari 3	Ikan C3	52%	17%	13%	18%
Hari 4	Ikan C3	54%	24%	12%	10%
Hari 5	Ikan C3	52%	27%	11%	10%
Hari 6	Ikan C3	51%	24%	16%	9%
Hari 7	Ikan C3	54%	19%	14%	13%

f. Diferensial Leukosit Ikan C4

Waktu	Sampel	Limfosit	Basofil	Neutrofil	Monosit
Hari 1	Ikan C4	55%	24%	11%	10%
Hari 2	Ikan C4	56%	24%	13%	7%
Hari 3	Ikan C4	55%	25%	12%	8%
Hari 4	Ikan C4	53%	22%	13%	12%
Hari 5	Ikan C4	55%	23%	12%	10%
Hari 6	Ikan C4	52%	23%	13%	12%
Hari 7	Ikan C4	58%	22%	11%	9%

g. Diferensial Leukosit Ikan C5

Waktu	Sampel	Limfosit	Basofil	Neutrofil	Monosit
Hari 1	Ikan C5	52%	28%	13%	7%
Hari 2	Ikan C5	53%	27%	14%	6%
Hari 3	Ikan C5	54%	26%	14%	6%
Hari 4	Ikan C5	52%	23%	15%	10%
Hari 5	Ikan C5	52%	26%	13%	9%
Hari 6	Ikan C5	53%	27%	10%	10%
Hari 7	Ikan C5	57%	17%	13%	13%

h. Diferensial Leukosit Ikan C6

Waktu	Sampel	Limfosit	Basofil	Neutrofil	Monosit
Hari 1	Ikan C6	50%	20%	15%	15%
Hari 2	Ikan C6	55%	20%	15%	10%
Hari 3	Ikan C6	53%	27%	14%	6%
Hari 4	Ikan C6	50%	25%	14%	11%
Hari 5	Ikan C6	53%	24%	12%	11%
Hari 6	Ikan C6	52%	22%	18%	8%
Hari 7	Ikan C6	59%	24%	9%	8%

Lampiran 7. Hasil pengukuran kualitas air ikan kerapu cantang (*Ephinephelus* sp.)

a. Tabel Hasil Pengukuran Suhu (°C)

Suhu	K(-)	K(+)	CS1	CS2	CS3	CV1	CV2	CV3
Hari ke-0	30	30	30	30	30	30	30	30
Minggu ke-1	31	31	31	31	31	31	31	31
Minggu ke-2	30	31	30	30	30	31	30	31
Minggu ke-3	30	30	30	31	30	30	30	30
Minggu ke-4	30	31	30	30	30	31	30	31
Minggu ke-5	31	30	31	30	31	30	30	30

b. Tabel Hasil Pengukuran pH

pH	K(-)	K(+)	CS1	CS2	CS3	CV1	CV2	CV3
Hari ke-0	7,5	7,58	7,56	7,58	7,57	7,5	7,58	7,56
Minggu ke-1	7,56	7,57	7,58	7,58	7,5	7,58	7,57	7,58
Minggu ke-2	7,58	7,5	7,57	7,56	7,58	7,56	7,58	7,5
Minggu ke-3	7,58	7,56	7,58	7,57	7,58	7,58	7,5	7,58
Minggu ke-4	7,57	7,58	7,5	7,58	7,5	7,58	7,57	7,58
Minggu ke-5	7,5	7,57	7,58	7,5	7,58	7,56	7,58	7,56

c. Tabel Hasil Pengukuran Oksigen Terlarut (DO)

DO	K(-)	K(+)	CS1	CS2	CS3	CV1	CV2	CV3
Hari ke-0	17,2	18,6	17,5	18	17,7	19,1	18,5	17,4
Minggu ke-1	18,6	17,7	18,5	17,2	19,1	17,4	17,5	18
Minggu ke-2	17,5	17,2	19,1	18,6	17,4	18	19,1	19,1
Minggu ke-3	17,7	18,5	18	17,5	17,2	19,1	18,6	17,4
Minggu ke-4	19,1	18	17,4	18,6	17,7	17,5	17,2	18,5
Minggu ke-5	17,4	18,5	18,6	17,5	18	17,2	19,1	17,7

d. Tabel Hasil Pengukuran Salinitas

Salinitas	K(-)	K(+)	CS1	CS2	CS3	CV1	CV2	CV3
Hari ke-0	30	30	30	30	30	30	30	30
Minggu ke-1	30	30	30	30	30	30	30	30
Minggu ke-2	30	30	30	30	30	30	30	30
Minggu ke-3	30	30	30	30	30	30	30	30
Minggu ke-4	30	30	30	30	30	30	30	30
Minggu ke-5	30	30	30	30	30	30	30	30