

**EKSTRAK KASAR MIKROALGA LAUT *Spirulina* sp SEBAGAI
INDUCER β -AKTIN UNTUK ANTI INFLAMASI PADA IKAN KERAPU
CANTANG (*Epinephelus* sp) YANG DIINFEKSI VIRAL NERVOUS
NECROSIS (VNN)**

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister**



Oleh :

**YOVAN ENDIK IRAWANTO
166080100111022**

**PROGRAM PASCA SARJANA BUDIDAYA PERAIRAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2018



**EKSTRAK KASAR MIKROALGA LAUT *Spirulina* sp SEBAGAI
INDUCER β -AKTIN UNTUK ANTI INFLAMASI PADA IKAN KERAPU
CANTANG (*Epinephelus* sp) YANG DIINFEKSI VIRAL NERVOUS
NECROSIS (VNN)**

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister**

Oleh :

**YOVAN ENDIK IRAWANTO
NIM. 166080100111022**

**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
MINAT LINGKUNGAN**

**PROGRAM PASCASARJANA
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**EKSTRAK KASAR MIKROALGA LAUT *Spirulina* sp SEBAGAI
INDUCER β -AKTIN UNTUK ANTI INFLAMASI PADA IKAN KERAPU
CANTANG (*Epinephelus* sp) YANG DIINFEKSI VIRAL NERVOUS
NECROSIS (VNN)**

TESIS

OLEH

YOVAN ENDIK IRAWANTO
NIM. 166080100111022

Telah dipertahankan di depan penguji
Pada tanggal : 23 Juli 2018
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui :

Pembimbing I

Pembimbing II

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

Andi Kurniawan, S.PI., M.Eng., D.Sc
NIP. 19790331 200501 1 003

Tanggal: 24 JUL 2018

Tanggal: 24 JUL 2018

Mengetahui,

Dekan
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan



Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS
NIP. 19600322 198601 1 001

Tanggal: 24 JUL 2018



JUDUL TESIS:

**EKSTRAK KASAR MIKROALGA LAUT *Spirulina sp* SEBAGAI
INDUCER β -AKTIN UNTUK ANTI INFLAMASI PADA IKAN KERAPU
CANTANG (*Epinephelus sp*) YANG DIINFEKSI VIRAL NERVOUS
NECROSIS (VNN)**

Nama Mahasiswa : Yovan Endik Irawanto

NIM : 166080100111022

Program Studi : Magister Budidaya Perairan

Minat : Lingkungan

KOMISI PEMBIMBING :

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

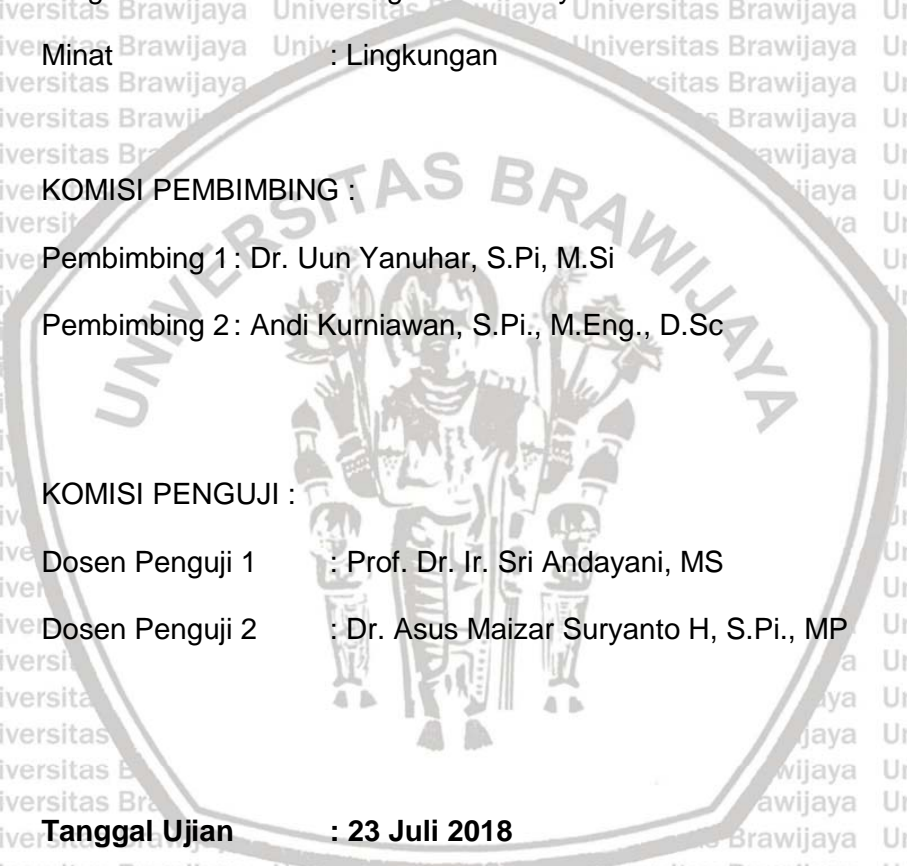
Pembimbing 2 : Andi Kurniawan, S.Pi., M.Eng., D.Sc

KOMISI PENGUJI :

Dosen Penguji 1 : Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS

Dosen Penguji 2 : Dr. Asus Maizar Suryanto H, S.Pi., MP

Tanggal Ujian : 23 Juli 2018





PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah tesis ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini serta disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila di dalam naskah tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur plagiasi, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Malang, Juli 2018
Mahasiswa,



Yovan Endik Irawanto
NIM.166080100111022

RIWAYAT HIDUP



Nama lengkap penulis yaitu, Yovan Endik Irawanto, lahir di Malang pada tanggal 05 Mei 1993 dari pasangan suami-istri bapak Sumaji dan ibu Suryanti. Adapun riwayat pendidikan penulis yaitu pada tahun 2005 lulus dari SD Negeri 1 Tambakrejo, pada tahun 2008 lulus dari SMP Negeri 1 Sumbermanjing Wetan, dan pada tahun 2011 lulus dari SMA

Negeri 1 Turen. Pada tahun 2015 lulus dari Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang. Pada tahun 2016 penulis melanjutkan pendidikan di Program Pendidikan Strata Dua (S2) Magister Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Jawa Timur. Saat menempuh program S1 penulis membuat tugas akhir (Skripsi) dengan judul "Pemanfaatan Fragmen Pigmen Protein Mikroalga Laut *Nannochloropsis oculata* Yang Diuji Secara In-Vivo Pada Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*)". Saat menempuh program S2 penulis membuat tugas akhir (Tesis) yang berjudul "Ekstrak Kasar Mikroalga Laut *Spirulina* Sp Sebagai Inducer β -aktin untuk Anti Inflamasi Pada Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp) yang Diinfeksi Viral Nervous Necrosis (VNN)".

UCAPAN TERIMA KASIH

Selama menyelesaikan penyusunan Tesis ini penulis telah banyak menerima bantuan dan dukungan dari banyak pihak. Untuk itu, dengan segala kerendahan hati penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang turut membantu, khususnya :

1. Allah SWT atas segala limpahan Rahmat dan Hidayah-Nya, sehingga penulis mampu menyelesaikan Tesis ini dan tidak lupa Shalawat serta Salam untuk Nabi Muhammad SAW.
2. Kedua orang tua (Bapak Sumaji dan Ibu Suryanti) serta adik (Riyan Dwi Cahyono) yang selalu memberikan kasih sayang, doa, motivasi yang tak terhingga.
3. Bapak Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS selaku Dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.
4. Ibu Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS selaku Ketua Program Magister Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya dan selaku dosen penguji.
5. Ibu Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si dan Bapak Andi Kurniawan, S.Pi., M. Eng., D.Sc selaku dosen pembimbing yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan dan pengarahan.
6. Bapak Dr. Asus Maizar Suryanto H, S.Pi., MP selaku dosen penguji, terimakasih atas masukan dan sarannya.
7. Bapak dan Ibu Dosen serta Keluarga Besar FPIK Universitas Brawijaya atas bantuan serta dukungannya.
8. Teman-teman Pascasarjana Magister FPIK UB khususnya angkatan 2016 terima kasih atas kebersamaan, persahabatan, motivasi dan bantuan dalam bentuk apapun yang telah diberikan selama masa pendidikan.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa Tesis ini masih jauh dari sempurna. Karena sejatinya kesempurnaan hanya milik Allah SWT. Sehingga kritik dan saran sangat diharapkan dari semua pihak demi perbaikan dimasa mendatang. Akhirnya, semoga Tesis ini dapat bermanfaat bagi semua pihak, aamiin ya robbal alamin.

RINGKASAN

YOVAN ENDIK IRAWANTO. Program Studi Magister Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang. Tesis tentang “Ekstrak Kasar Mikroalga Laut *Spirulina* sp Sebagai Inducer β -aktin untuk Anti Inflamasi Pada Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp) yang Diinfeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN)”, (Dibawah bimbingan **Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.Si dan Andi Kurniawan, S.Pi., M.Eng., D.Sc.**).

Ikan dari subfamili Epinephalinae (kerapu) memiliki nilai ekonomi yang cukup besar di daerah tropis dan subtropis. Secara khusus, ikan hidup sangat berharga di Asia Tenggara (Sadovy *et al.*, 2008). Tingginya harga ini menyebabkan peningkatan budidaya. Upaya budidaya biasanya terkendala oleh berbagai penyakit dan virus. Kendala pada kelompok *Epinephelus* (Kerapu) yang dibudidayakan di Indonesia adalah terbatasnya benih akibat infeksi virus yang menyebabkan kematian hingga 80%, bahkan bisa sampai 100% (Yanuhar *et al.*, 2012). Kematian benih tersebut disebabkan karena serangan *Viral Nervous Necrosis*. VNN menyebabkan retinopati dan ensefalopati yang memiliki jangkauan inang yang luas (Yuasa *et al.*, 2000).

Pemanfaatan mikroalga sudah banyak dikembangkan, terutama dalam bidang farmakologi yang nantinya digunakan sebagai antiviral. Beberapa penelitian menjelaskan bahwa ekstrak dari mikroalga telah menunjukkan aktivitas antiviral (Kok *et al.*, 2011), kemudian fraksi polisakarida dari mikroalga juga berpotensi untuk menghambat produksi retrovirus (Talyshinsky *et al.*, 2002). Salah satu mikroalga yang dapat dimanfaatkan yaitu *Spirulina* (*Arthrospira*). Pemanfaatan *Spirulina* tidak hanya mampu mendukung pertumbuhan ikan. Beberapa penelitian juga menyebutkan mikroalga *Spirulina* dapat digunakan dalam manajemen kesehatan ikan karena mikroalga ini mengandung protein, vitamin, dan mineral yang tinggi serta senyawa aktif biologis seperti pigmen, diantaranya *chlorophyll a* dan β -karoten (Bhat & Madyastha, 2000) yang dapat dimanfaatkan sebagai antiviral, antioksidan, dan antimikroba. Kim *et al.*, (2001) juga menambahkan bahwa karotenoid yang terdapat pada *Spirulina* juga dapat digunakan sebagai inducer untuk peningkatan sistem imun. Selain itu fragmen pigmen protein dari mikroalga dapat dimanfaatkan untuk anti-inflamasi pada saat virus ssRNA menyerang ikan kerapu (Yanuhar, 2015).

Sitoskeleton berperan penting dalam menghadapi serangan virus atau penyakit. Pada dasarnya sitoskeleton terdiri dari tiga komponen yaitu mikrotubul, aktin filamen, dan intermediet filamen. Aktin sendiri merupakan protein, dan paling banyak ditemukan pada sel eukariotik serta memiliki peran penting dalam interaksi protein. Secara umum aktin sitoskeleton yang terdapat pada organisme ada tiga macam yaitu α -aktin, γ -aktin, dan β -aktin (Artman *et al.*, 2014). β -aktin dapat dikatakan sebagai *housekeeping gen*, dimana gen atau protein ini dibutuhkan sebagai dasar dalam pemeliharaan seluler. β -aktin berperan sebagai kunci dalam mempertahankan struktur sitoskeletal, sitokinesis, endositosis, motilitas sel, dan adhesi sel (Ayscough, 2004). β -aktin juga termasuk salah satu gen yang dapat mentranskripsi kode, yang mana digunakan sebagai dasar induksi untuk ekspresi gen (Linzer dan Nathans, 1983). Karena β -aktin memiliki tingkat ekspresi lebih stabil dibandingkan kontrol internal lainnya, maka β -aktin merupakan salah satu referensi gen paling baik digunakan sebagai ekspresi gen dalam meningkatkan respon imun yang nantinya akan menghambat proses

transkripsi virus (VNN) di dalam sel. Dengan demikian tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui manfaat ekstrak kasar mikroalga laut *Spirulina* sp terhadap ekspresi β -aktin (sebagai inducer) pada ikan kerapu cantang yang diinfeksi VNN.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimen. Pengamatan dilakukan pada perlakuan (a) ikan kontrol (ikan tanpa perlakuan), (b) ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp, (c) ikan dengan pemberian VNN, dan (d) ikan dengan pemberian *Spirulina* sp dan pada hari ke-5 diinfeksi VNN. Metode analisa yang digunakan adalah PCR, nested RT-PCR, IHC, dan ANOVA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kasar *Spirulina* sp mengandung senyawa bioaktif seperti flavonoid, alkaloid, terpenoid, tanin dan saponin. Hasil uji in vivo menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kasar *Spirulina* sp berpengaruh terhadap ekspresi β -aktin. Hasil kuantifikasi PCR (β -aktin) dan nested RT-PCR (VNN) menunjukkan kemunculan band, yakni terdeteksi pada 150 bp untuk β -aktin dan terdeteksi 294 bp untuk VNN. Berdasarkan hasil rata-rata secara kuantitatif menggunakan analisis ImmunoRatio persentase kemunculan β -aktin pada ikan kontrol sebesar 24,5%, pada perlakuan (S1) persentase kemunculan β -aktin 57%, pada perlakuan (S2) persentase kemunculan β -aktin 63,3%, pada perlakuan (S3) persentase kemunculan β -aktin 63,5%, pada perlakuan (V) persentase kemunculan β -aktin 63,6%, pada perlakuan (SV1) persentase kemunculan β -aktin 62,7%, pada perlakuan (SV2) persentase kemunculan β -aktin 64,7%, dan pada perlakuan (SV3) persentase kemunculan β -aktin 63,6%. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa kandungan senyawa aktif dari ekstrak kasar *Spirulina* sp mampu berperan sebagai inducer dan dapat meningkatkan ekspresi β -aktin, hal ini terkait dengan peran dan fungsi β -aktin sebagai *housekeeping gen* dimana peningkatan ekspresi β -aktin akan meningkatkan sistem imun pada ikan terutama dalam menghadapi serangan virus ssRNA positif (VNN).



SUMMARY

YOVAN ENDIK IRAWANTO. Magister of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Marine Science, Brawijaya University Malang. Thesis of "Crude Extract of Sea Microalgae *Spirulina* sp As β -actin's Inducer for Anti Inflammation on Cantang's Grouper (*Epinephelus* sp) Which Infected by Viral Nervous Necrosis (VNN), (Under guidance of **Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.Si and Andi Kurniawan, S.Pi., M.Eng., D.Sc**)

Fish from subfamily of Epinephaline (grouper) has high economic value in tropic and subtropic area. Specifically, this fish live valuablely in South-east Asia (Sadovy *et al.*, 2008). The increasing of culture for this fish was causing by the high value of this fish. Effort for culturing has obstacles such as diseases and viruses. The obstacles on culturing of *Epinephelus* (grouper) in Indonesia are the limitation of this juvenile because of viruses infection and causing of mortality up to 80% until 100% (Yanuhar *et al.*, 2012). The mortality from this juvenile has caused by attacking of *Viral Nervous Necrosis*. VNN cause retinopation and ensefalopation which has large range of host (Yuasa *et al.*, 2000).

The usage of microalgae has been widely developed, especially in pharmacology as antiviral. Some researchs explained if extract of microalgae has shown antiviral activity (Kok *et al.*, 2011), and then the polysaccharide fraction of microalgae has potentation for inhibiting the production of retrovirus (Talyshinsky *et al.*, 2002). One of microalgae which can be used is *Spirulina* (*Arthrospira*). The usage of *Spirulina* is not only to supporting the fish growth. The usage of *Spirulina* also for fish healthy management because this microalgae consist high protein, vitamin, and mineral and then consist of biology active compounds like pigment, such as chlorophyll a and β -carotene (Bhat & Madyastha., 2000) which has been used as antiviral, antioxidant and antimicrobial. Kim *et al.*, (2001) added if caratenoid on *Spirulina* could be used for inducer to increasing immune system. The other, protein's pigment fragment of microalgae could be used for anti-inflammation when the ssRNA virus attacking the grouper (Yanuhar, 2015).

Chitoskeleton has important role on against the virus attack or diseases. Basically, chytoskeleton consist of three components, microtubule, actin filament and intermediate filament. Actin is protein, and finds the most of eukaryotic cells and has important role on protein interaction. Generally, chitoskeleton actin which finds on organism has three types, they are α -actin, γ -actin and β -actin (Artman *et al.*, 2004). β -actin or housekeeping gen, is where this gen or protein be required as the basic of cellular maintenance. β -actin acts as key in defending the structural of chitoskeletal, endocytosis, cell motility and cell adhesion (Ayscough, 2004). β -actin also belonging of gen which has the role of code transcribing, which used as basic of induction for gen expression (Linzaer and Nathans, 1983). β -actin is more stable in expression level than other internal controls, so β -actin is the one of the best reference gen which used as gen expression for increasing immune response and than could be preventing the process of viruses transcription (VNN)

in cell. So, the purpose of this research is to knowing the fuction of sea microalgae crude extract *Spirulina* sp for β -actin expression (as inducer) on cantang's grouper which infected by VNN.

The method of this research is experimental. The observation has bee done on treatment (a) the control fish (fish without treatment), (b) fish with given treatment of *Spirulins* sp extract, (c) fish with given treatment of VNN, and (d) fish with given treatment of *Spirulina* sp and in the fifth day infected of VNN. The analyze methods used PCR, nested RT-PCR, IHC and ANOVA. The results showed that the crude extract of *Spirulina* sp consist of bioactive compounds, such as flavonoid, alkaloid, terpenoid, tannis and saponin. In vivo test showed that the given of crude extract of *Spirulina* sp effected for β -actin expression. The quantification of PCR (β -actin) and nested RT-PCR (VNN) showed of band's epearance in 150 bp for β -actin and 249 bp for VNN. Based on the average quantitatively result using Immuno Ratio analysis, the percentage of β -actin's appearance from control fish was 24,5%, on treatment (S1) the percentage was 57%, on treatment (S2) the percentage was 63,3%, on treatment (S3) the percentage was 63,5%, on treatment (V) the percentage was 63,6%, on treatment (SV1) the percentage was 62,7%, o treatment (SV2) the percentage was 64,7%, on treatment (SV3) the percentage was 63,6%. Based on the results, we concluded if the active compounds of the *Spirulina* sp's crude extract could be used for inducer and could be increasing of β -actin expression. It was relating to the role and function of β -actin as housekeeping gen where the increasing of β -actin expression will increasing immune system on fish, especially to against ssRNA positive viruses (VNN) attack.

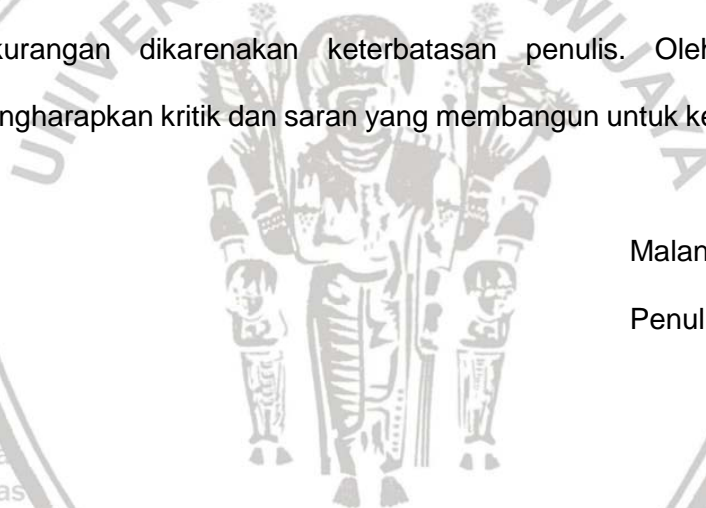
KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan syukur atas kehadiran Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyajikan Proposal Tesis yang berjudul Ekstrak Kasar Mikroalga Laut *Spirulina* sp Sebagai Inducer β -aktin untuk Anti Inflamasi Pada Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* Sp) yang Diinfeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN). Di dalam tulisan ini, diinformasikan kandungan yang terdapat pada mikroalga laut (*Spirulina* sp) serta peran dari aktivitas ekstrak kasar *Spirulina* sp yang dapat dimanfaatkan sebagai inducer β -aktin dalam peningkatan sistem imun pada ikan kerapu cantang yang terinfeksi VNN.

Sangat disadari bahwa dalam penulisan laporan ini masih banyak kekurangan dikarenakan keterbatasan penulis. Oleh karena itu penulis mengharapakan kritik dan saran yang membangun untuk kesempurnaan tulisan ini.

Malang, 20 Juli 2018

Penulis



GLOSARIUM

Istilah	Definisi
<i>Adlibitum</i>	Pemberian pakan ke dalam perairan sedikit demi sedikit hingga ikan kenyang.
Antibodi	Molekul yang terbentuk dalam tubuh hewan dan manusia sebagai tanggapan terhadap adanya antigen.
Antigen	Substansi yang biasanya berupa protein yang mampu menstimulasi organisme untuk memproduksi antibodi dan mampu berkombinasi sehingga diproduksi antibodi.
Anti-inflamasi	Zat yang dapat menghilangkan radang yang disebabkan bukan karena mikroorganisme (non infeksi), namun yang timbul sebagai respon cedera jaringan dan infeksi.
Apoptosis	Aksi bunuh diri sel yang dikenal juga sebagai kematian terprogram, di mana program bunuh diri ini diaktivasi dan diregulasi oleh sel itu sendiri
Infeksi	Pengenalan agen infeksi seperti virus atau bakteri ke dalam host sel atau organisme.
Inflamasi	Upaya tubuh untuk perlindungan diri, tujuannya adalah untuk menghilangkan rangsangan berbahaya, termasuk sel-sel yang rusak, iritasi, atau patogen dan memulai proses penyembuhan.
Interferon	Molekul sitokin berupa protein berjenis glikoprotein yang disekresi oleh sel vertebrata karena akibat rangsangan biologis, seperti virus, bakteri, protozoa, mycoplasma, mitogen, dan senyawa lainnya
Immunity	Sistem imun yang berperan melawan protein tubuh dan molekul lain seperti yang terjadi pada autoimun dan melawan sel yang teraberasi.
Limfosit B	Sel-sel dalam sistem imun yang mengkhususkan diri dalam pembentukan antibodi
Limfosit T	Sel-sel yang berperan pada berbagai fungsi imunologi yang berbeda, yaitu sebagai efektor pada respons imun seluler dan sebagai regulator yang akan mengatur kedua respons imun
Necrosis	Sekelompok sel yang mengalami perubahan atau kematian tanpa terprogram

<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> (PAMPs)	Biomolekul inang yang dapat memulai dan mengabadikan respon inflamasi yang disebabkan oleh patogen.
Preparasi jaringan	Teknik pemotongan organ target penyakit virus tertentu untuk memudahkan dalam proses jaringan
Reseptor	Bagian target pada tingkat molekuler yang mengelilingi substansi sebagai hasil dari interaksi spesifik. Bagian organisme yang merespon terhadap stimuli spesifik seperti chemoreseptor, osmoreseptor atau potoreseptor
Sistem Imun	Sistem pertahanan atau kekebalan tubuh, yang terdiri dari Sistem imun <i>Innate</i> dan Sistem imun <i>Adaptive</i>
Sistem imun <i>Adaptive</i>	Sistem imun dapatan yang mempunyai ciri ;(1) memiliki spesifitas yang dapat membedakan tiap-tiap molekul dari agen penginfeksi dan (2) memiliki sistem memori yang mampu untuk mengingat agen penginfeksi yang pernah masuk atau terpapar di dalam tubuhnya
Sistem imun <i>Innate</i>	Sistem kekebalan alami atau system imun non spesifik yang merupakan pertahanan tubuh terdepan dalam menghadapi berbagai antigen.
Sitokin	Sitokin merupakan glikoprotein yang dapat larut ketika dilepaskan oleh sel system immune (disekresi terutama dari leukosit) yang berperan dalam non <i>enzmatically</i> reseptor spesifik untuk meregulasi respon imun.
<i>Toll Like Receptor</i> (TLR)	Reseptor pada membran sel atau kelompok protein pada membran sel sebagai reseptor yang secara luas mengenal molekul mikroba serta dapat stimulasi respon innate imun bawaan.
<i>Viral nervous necrisos</i> (VNN)	Jenis virus Nodaviridae yang menyerang sebagian besar ikan.
Virus	Suatu partikel yang mengandung bahan genetik berupa DNA atau RNA yang diselubungi oleh protein dan pada beberapa virus ada juga komponen lain, misalnya lemak

DAFTAR ISI

RINGKASAN.....	viii
SUMMARY.....	x
KATA PENGANTAR.....	xii
DAFTAR ISI.....	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvii
DAFTAR TABEL.....	xviii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xix
1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	4
1.4.2 Manfaat Praktis.....	5
1.5 Waktu dan Tempat.....	5
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Ikan Kerapu Cantang.....	6
2.2 Mekanisme Sistem Imun Pada Ikan.....	9
2.2.1 Respon imun bawaan (<i>innate</i> atau non-spesifik).....	11
2.2.2 Respon imun adaptif (Spesifik).....	13
2.3 Pengenalan Reseptor Terhadap Antigen.....	14
2.4 Peranan Aktin dalam Sistem Imun.....	15
2.4.1 β -aktin.....	16
2.4.2 Peran β -aktin dalam Pemberian Sinyal.....	17
2.5 Virus.....	18
2.5.1 <i>Viral Nervous Necrosis</i> (VNN).....	19
2.5.2 Tanda Klinis dan Histopatologi Ikan yang Terkena VNN.....	20
2.6 PCR dan RT-PCR.....	21
2.7 Peptida Bioaktif Mikroalga.....	23
2.7.1 Fragmen Pigmen Protein.....	23
2.7.2 Karotenoid.....	25
2.7.3 Kolagen.....	26
2.7.4 Mekanisme Peptida untuk Anti inflamasi.....	26
2.8 Mikroalga <i>Spirulina</i>	27
2.8.1 Klasifikasi dan Morfologi <i>Spirulina</i>	29
2.8.2 Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan <i>Spirulina</i>	30
2.8.3 Masa Pertumbuhan <i>Spirulina</i>	32
2.8.4 Pemanfaatan Mikroalga <i>Spirulina</i>	34
2.9 Acuan penggunaan dosis untuk uji in-vivo ikan kerapu cantang.....	35
3. KERANGKA KONSEP PENELITIAN.....	37
3.1 Landasan Teori.....	37
3.2 Kerangka Konsep Penelitian.....	39
3.3 Kerangka Operasional Penelitian.....	40
3.4 Hipotesis.....	43
3.5 Penelitian Terdahulu.....	43





3.6 Kebaruan Penelitian.....	45
3.7 Strategi Publikasi.....	45
4. METODE PENELITIAN.....	46
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	46
4.2 Desain Penelitian.....	46
4.3 Metode Penelitian.....	46
4.4 Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel.....	47
4.5 Prosedur Pelaksanaan Penelitian.....	48
4.5.1 Persiapan Alat dan Bahan.....	48
4.5.2 Ekstraksi <i>Spirulina</i>	48
4.5.3 Uji Fitokimia.....	49
4.5.4 Analisis Spektrofotometer UV-Vis (<i>Ultraviolet-Visible</i>).....	50
4.5.5 Analisis Spektrofotometer FTIR (<i>Fourier Transform Infra-Red</i>).....	51
4.5.6 Aklimatisasi Ikan Kerapu Cantang.....	51
4.5.7 Parameter Kualitas Air.....	52
4.5.8 Uji In-Vivo Ekstrak Kasar <i>Spirulina</i> sp Pada Ikan Kerapu Cantang.....	54
4.5.9 Uji In-Vivo <i>Viral Nervous Necrosis</i> Pada Ikan Kerapu Cantang.....	54
4.5.10 Prosedur Deteksi <i>Viral Nervous Necrosis</i> (VNN).....	54
4.5.11 Prosedur Deteksi β -aktin.....	58
4.5.12 Elektroforesis.....	60
4.5.13 Analisis Imunohistokimia (IHK).....	61
4.6 Analisa Data.....	63
4.7 Matrik Variabel dan Jadwal Rencana Penelitian.....	63
5. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	65
5.1 Hasil Ekstrak dan Skrining Fitokimia <i>Spirulina</i> sp.....	65
5.2 Hasil Spektrofotometer Uv-Vis (<i>Ultraviolet-Visible</i>).....	67
5.3 Hasil Spektrofotometer FTIR (<i>Fourier Transform Infra-Red</i>).....	69
5.4 Aklimatisasi dan Uji In-vivo Ikan Kerapu Cantang.....	71
5.5 Hasil Amplifikasi PCR β -aktin.....	74
5.6 Hasil Amplifikasi <i>nested</i> RT-PCR VNN.....	77
5.7 Respon Immunologi Hasil Uji In vivo.....	80
5.8 Ekspresi β -aktin Pada Organ Mata Ikan Kerapu Cantang.....	84
5.8.1 Perlakuan K.....	84
5.8.2 Perlakuan S1.....	85
5.8.3 Perlakuan S2.....	87
5.8.4 Perlakuan S3.....	88
5.8.5 Perlakuan V.....	89
5.8.6 Perlakuan SV1.....	90
5.8.7 Perlakuan SV2.....	92
5.8.8 Perlakuan SV3.....	93
5.9 Analisa Data.....	96
5.10 Analisis Kualitas Air Ikan Kerapu Cantang.....	97
6. PENUTUP.....	99
6.1 Kesimpulan.....	99
6.2 Saran.....	99
DAFTAR PUSTAKA.....	100
LAMPIRAN.....	116

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp) (Tumadang et al., 2016). 7

Gambar 2. Mekanisme umum respon imun pada ikan..... 10

Gambar 3. Proses masuknya antigen dan patogen ke dalam sel 14

Gambar 4. Pembentukan filamen aktin..... 15

Gambar 5. β -aktin merupakan komponen penting dari sitoskeleton..... 16

Gambar 6. Subfamili virus yang menginfeksi vertebrata..... 19

Gambar 7. Tanda klinis dan histologis serangan betanodavirus 20

Gambar 8. Siklus PCR..... 22

Gambar 9. Mekanisme antioksidan *Spirulina*..... 27

Gambar 10. *Spirulina* (*Arthrospira*)..... 29

Gambar 11. Grafik Pertumbuhan Mikroalga..... 32

Gambar 12. Kerangka konseptual penelitian 39

Gambar 13. Kerangka operasional penelitian tahap 1..... 40

Gambar 14. Kerangka operasional penelitian tahap 2 41

Gambar 15. Hasil Uji Fitokimia 65

Gambar 16. Hasil spektrofotometer uv-vis ekstrak *Spirulina* sp. 67

Gambar 17. Hasil spektrofotometer Fourier Transform Infra Red (FTIR)..... 69

Gambar 18. Ikan kerapu cantang 71

Gambar 19. Gambaran ikan normal dan terinfeksi VNN..... 73

Gambar 20. Hasil elektroforesis band β -aktin 150 bp..... 74

Gambar 21. Hasil semi kuantitatif band β -aktin..... 76

Gambar 22. Hasil elektroforesis band VNN 294 bp 78

Gambar 23. Hasil semi kuantitatif band VNN. 79

Gambar 24. Hasil rata-rata respon imunologis 82

Gambar 25. Hasil Immunoratio Organ Mata Ikan Kontro 84

Gambar 26. Grafik data persentase DAB perlakuan K..... 85

Gambar 27. Hasil ImmunoRatio ekspresi β -aktin ikan perlakuan S1..... 86

Gambar 28. Grafik data persentase DAB perlakuan S1 86

Gambar 29. Hasil ImmunoRatio ekspresi β -aktin ikan perlakuan S2..... 87

Gambar 30. Grafik data persentase DAB perlakuan S2 88

Gambar 31. Hasil ImmunoRatio ekspresi β -aktin ikan perlakuan S3..... 88

Gambar 32. Grafik data persentase DAB perlakuan S3 89

Gambar 33. Hasil ImmunoRatio organ mata ikan yang terinfeksi VNN..... 89

Gambar 34. Grafik data persentase DAB perlakuan V..... 90

Gambar 35. Hasil ImmunoRatio ekspresi β -aktin ikan perlakuan SV1..... 91

Gambar 36. Grafik data persentase DAB perlakuan SV1..... 92

Gambar 37. Hasil ImmunoRatio ekspresi β -aktin ikan perlakuan SV2 92

Gambar 38. Grafik data persentase DAB perlakuan SV2..... 93

Gambar 39. Hasil ImmunoRatio ekspresi β -aktin ikan SV3..... 94

Gambar 40. Grafik data persentase DAB perlakuan SV3..... 94

Gambar 41. Grafik perubahan ekspresi β -aktin..... 95

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Penelitian Terdahulu 43

Tabel 2. Desain Penelitian 46

Tabel 3. Susunan Bahan Amplifikasi Tahap I 56

Tabel 4. Kondisi Amplifikasi RT-PCR 57

Tabel 5. Susunan Bahan Amplifikasi Tahap II 57

Tabel 6. Kondisi Amplifikasi nested RT-PCR 58

Tabel 7. Amplifikasi PCR β -aktin 60

Tabel 8. Matrik variabel penelitian 63

Tabel 9. Jadwal Kegiatan 64

Tabel 10. Hasil Skrining Fitokimia Spirulina sp 65

Tabel 11. Panjang gelombang (nm) dan Absorbansi spektrofotometer uv-vis 68

Tabel 12. Hasil Uji Fourier Transform Infra Red (FTIR) Spirulina sp 69

Tabel 13. Pengamatan gejala klinis pada ikan 73

Tabel 14. Hasil rata-rata respon imunologis pada ikan kerapu cantang 81

Tabel 15. Hasil uji ANOVA DAB β -aktin 96

Tabel 16. Hasil pengukuran kualitas air ikan kerapu cantang 97



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian..... 116
Lampiran 2. Hasil respon imunologis ikan kerapu cantang..... 118
Lampiran 3. Hasil analisa data RAL faktorial. 119
Lampiran 4. Hasil pengukuran kualitas air ikan kerapu cantang..... 121
Lampiran 5. Dokumentasi hasil penelitian..... 122



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pengembangan budidaya laut merupakan usaha untuk meningkatkan produksi sekaligus langkah pelestarian kemampuan lingkungan yang serasi dan seimbang dalam rangka mengimbangi pemanfaatan dengan cara penangkapan (Affan, 2012). Ikan dari subfamili Epinephalinae (kerapu) memiliki nilai ekonomi yang cukup besar di daerah tropis dan subtropis. Secara khusus, ikan hidup sangat berharga di Asia Tenggara (Sadovy *et al.*, 2008). Tingginya harga ini menyebabkan eksploitasi secara berlebihan, dan membuat para pelaku usaha melakukan peningkatan budidaya (Rimmer *et al.*, 2004).

Peningkatan upaya budidaya bukan berarti tanpa ada masalah, bahkan dalam perkembangannya ditemukan banyak masalah-masalah baru. Salah satu masalah yang dihadapi oleh para pembudidaya yaitu terdapatnya penyakit yang bisa menyerang ikan maupun udang, bahkan penyakit ini bisa menyebabkan kematian massal. Penyakit dalam budidaya perairan diklasifikasikan menjadi dua kelompok, yaitu penyakit infeksi dan penyakit non infeksi. Penyakit yang disebabkan oleh organisme patogen seperti parasit, jamur, bakteri dan virus dikategorikan sebagai penyakit infeksi. Sedangkan penyakit yang disebabkan oleh gangguan non patogen seperti nutrisi, kualitas air dan racun dikategorikan sebagai penyakit non infeksi (Murdjani, 2003).

Kendala pada kelompok Epinephelus (Kerapu) yang dibudidayakan di Indonesia adalah terbatasnya benih akibat infeksi virus yang menyebabkan kematian hingga 80%, bahkan bisa mencapai 100% (Yanuhar *et al.*, 2012). Kematian benih tersebut disebabkan karena serangan atau infeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN). Infeksi VNN pada ikan kerapu biasanya terjadi pada otak dan mata, karena organ tersebut merupakan tempat sistem syaraf pusat pada ikan,

infeksi VNN juga menyebabkan ensefalopati dan retinopati yang memiliki jangkauan inang yang luas (Yuasa *et al.*, 2000), sehingga salah satu kerusakan yang terjadi akibat serangan VNN adalah terjadinya vakuolasi (Grotmol *et al.*, 1997 a,b). Selain infeksi pada ikan kerapu, VNN juga dilaporkan menyerang beberapa spesies ikan lain, diantaranya ikan nuri Jepang (*Oplegnathus fasciatus*) (Maeno *et al.*, 2007), ikan kerapu merah (*Epinephelus akaara*) (Yanuhar, 2009), barramundi (*Lates calcarifer*) (Toda *et al.*, 2011) dan data terakhir serangan VNN pada *giant groupers* (*Epinephelus lanceolatus*) di Asia (Cheng *et al.*, 2016).

Penggunaan obat-obatan untuk pencegahan atau pemberantasan penyakit saat ini tidak direkomendasikan bahkan tidak diperbolehkan karena menyebabkan residu dan dapat menyebabkan resisten, dengan demikian dalam pencegahan maupun pemberantasan penyakit perlu pemanfaatan bahan-bahan alami agar aman dalam penggunaannya. Pemanfaatan mikroalga sudah banyak dikembangkan, terutama dalam bidang kesehatan yang nantinya digunakan sebagai antiviral. Hal tersebut dikarenakan pemanfaatan bahan alami seperti mikroalga aman untuk digunakan dan tidak menyebabkan residu, bahkan penggunaan ekstrak dari mikroalga juga dapat meningkatkan kesehatan ikan. Beberapa penelitian menjelaskan bahwa ekstrak metanol mikroalga telah menunjukkan aktivitas antiviral (Kok *et al.*, 2011). Fraksi polisakarida dari mikroalga juga berpotensi untuk menghambat produksi retrovirus (Talyshinsky *et al.*, 2002). Penelitian Yanuhar (2015), tentang fragmen pigmen protein dari mikroalga *N. oculata* juga bisa dimanfaatkan sebagai anti-inflamasi pada saat virus ssRNA menyerang ikan kerapu.

Spirulina sp merupakan salah satu jenis mikroalga laut yang dapat dimanfaatkan untuk kesehatan. Pemanfaatan *Spirulina* sp tidak hanya mampu mendukung pertumbuhan ikan, tetapi juga dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh pada ikan karena mengandung protein, vitamin, dan mineral yang tinggi,

serta senyawa aktif biologis seperti pigmen, diantaranya *chlorophyll a* dan β -*carotene* (Bhat & Madyastha, 2000), yang dapat dimanfaatkan sebagai antiviral, antioksidan, dan antimikroba. Kandungan karotenoid yang terdapat pada mikroalga juga memiliki fungsi biologis yakni dapat digunakan sebagai prekursor vitamin A, dan dapat memodulasi sistem kekebalan tubuh (Kim *et al.*, 2008).

Sitoskeleton sangat berperan penting dalam menghadapi serangan virus atau penyakit. Pada dasarnya sitoskeleton terdiri dari tiga komponenen yaitu mikrotubul, aktin filamen, dan intermediet filamen. Aktin sendiri merupakan protein, dan paling banyak ditemukan pada sel eukariotik serta memiliki peran penting dalam interaksi protein. Secara umum aktin sitoskeleton yang terdapat pada organisme ada tiga macam yaitu α -aktin, γ -aktin, dan β -aktin (Artman *et al.*, 2014).

β -aktin merupakan salah satu protein yang berperan penting dalam pengaturan mekanisme sistem kekebalan tubuh (Jönsson *et al.*, 2012). β -aktin juga dapat dikatakan sebagai *housekeeping gen*, dimana gen atau protein ini dibutuhkan sebagai dasar dalam pemeliharaan seluler (Lin dan Redies, 2012), terhadap infeksi virus, dimana β -aktin ini bertindak sebagai fasilitator.

β -aktin mempunyai peranan penting yakni sebagai kunci dalam mempertahankan struktur sitoskeletal, sitokinesis, endositosis, motilitas sel, dan adhesi sel (Ayscough, 2004). β -aktin juga termasuk salah satu gen yang dapat mentranskripsi kode, yang mana digunakan sebagai dasar induksi untuk ekspresi gen (Linzer dan Nathans, 1983). Karena β -aktin memiliki tingkat ekspresi lebih stabil dibandingkan kontrol internal lainnya, maka β -aktin merupakan salah satu referensi gen paling baik digunakan sebagai ekspresi gen untuk meningkatkan respon imun yang nantinya akan menghambat proses transkripsi virus (VNN) di dalam sel. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk memanfaatkan ekstrak kasar *Spirulina* sp sebagai inducer (senyawa yang dapat mengaktifkan gen

spesifik) β -aktin sebagai anti inflamasi pada sistem kekebalan tubuh ikan kerapu cantang terhadap *viral nervous necrosis*.

1.2 Rumusan Masalah

Viral nervous necrosis merupakan jenis virus ssRNA positif yang dapat menginfeksi ikan pada masa juvenil dan dapat menyebabkan kematian masal.

Ekstrak *Spirulina* sp memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi, selain itu juga memiliki sifat proteksi terhadap virus. β -aktin merupakan salah satu protein yang memiliki fungsi penting dalam pengaturan sistem imun pada ikan. Oleh karena itu rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu :

1. Apakah ekstrak kasar *Spirulina* sp mengandung senyawa bioaktif?
2. Bagaimana manfaat ekstrak kasar *Spirulina* sp terhadap ekspresi β -aktin sebagai inducer penanda respon anti inflamasi pada ikan kerapu cantang yang diinfeksi VNN?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk :

1. Menganalisis kandungan senyawa bioaktif yang terdapat pada ekstrak kasar pada mikroalga *Spirulina* sp.
2. Menganalisis manfaat ekstrak kasar *Spirulina* sp sebagai inducer β -aktin untuk anti inflamasi pada ikan kerapu cantang yang diinfeksi VNN.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Manfaat teoritis dari penelitian ini yaitu untuk menjelaskan mekanisme ekstrak kasar *Spirulina* sp sebagai bahan dasar inducer untuk respon anti inflamasi dalam peningkatan sistem imun melalui ekspresi β -aktin pada ikan kerapu cantang.

1.4.2 Manfaat Praktis

Manfaat praktis dari penelitian ini yaitu sebagai dasar tahap penelitian lanjutan dalam menjelaskan manfaat ekstrak kasar *Spirulina* sp sebagai produk material biologis untuk anti-inflamasi dari VNN.

1.5 Waktu dan Tempat

Penelitian akan dilaksanakan di Laboratrium Hidrobiologi (Divisi Lingkungan dan Bioteknologi Perairan), Laboratorium Ilmu Teknologi Hasil Perairan (Divisi Perencanaan Hasil Perikanan) Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Kimia Organik Fakultas Science and Technology Universitas Islam Negeri Malik Ibrahim Malang, Laboratorium Materia Medica Batu, dan Hatchery UD. Giso Bangkit Situbondo pada bulan Maret sampai bulan Juli 2018.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Kerapu Cantang

Ikan kerapu termasuk dalam subfamilia Epinephelinae, familia Serranidae, dan merupakan ikan penting secara komersial (komoditas ekspor), terutama untuk pasar ikan di Asia seperti Taiwan, Cina, Singapura, Hong Kong dan Malaysia (Johnston dan Yeeting 2006). Di pasaran terdapat 3 jenis ikan kerapu yang paling umum ditemui, yakni genus *Epinephelus*, *Cromileptes* dan *Plectropomus*. Selain itu tingginya harga jual ikan kerapu ini membuat para pelaku usaha untuk membudidayakannya (Rimmer *et al.*, 2004).

Ikan kerapu tersebar luas di seluruh wilayah Indo-Pasifik, dari selatan Jepang ke Palau, Guam, Kaledonia Baru, selatan Queensland, Australia, dan Samudera Hindia timur, dari Kepulauan Andaman dan Nikobar ke Broome, Australia Barat. Di Indonesia, ikan kerapu dapat ditemukan di daerah pesisir dan perairan laut di seluruh nusantara. Kerapu termasuk jenis ikan karnivora yang memangsa ikan kecil dan udang-udangan (krustasea). Ikan kerapu bersifat hermafrodit protogini yaitu lahir sebagai betina dan kemudian berubah menjadi jantan saat mereka tumbuh dewasa.

Kerapu cantang merupakan ikan dengan nilai jual yang tinggi dan merupakan ikan komoditas ekspor. Kerapu cantang adalah kerapu hasil persilangan antara kerapu macan dan kerapu kertang (Prayogo dan Arifin, 2015).

Selanjutnya (DJPB-KKP, 2018) menjelaskan bahwa klasifikasi ikan kerapu cantang yaitu :

Phylum : Chordata

Class : Actinopterygii

Sub class : Neopterygii

Series : Teleostei

Super ordo : Acanthopterygii

Ordo : Perciformes
Sub ordo : Percoidei
Family : Serranidae
Genus : *Epinephelus*
Species : *Epinephelus* sp

Ikan kerapu cantang yang memiliki nama latin *Epinephelus* sp merupakan ikan hasil persilangan antara ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dengan ikan kerapu kertang (*Epinephelus lanceolatus*). Perkawasaan antara ikan kerapu macan betina dengan ikan kerapu kertang jantan menghasilkan suatu varietas baru yang secara morfologis mirip dengan kedua spesies induknya (BBAP Situbondo, 2012). Secara spesifik morfologi ikan kerapu dapat dilihat pada

Gambar 1.



Gambar 1. Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp) (Tumadang et al., 2016).

Kualitas air adalah salah satu faktor penunjang untuk mencapai keberhasilan dalam suatu usaha, terutama usaha budidaya ikan kerapu cantang.

Air yang digunakan untuk pembesaran ikan kerapu cantang harus berada dalam kondisi kualitas yang optimal. Kualitas air ini dapat dipertahankan dengan mengganti air pada media pemeliharaan. Pergantian air tidak disarankan secara total, karena hal ini bisa membuat ikan menjadi stress. Pergantian air yang dilakukan secara total dapat mengakibatkan perubahan suhu yang ekstrem (Supriyadi dan Lentera, 2004).

Kualitas sumber air laut tentu harus jernih dan bersih secara visual, namun kejernihan suatu perairan belum bisa memberikan jaminan untuk kualitas air yang cocok pada media pemeliharaan. Oksigen terlarut (DO), derajat keasaman (pH), salinitas, dan suhu merupakan kualitas air yang harus dijaga pada media pemeliharaan ikan kerapu.

a. Oksigen Terlarut (DO)

Konsentrasi dan ketersediaan oksigen terlarut di dalam suatu perairan sangat dibutuhkan oleh ikan dan organisme lainnya untuk hidup.

Konsentrasi oksigen dalam perairan dapat mempengaruhi pertumbuhan dan konversi pakan, selain itu juga dapat menurunkan daya dukung lingkungan perairan. Nilai oksigen terlarut suatu perairan yang baik untuk budidaya ikan kerapu yaitu tidak boleh kurang dari 4,0 mg/l (Kordi, 2002).

b. Derajat Keasaman (pH)

pH dapat digunakan sebagai tolak ukur untuk menentukan kondisi suatu perairan. Ketika pH netral sampai sedikit basa hal ini sangat ideal bagi kehidupan terutama pada ikan air laut. Suatu perairan yang kondisi pHnya rendah bisa mengakibatkan penurunan pertumbuhan atau pergerakan ikan menjadi lemah. Selain itu ikan juga lebih mudah terinfeksi penyakit serta diikuti dengan tingginya tingkat kematian (Akbar dan Sudaryanto 2001).

Kordi (2002) juga menyatakan bahwa pH yang baik untuk budidaya ikan kerapu berkisar antara 7,6-8,0 yang merupakan kisaran pH umum pada perairan laut.

c. Salinitas

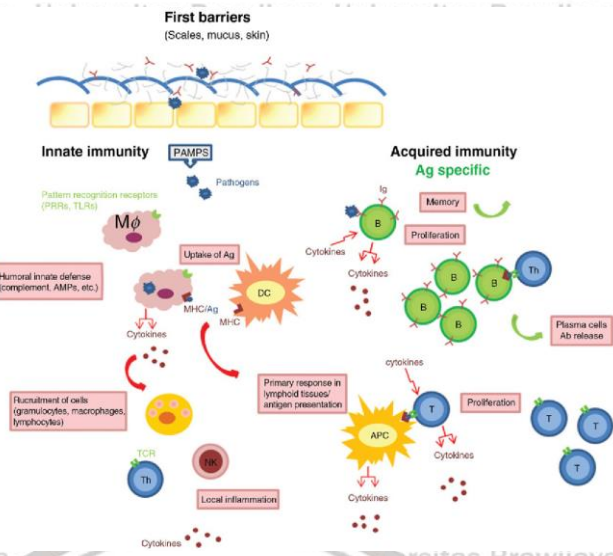
Salinitas adalah faktor yang penting bagi kehidupan metabolisme ikan. Apabila salinitas tidak sesuai dengan kehidupan ikan kerapu, maka secara fisiologis fungsi organ osmoregulasi ikan juga akan terganggu. Pada ikan dewasa yang matang gonad dan memijah, maka ikan tersebut

mempunyai salinitas sekitar 30-35 ppt (Sudjiharno, 2004). Selain itu Akbar dan Sudaryanto (2001), juga menyatakan bahwa salinitas yang cocok untuk budidaya ikan kerapu adalah 30-35 ppt.

d. Suhu
Suhu merupakan parameter utama kualitas air yang nantinya juga akan berpengaruh pada pertumbuhan ikan. Suhu optimal untuk pertumbuhan ikan kerapu berkisar antara 27-32 °C (Kordi, 2002).

2.2 Mekanisme Sistem Imun Pada Ikan

Secara umum ikan memiliki sistem kekebalan pada tubuhnya. Sistem kekebalan pada ikan dibagi menjadi dua, diantaranya respon imun bawaan (*innate* atau non-spesifik) dan respon imun adaptif (yang didapat atau spesifik) (Secombes dan Wang, 2012; Castro dan Tafalla, 2015). Imunitas bawaan merupakan garis pertahanan pertama kali untuk melawan infeksi dan mencakup hambatan fisik, respon humoral, serta respon seluler. Disamping itu respon imun adaptif juga ikut berperan penting diantaranya respon humoral dan seluler, yang ditandai dengan pengenalan antigen spesifik terlebih dahulu kemudian mendorong respon imun patogen sekunder yang lebih kuat dan lebih cepat untuk melawan patogen (Castro dan Tafalla, 2015). Mekanisme umum tentang respon imun pada ikan dapat dilihat pada **Gambar 2**.



Gambar 2. Mekanisme umum respon imun pada ikan. Organisme patogen masuk melalui jaringan mukosa (insang, kulit, atau usus) dan patogen akan diblokir atau dibatasi oleh hambatan fisik melalui lendir, sisik, dan epitel. Ketika patogen berhasil menembus epitel, maka patogen akan dihambat oleh respon seluler bawaan (innate). Di sisi lain presentasi antigenik oleh MHC akan mengaktifkan respon imun spesifik (adaptif) (Castro dan Tafalla, 2015).

Vertebrata hidup pada lingkungan yang di dalamnya terkandung berbagai macam agen seperti agen infeksi virus, jamur, bakteri, protozoa serta parasit multiselular yang nantinya dapat menyebabkan penyakit. Oleh karena itu vertebrata telah mengembangkan respon imun yang efektif yang pada awalnya akan mengenali patogen atau molekul asing seperti antigen, selanjutnya memicu jalur, kemudian menghasilkan mekanisme efektor untuk mencoba menghilangkannya (Secombes dan Wang, 2012).

Respon kekebalan telah dimediasi oleh berbagai sel dan mediator larut yang disekresikan. Leukosit sangat penting untuk respon imun, dan termasuk limfosit (sel T, sel B, limfosit granular), fagosit (fagosit mononuklear, neutrofil dan eosinofil) dan sel bantu (basofil, sel mast, trombosit). Sel-sel lain dalam jaringan juga berpartisipasi dalam respon imun dengan memberi isyarat pada leukosit dan menanggapi mediator yang larut (sitokin) yang dilepaskan oleh leukosit seperti sel T dan makrofag. Semua sel yang terlibat dalam respon imun diatur ke dalam

jaringan dan organ supaya dapat menjalankan fungsinya secara efektif (Secombes dan Wang, 2012).

2.2.1 Respon imun bawaan (*innate* atau non-spesifik)

Respon imun bawaan pada ikan merupakan komponen penting untuk menghadapi patogen karena sistem kekebalan adaptif yang terbatas dan sifat proliferasi yang lambat (Whyte, 2007). Sistem kekebalan non-spesifik ini pada umumnya terbagi menjadi tiga bagian, pertama yaitu sebagai penghalang (epitel atau mukosa), kedua parameter humoral dan ketiga komponen seluler. Epitel atau mukosa kulit, insang dan saluran pencernaan lainnya berfungsi sebagai penghalang penyakit yang sangat penting terutama pada ikan (Magnadottir, 2010). Serangkaian mekanisme yang berperan dalam respon ini meliputi faktor humoral, sel dan jaringan, peptida antimikroba dan faktor pelengkap.

Uribe *et al.*, (2011) menjelaskan bahwa respon imun bawaan atau *innate* terbagi menjadi beberapa kelompok. Pertama hambatan fisik, meliputi lendir pada kulit serta insang yang merupakan faktor penghambat pertama dan bertindak sebagai penghalang saat terjadi infeksi (Ellis, 2001). Lektin, lisozim, pentraxin, peptida antibakteri, protein komplemen, dan imunoglobulin M (IgM) merupakan kandungan yang terdapat pada lendir ikan dan berperan penting untuk menghambat infeksi patogen (Boshra *et al.*, 2006; Saurabh dan Sahoo, 2008). Epidermis juga mempunyai peranan untuk sistem pertahanan dan bereaksi terhadap berbagai macam serangan seperti penebalan dan hiperplasia seluler, selain itu epidermis juga sebagai penghambat masuknya agen asing dan sebagai keseimbangan osmotik. Di sisi lain sel limfosit, makrofag, dan sel granular eosinofilik juga berperan untuk pertahanan (Ellis, 2001; Fischer *et al.*, 2006).

Kedua adalah peptida antimikrobia yang berperan penting untuk sistem pertahanan, terutama untuk pertahanan inang melawan virus dan bakteri (Maier *et al.*, 2008). Kandungan peptida juga banyak ditemukan pada ikan, terutama di jaringan lendir, insang dan hati (Birkemo *et al.*, 2003). Walaupun berat molekul dari polipeptida ini rendah, namun polipeptida ini mempunyai kemampuan untuk memecah dinding bakteri (Ellis, 2001). Selanjutnya yang ketiga adalah fagositosis yang merupakan salah satu proses penting pada sistem pertahanan. Neutrofil dan makrofag merupakan sel utama yang terlibat dalam fagositosis pada ikan. Neutrofil memiliki myeloperoksidase dalam butiran sitoplasma mereka. Kemudian dengan adanya halida dan hidrogen peroksida ini dapat digunakan untuk membunuh bakteri, proses ini dengan cara halogenasi dinding sel bakteri (Fischer *et al.*, 2006).

Selain itu Secombes dan Fletcher, (1992) juga menyatakan bahwa makrofag dapat menghasilkan oksida nitrat pada mamalia dan berfungsi sebagai zat antibakteri.

Selain itu ada juga yang namanya tumor necrosis factor (TNF) yang berperan sebagai aktivator makrofag pada ikan. Kemudian tahap selanjutnya interferon (INF) yang merupakan sitokin dan berfungsi sebagai antiviral nonspesifik. INF ini dapat menghambat replikasi asam nukleat dalam sel yang terinfeksi. INF berperan penting untuk sistem pertahanan terhadap invasi virus pada sel inang vertebrata (Robertsen, 2006). Sifat dari INF ini yaitu untuk melindungi sel lain terutama dari serangan patogen atau virus dengan cara mengikat reseptor yang berbeda dan menghasilkan induksi beberapa ratus gen yang dirangsang oleh INF (ISG). Interleukin (IL) juga berperan penting dalam peradangan dan pertahanan inang (Dinarello, 1997). Kemudian yang terakhir ada antibodi alami yang berperan dalam perlindungan terhadap patogen seperti bakteri dan virus, faktor ini menjadi kunci dari kekebalan nonspesifik. Selain itu antibodi alami akan terkait dengan kekebalan adaptif. Antibodi alami IgM tipe tertentu yang

dihasilkan oleh ikan mampu berfungsi untuk melawan berbagai antigen. Namun respon ini bervariasi, yaitu tergantung pada jenis spesies dan kondisi lingkungannya (Whyte, 2007).

2.2.2 Respon imun adaptif (Spesifik)

Respon imun adaptif dalam sel melibatkan jaringan yang kompleks diantaranya gen, protein, sel dan pesan biokimia khusus yang diperlukan oleh tubuh serta secara spesifik akan merespon antigen, antibodi, dan sel efektor dengan spesifisitas dan afinitas yang tinggi. Uribe *et al.*, (2011) menjelaskan bahwa respon imun adaptif juga terbagi dalam beberapa kelompok. Pertama antibodi, pada ikan teleost imunoglobulin yang dominan yaitu tetramer kelas IgM dan imunoglobulin ini mengandung delapan situs penggabungan antigenik. Beberapa teleost juga memiliki monomer IgM dalam serumnya. Selain itu pada ikan juga terdapat IgD yang merupakan isotipe imunoglobulin kedua, sebagai contoh yang teridentifikasi pada ikan lele (Wilson *et al.*, 1997).

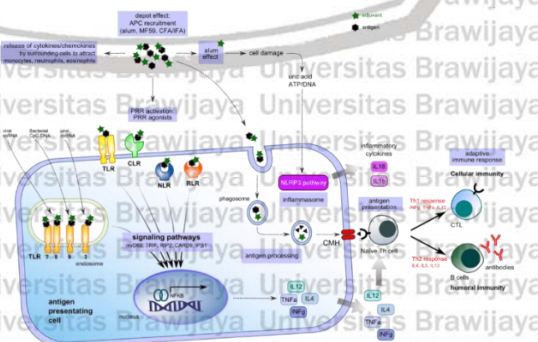
Kemudian yang kedua adalah sitotoksitas seluler, pada beberapa spesies ikan, leukosit dapat menghasilkan reaksi sitotoksitas seluler. Selain itu dengan menggunakan MHC kelas I, limfosit akan mengenali serta membunuh sel yang diturunkan dari virus dengan peptida (Uribe *et al.*, 2011). Namun karena keterbatasan alat pengenalan seluler dan molekuler, sel-sel yang bertanggung jawab untuk toksisitas sulit dikarakterisasi (Fisher *et al.*, 2006). Sedangkan yang ketiga adalah sitokin yang termasuk dalam imunitas adaptif, kemudian sitokin ini akan mendorong aktivasi dan diferensiasi subset sel T pembantu untuk melepaskan repertoar sitokin yang berbeda (Secombes, 2008). Selanjutnya IFN tipe I dan tipe II berpotensi untuk mendorong diferensiasi sel Th1. Adanya IL-10 (Zou *et al.*, 2003; Pinto *et al.*, 2006) dan TGF- β (Hardie *et al.*, 1998) pada ikan akan membentuk sel efektor regulator T yang potensial.

2.3 Pengenalan Reseptor Terhadap Antigen

Pada sistem imun terdapat beberapa sel reseptor yang mampu mengenali antigen, diantara sekian banyak sel reseptor yang termasuk reseptor paling baik ada tiga, diantaranya antigen presenting sel (APC): makrofag, sel dendritic (DCs), dan sel B (Trombetta dan Mellman, 2005). APC mempunyai kemampuan khusus untuk menyerap, memproses, dan mempresentasikan antigen ke sel T naif.

Selanjutnya *Major Histocompatibility Complex II* (MHC II) berperan untuk mempresentasikan antigen terhadap reseptor sel T pada sel CD4⁺ T. Setelah aktivasi, APC juga mengekspresikan molekul co-stimulatory yang diperlukan untuk pemeriksaan sel T naif dan mensekresikan sitokin yang menghasilkan diferensiasi sel T langsung.

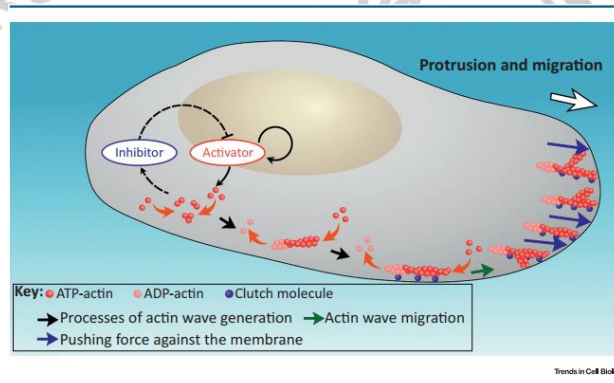
Makrofag mampu dalam menyerap antigen dan memproduksi sitokin inflamasi setelah terstimulasi oleh antigen, serta berperan dalam pembersihan sel apoptosis. Sel B secara progresif dan fungsional berbeda dari APC myeloid. Sel B menginternalisasi antigen spesifik melalui reseptor sel B (BCR)-mediated endocytosis Yuseff *et al.*, (2013). Signaling melalui BCR menginduksi perubahan yang memfasilitasi presentasi antigen, proliferasi dan pematangan afinitas antibodi yang disekresikan, yang menghasilkan sel B sangat spesifik yang dapat bertahan sebagai sel B memori (Lewis *et al.*, 2014).



Gambar 3. Proses masuknya antigen dan patogen ke dalam sel dan proses jalur signaling untuk pengaktifan sistem imun oleh reseptor pengenalan (PRRs dan TLRs) serta mekanisme penghilangan patogen (aktivasi sel T dan sel B) dengan pembentukan antibodi spesifik (Ozbiosciences, 2018).

2.4 Peranan Aktin dalam Sistem Imun

Aktin termasuk dalam kategori protein dan sangat berperan penting dalam sel karena aktin merupakan komponen kunci untuk pergerakan sel (Pepper, 1997; Carlier dan Pantaloni, 1997). Aktin adalah protein intraseluler yang jumlahnya paling banyak ditemukan terutama pada sel eukariotik. Molekul aktin sendiri merupakan subunit monomer. Apabila aktin dipolimerasi dapat membentuk dua jenis filamen di dalam sel, pertama mikro filamen yang merupakan salah satu dari tiga komponen utama sitoskeleton (sedangkan dua komponen lainnya merupakan filamen intermediate dan mikrotubulus), dan yang kedua adalah filamen tipis (Artman *et al.*, 2014).

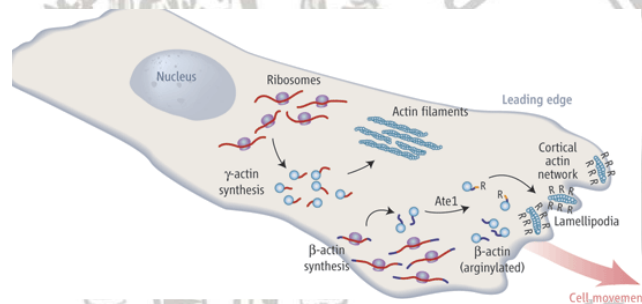


Gambar 4. Pembentukan filamen aktin melalui jaringan aktivator dan inhibitor, dan terjadinya polimerisasi di dalam sel (susunan merah). Susunan aktin menghasilkan kekuatan untuk migrasi sel (Inagaki dan Katsuno, 2017).

Aktin termasuk komponen penting dari sitoskeleton. Beberapa peranan aktin dalam proses seluler yaitu sebagai migrasi sel, regulasi ekspresi gen, dan pembelahan sel. Fungsi tersebut terkait dengan kemampuannya dalam pembentukan filamen yang cepat dan dapat menyusun serta memisahkan sel. Pada vertebrata terdapat enam bentuk aktin (Rubenstein, 1990). Empat dari bentuk tersebut terdapat pada sel otot lurik yaitu α_{sk} dan α_{ca} serta pada sel otot halus α_{sm} dan γ_{sm} . Sedangkan bentuk β -actin dan γ -actin terdapat di sitoplasma (Bunnell *et al.*, 2011).

2.4.1 β -aktin

β -aktin merupakan senyawa kompleks dari dua molekul yang berbeda, yang memperluas antara molekul satu dengan molekul yang lain pada profilin (komponen membran yang dapat merangsang ekspresi gen) (Chik *et al.*, 1996). β -aktin berperan sebagai kunci dalam mempertahankan struktur sitoskeletal, sitokinesis, endositosis, motilitas sel, dan adhesi sel (Ayscough, 2004; Engqvist dan Drubin, 2003; Suetsugu dan Takenawa, 2003). β -aktin juga termasuk salah satu gen yang dapat mentranskripsi kode, yang mana digunakan sebagai dasar induksi untuk ekspresi gen (Linzer dan Nathans, 1983). Selain itu Sturzenbaum dan Kille (2001), juga menjelaskan bahwa β -aktin sering digunakan sebagai pengendalian internal untuk menormalkan ekspresi gen.



Gambar 5. β -aktin merupakan komponen penting dari sitoskeleton. Letak β -aktin terdapat dibawah membran sel, dan peranan β -aktin di dalam sel yakni untuk migrasi sel, regulasi ekspresi gen, dan pembelahan sel (Pallazo, 2006).

β -aktin memiliki tingkat ekspresi lebih stabil dibandingkan kontrol internal lainnya, oleh karena itu β -aktin merupakan salah satu gen referensi yang paling baik untuk digunakan dan dapat menghilangkan perbedaan eksperimental yang disebabkan oleh parameter atau variabel seperti jaringan, individu, dan rangsangan biokimia (Ruan dan Lai, 2007 ; Suzuki *et al.*, 2000 ; Thellin *et al.*, 1999). Disisi lain promoter β -aktin ini telah menunjukkan sebagai promotor konstitutif dengan aktivitas transkripsi yang kuat (Frederickson *et al.*, 1989 dan Guning *et al.*, 1987).

2.4.2 Peran β -aktin dalam Pemberian Sinyal

Sel T memiliki peran sentral dalam sistem kekebalan adaptif, serta pengaktifan sel T juga melibatkan banyak proses pensinyalan. Terdapat tiga tahap selama proses aktivasi, yakni reseptor sel T (TCR) memicu untuk peristensi sinyal dan penghentian sinyal. Pergerakan sel T terus menerus memindai permukaan *antigen presenting cell* (APC) untuk mencari peptida antigen yang terikat pada protein *major histocompatibility complex* (pMHCs). Ketika peptida tersebut sudah diketahui, ligasi molekul integrin memfasilitasi untuk kontak sel-sel awal yang dekat, kemudian keterlibatan antara TCR dan pMHC memicu sinyal TCR awal untuk melintasi membran plasma. Pada saat yang sama membran sel T menonjol di atas permukaan APC yang mengarah ke pembentukan persimpangan membran khusus yakni sinapsis imunologis (Yu *et al.*, 2013).

Semua proses pensinyalan harus terkoordinasi untuk mencapai aktivasi sel T, dan proses pemberian sinyal ini bergantung pada sitoskeleton aktin. Sitoskeleton aktin merupakan filamen jaringan yang berfungsi untuk memberi kekuatan mekanis dalam polarisasi sel dan motilitas sel untuk merencanakan protein dalam mengikat dan merakit serta untuk mengangkut molekul. Aktin mendorong proses polarisasi sel dan mempertahankan kontak sel sebagai langkah pertama untuk aktivasi sel T. Hal ini juga memungkinkan perancah untuk pengelompokan, translokasi, dan pemisahan protein sebagai langkah kunci untuk mempertahankan dan memperkuat sinyal sel T (Beemiller dan Krummel, 2010).

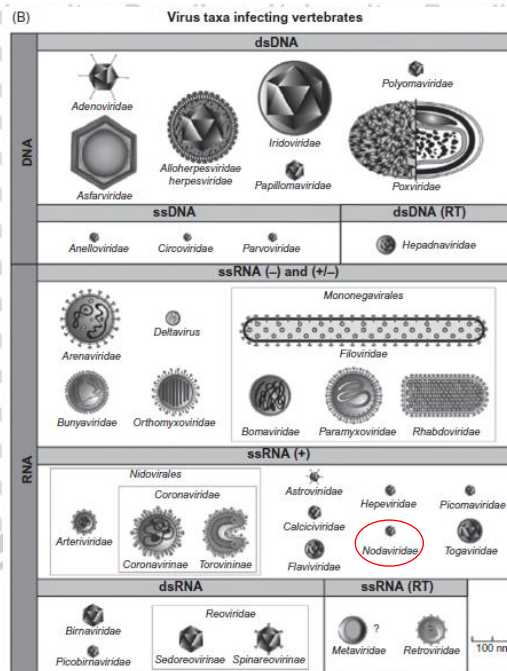
Aktin juga berperan untuk memberikan kekuatan mekanik yang mungkin diperlukan untuk pemacu TCR. Pemacu TCR merupakan proses dimana ligasi TCR-pMHC menyebabkan sinyal intraselular. TCR kompleks terdiri dari heterodimer TCR ($\text{TCR}\alpha\beta$) yang bertanggung jawab untuk pengenalan ligan dan beberapa molekul CD3 (van der Merwe dan Dushek, 2011).

2.5 Virus

Virus adalah suatu nukleoprotein yang dapat memperbanyak diri hanya dalam sel yang hidup dan memiliki kemampuan untuk menyebabkan penyakit.

Virus berukuran sangat kecil dengan diameter yang bervariasi antara 20 – 300 nm dan membutuhkan bantuan mikroskop elektron untuk mengamatinya (Agrios, 2005). Virus tersusun atas asam nukleat dan protein (kapsid), protein tersebut berfungsi sebagai pelindung. Virus memiliki berbagai macam bentuk, tetapi pada umumnya berbentuk batang, polihedral, atau variannya terdiri dari dua struktur dasar. Beberapa virus hanya tersusun atas RNA atau DNA saja. Molekul RNA dan DNA tersebut ada yang berupa untai tunggal (*single-stranded*) dan ada yang berupa molekul untai ganda (*double-stranded*) (Yuwono, 2005).

Virus menempati posisi unik dalam sistem biologi, virus memiliki dua fase yang jelas dalam siklus hidupnya. Partikel virus di luar sel inang secara metabolik inert (tidak aktif secara fungsional). Di dalam sel inangnya, virus secara metabolik aktif (berfungsi aktif), ini adalah fase replikatif dari virus, dimana genom virus mengeksploitasi mesin sel inang untuk menghasilkan salinan genom progeni, RNA pembawa virus dan protein virus yang berkumpul untuk membentuk partikel virus baru. Jenis-jenis virus yang menginfeksi pada ikan dapat dilihat pada **Gambar 6**.



Gambar 6. Subfamili virus yang menginfeksi vertebrata (termasuk ikan), Nodaviridae (bulatan merah) (King *et al.*, 2012).

2.5.1 Viral Nervous Necrosis (VNN)

Pada era modern ini akuakultur telah menjadi industri penghasil produk makanan tercepat di dunia. Karena permintaan pasar yang tinggi dan ikan juga memiliki nilai ekonomis yang tinggi. Kegiatan akuakultur telah meningkat secara pesat dalam beberapa tahun terakhir. Nodavirus ikan telah muncul sebagai patogen utama dengan dampak yang tinggi terutama pada industri akuakultur.

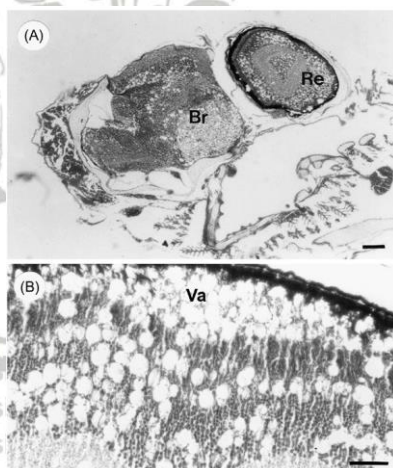
Penyakit yang disebabkan oleh nodavirus ikan ini disebut *viral nervous necrosis* (VNN) dan dikenal juga sebagai virus ensefalopati dan retinopati (VER) (Chi *et al.*, 2016)

Viral Nervous Necrosis merupakan salah satu virus ssRNA (nodaviridae) yang menginfeksi ikan terutama dalam masa juvenil. VNN ini menyerang organ saraf dan mata sehingga menyebabkan keseimbangan ikan terganggu dan menyebabkan kematian. VNN pertama kali menyerang ikan kakaktua (*Oplegnathus fasciatus*) yang dibesarkan di Jepang (Yoshikoshi dan Inoue, 1990) dan larva ikan barramundi (*Lates calcarifer*) di Australia (Glazebrook *et al.*, 1990).

Kematian yang disebabkan oleh VNN sangat tinggi terutama pada tahap larva dan remaja. Kematiannya bisa mencapai 80-100% dan kemungkinan kecil VNN menyerang pada ikan dewasa, bahkan tidak terlalu banyak. Beberapa spesies ikan segar juga rentan terhadap infeksi nodavirus ini, diantaranya ikan guppy (Hegde *et al.*, 2003), ikan patin (Chi *et al.*, 2003), zebrafish (Lu *et al.*, 2008) dan medaka (Furusawa *et al.*, 2006).

2.5.2 Tanda Klinis dan Histopatologi Ikan yang Terkena VNN

Ikan yang terkena VNN mempunyai gejala klinis atau tanda-tanda diantaranya perilaku berenang yang tidak normal (misalnya, berenang berputar-putar dan secara mendadak), warna kulit berubah menjadi gelap, kehilangan nafsu makan dan kandung kemih biasanya membesar. Karakteristik histopatologis VNN adalah vakuolasi pada sistem saraf pusat, terutama otak dan retina (Grotmol *et al.*, 1997a, b) (**Gambar 7**). Selain itu, vakuola juga besar karena degenerasi organel selalu ada di sel yang terinfeksi berat (Chi *et al.*, 1997).



Gambar 7. Tanda klinis dan histologis pada gambar (A) otak dan (B) retina pada larva kerapu dengan infeksi betanodavirus. Keterangan : vakuolasi (Va) otak (Br) dan retina (Rt) (Grotmol *et al.*, 1997a,b).

Serangan VNN tidak hanya terbatas pada otak dan retina, tetapi juga terdapat di hati dan usus larva kerapu selama infeksi akut, yang menunjukkan bahwa nodavirus ikan dapat menyebar ke banyak jaringan dalam larva yang

terkena dampak parah melalui viremia. Namun, vakuolasi hanya terdapat pada otak, retina dan sumsum tulang belakang yang menunjukkan bahwa jaringan saraf pusat adalah target untuk progamiasi nodavirus pada ikan, dan perilaku berenang abnormal terkait dengan sistem saraf pusat yang rusak (Chi *et al.*, 2001).

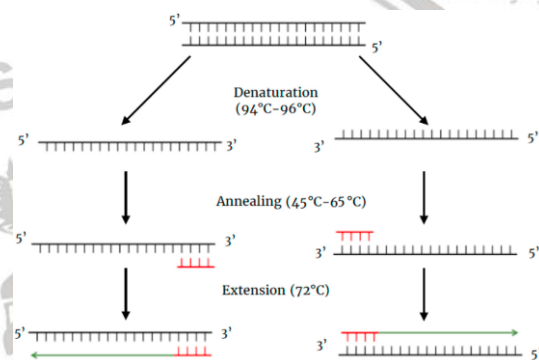
2.6 PCR dan RT-PCR

Penelitian yang berkaitan dengan gene ataupun virus akan berhubungan dengan PCR. Pada penelitian ini β -aktin akan dianalisis menggunakan PCR sedangkan VNN akan dianalisis dengan RT-PCR. PCR mulai dikembangkan pada tahun 1980 oleh Dr. Kary Mullis. PCR memiliki kemampuan untuk mengenali urutan DNA tertentu dengan cepat dan akurat (Mullis, 1990). PCR merupakan suatu teknik sangat kuat dan sensitif yang dapat diaplikasikan dalam berbagai bidang seperti biologi molekuler, diagnostic, genetika populasi dan analisis forensic.

PCR didasarkan pada amplifikasi enzimatik fragmen DNA dengan menggunakan dua oligonukleotida primer yang komplementer dengan ujung 5' dari kedua rantai sekuens target. Oligonukleotida ini digunakan sebagai primer (primer PCR) untuk memungkinkan DNA template dikopi oleh DNA polymerase. Untuk mendukung terjadinya *annealing* primer ini pada template pertama kali diperlukan pemisahan untai DNA yang *double stranded* melalui pemanasan. Selanjutnya suhu reaksi diturunkan untuk membiarkan terjadinya perpasangan sekuens dan reaksi polimerisasi dilakukan oleh DNA polimerase untuk membentuk DNA komplementer, proses ini dikenal dengan siklus PCR (Anggereini, 2008).

Pada prinsipnya PCR menyerupai bentuk *in vitro* dan bentuk dasar replikasi DNA, sebuah proses fisiologis yang digunakan oleh semua sel hidup untuk menduplikat bahan genetik mereka sebelum pembelahan sel (Baynes dan Dominiczak, 2009). Hal ini melibatkan siklus berulang pemanasan dan

pendinginan campuran reaksi yang mengandung kerangka DNA, DNA polimerase, primer, dan nukleotida. Kerangka DNA adalah DNA yang mengandung urutan target. Primer adalah rantai pendek nukleotida yang menemukan DNA target spesifik yang diminati dan mengikatnya pada pendinginan, melalui pasangan dasar komplementer. Primer bertindak sebagai titik awal untuk DNA polimerase untuk menciptakan untai komplementer yang baru. DNA polimerase adalah enzim yang mensintesis untai DNA baru yang melengkapinya urutan target. Setiap siklus PCR terdiri dari tiga tahap yaitu denaturasi (lebih dari 90 °C), annealing (45-65 °C), dan ekstension (72 °C).



Gambar 8. Siklus PCR, selama tahap denaturasi, DNA dipanaskan dengan suhu di atas 90 °C, dua helai urutan target DNA terpisah. Kemudian suhu reaksi diturunkan sampai 45-65 °C. Pada tahap perpanjangan, reaksi dipanaskan sampai 72 °C untuk memungkinkan DNA polimerase mensintesis untai DNA baru yang melengkapinya untai template (Jalali *et al.*, 2017).

Real-time reverse transcription PCR (real-time RT-PCR) adalah teknik yang tepat untuk menghitung mRNA dalam sampel biologis. Manfaat prosedur ini terhadap metode konvensional untuk mengukur RNA meliputi sensitivitasnya, rentang dinamik yang besar, dan potensi untuk penentuan kuantifikasi yang tinggi dan akurat. Spesifisitasnya yang disempurnakan sangat berguna untuk penelitian imunologi, yang sering melibatkan analisis protein (Atamas, 1997).

Banyak protein kunci (misalnya sitokin dan faktor transkripsi) ditemukan dalam kelimpahan yang begitu rendah, sehingga kuantifikasi RT-PCR *real-time* mRNA merupakan satu-satunya teknik yang cukup sensitif untuk mengukur

ekspresi mereka secara in vivo (Demissie *et al.*, 2004 dan Fletcher *et al.*, 2004).

Walaupun RT-PCR *real-time* banyak digunakan untuk menghitung perubahan biologis yang relevan pada tingkat mRNA, akan tetapi masih ada sejumlah masalah yang terkait dengan penggunaannya (Bustin dan Nolan, 2004).

2.7 Peptida Bioaktif Mikroalga

Mikroalga laut telah dimanfaatkan sejak beberapa abad yang lalu.

Mikroalga laut merupakan sumber baru yang sangat berpotensi dalam bidang farmakologi karena banyak mengandung senyawa aktif biologis. Beberapa mikroalga telah diaplikasikan secara komersial, dan didominasi oleh tiga strain yakni : *Arthrospira*, *Chlorella*, dan *Dunaliella salina*. *Arthrospira* telah digunakan dalam nutrisi manusia karena kandungan proteinnya yang tinggi dan nilai gizi yang sangat baik. *Chlorella* juga diaplikasikan sebagai makanan tambahan karena menyesuaikan rasa dari zat pewarnanya. *D. salina* juga dimanfaatkan karena kandungan β -karotennya yang dapat mencapai 14% berat kering (Chisti, 2007).

Peptida bioaktif dari mikroalga berperan sebagai modulator fisiologis yang potensial. Peptida ini biasanya mengandung 3-20 residu asam amino, dan aktivitasnya bergantung pada komposisi dan urutan asam amino (Pihlanto-Leppala, 2001). Berdasarkan sifat struktural, komposisi, dan sekuensialnya, peptida bioaktif ini dapat menunjukkan berbagai jenis bioaktivitas seperti antioxidative (Jung *et al.*, 2005), antihipertensi (Suetsuna *et al.*, 2004), dan efek imunomodulator (Tsuruki *et al.*, 2003).

2.7.1 Fragmen Pigmen Protein

Protein merupakan sebuah makromolekul yang sangat penting dan tersusun dari bahan dasar asam amino. Menurut Winarno (2004), asam amino adalah penyusun molekul protein, apabila kadar protein rendah, hal itu disebabkan persentase asam amino yang rendah juga. Hal tersebut diperkuat dengan

pernyataan Lehninger (1982), bahwa dalam menentukan jumlah tiap-tiap asam amino dapat dilakukan dengan menghidrolisa protein. Aktivitas dan peran dari protein dalam proses biologis diantaranya sebagai katalis enzimatik. Hampir semua reaksi kimia yang terdapat dalam sistem biologi dikatalis oleh makromolekul yang disebut enzim yang merupakan satu jenis protein. Salah satu peran dari protein pada sistem biologi yaitu sebagai transport dan penyimpanan (Katili, 2009).

Mikroalga *Spirulina* adalah salah satu jenis mikroalga yang memiliki banyak manfaat. Mikroalga ini mendapat perhatian lebih besar terutama untuk komponen bioaktifnya seperti asam lemak tak jenuh, β -karoten dan pigmen lainnya (antioksidan) (Bhat & Madyastha, 2000; Madhava *et al.*, 2000), polisakarida sulfat (anti-virals) dan sterol (antimikroba) (Ogles & Pire, 2001; Xue *et al.*, 2002). Beberapa penelitian menjelaskan bahwa *Spirulina* memiliki jenis pigmen diantaranya *chlorophyll a*, *β -carotene*, dan lutein tapi tidak mempunyai *chlorophyll b* (Cohen, 1999). Pigmen tersebut seperti β -karoten termasuk jenis karotenoid, dimana secara umum karotenoid termasuk antioksidan yang kuat. Hal tersebut sesuai pendapat Kim *et al.*, (2001), yang menyatakan bahwa beberapa manfaat dari senyawa yang tergolong karotenoid, adalah sebagai precursor vitamin A, antioksidan, dan dapat meningkatkan daya tahan tubuh.

Alga hijau bersel tunggal yang kaya klorofil dan karotenoid, telah terbukti mampu meningkatkan penyembuhan luka, radang perut, dan dapat memberikan perlindungan dari infeksi dengan merangsang sistem kekebalan tubuh. *Spirulina* juga merupakan makanan untuk kesehatan yang berkualitas tinggi dengan kadar protein, vitamin, mineral, asam lemak tak jenuh ganda, zeaxanthin dan myxoxanthophyll yang tinggi dan telah dilaporkan memiliki potensi dalam bidang farmasi (Li, Guo, & Li, 2003; Moris *et al.*, 2001). Hal tersebut didukung dengan penelitian Yanuhar (2015) tentang fragmen pigmen protein yang menjelaskan

bahwa fragmen pigmen protein dari mikroalga *N. oculata* mampu berperan sebagai antigen anti-inflamasi pada saat virus RNA menyerang ikan kerapu. Selain itu dengan pemberian fragmen pigmen protein pada ikan juga dapat meningkatkan ekspresi β -aktin (Yanuhar dan Khumaidi, 2015). Fragmen pigmen protein termasuk dalam tiga kelompok pigmen yang cukup besar, yaitu dari kelompok karotenoid (Koller *et al.*, 2014) dengan panjang gelombang 470 nm (Gross, 1987), yang nantinya karotenoid ini akan memodulasi metabolisme karsinogen, menghilangkan radikal peroksi, merangsang komunikasi antar sel (*gap junction*) dan meningkatkan respon kekebalan tubuh (Erdman, 1999).

2.7.2 Karotenoid

Karotenoid merupakan salah satu pigmen yang paling banyak ditemukan di alam. Kebanyakan karotenoid merupakan hidrokarbon yang mengandung 40 atom karbon dan dua cincin terminal (Bell *et al.*, 2000). Semua organisme fotosintesis (termasuk tanaman alga dan cyanobacteria) serta beberapa bakteri dan jamur nonfotosintetik mensintesis karotenoid. Dua kelas karotenoid ditemukan di alam yaitu : (a) karoten seperti β -karoten, yang terdiri dari hidrokarbon linier yang dapat di siklized pada satu ujung atau kedua ujung molekul, dan (b) turunan oksigen dari karoten seperti lutein, violaxanthin, neoxanthin, dan zeaxanthin, yang dikenal sebagai xanthophylls (Botella dan Rodr'iguez, 2006).

Pada alga, fungsi utama karotenoid yaitu sebagai agen photoprotective dan sebagai pigmen pemanenan cahaya. Karotenoid juga berperan dalam phototropism dan phototaxis. Beberapa mikroalga dapat menjalani proses karotenogenesis, sebagai respons terhadap berbagai tekanan lingkungan misalnya cahaya, suhu, salinitas, dan nutrisi (Bhosale , 2004).

2.7.3 Kolagen

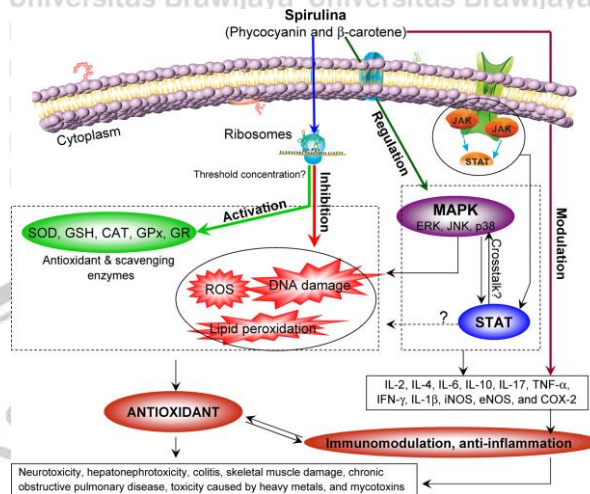
Kolagen merupakan protein yang paling melimpah dan mewakili hampir 30% protein total yang ada di dalam tubuh (Pati *et al.*, 2010). Protein kolagen memiliki konformasi yang kompleks, dan terbagi dalam empat struktur diantaranya : struktur primer (triplet asam amino), struktur sekunder (α heliks), struktur tersier (triple helix) dan struktur kuartener (fibril). Kolagen sebagai komponen utama matriks ekstraselular dan sangat penting untuk perlindungan mekanis jaringan, organ, dan regulasi fisiologis secara seluler (Kielty *et al.*, 1993). Kolagen dibentuk oleh molekul dasar yaitu tiga unit rantai α polipeptida. Rantai tersebut saling berpilin untuk membentuk struktur triple heliks, atau lebih sering kita ketahui sebagai tropokolagen (Gelse *et al.* 2003). Komposisi asam amino pada kolagen kebanyakan didominasi oleh glisina, prolina, hidroksiprolina dan alanina (Hema *et al.*, 2003).

Kolagen berperan penting terutama dalam industri biomedis, farmasi, makanan, dan kosmetik. Kolagen juga memiliki fungsi biologis dalam pembentukan jaringan dan organ, serta terlibat dalam pembelahan, pertahanan, dan differensiasi sel. Selain itu kolagen memiliki potensi biomaterial untuk rekayasa jaringan karena kelimpahannya (Glowacki *et al.*, 2008). Di antara berbagai jenis kolagen, yaitu kolagen tipe I yang banyak digunakan sebagai biomaterial untuk perbaikan jaringan dan sistem pembalut luka, karena sifat antigenik yang rendah dan sifat adhesi sel yang tinggi (Pati *et al.*, 2010).

2.7.4 Mekanisme Peptida untuk Anti inflamasi

Sebagian besar penelitian terhadap *Spirulina* berfokus pada efek antioksidan, anti-inflamasi, dan imunomodulator pada manusia maupun pada hewan. Studi pada hewan menunjukkan bahwa *Spirulina* merupakan stimulator yang kuat dari sistem kekebalan tubuh. Hal tersebut bisa terjadi karena *Spirulina*

meningkatkan aktivitas fagosit makrofag, menyebabkan sel NK terakumulasi dalam jaringan dengan merangsang produksi antibodi dan sitokin, serta dengan mengaktifkan dan memobilisasi sel T dan sel B (Mao *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2005).



Gambar 9. Mekanisme *Spirulina* yang mendasari aktivitas antioksidan, anti-inflamasi, dan imunomodulator *Spirulina* (Wu *et al.*, 2016).

Aktivitas antioksidan serta anti-inflamasi melibatkan senyawa aktif penting yang terkandung pada *Spirulina* salah satunya yaitu phycocyanin dan β -carotene. Phycocyanin mengais radikal bebas, menekan ekspresi iNOS dan produksi nitrit, dan menghambat peroksidasi lipid. Selanjutnya β -Carotene melindungi terhadap peroksidasi lipid, menghambat akumulasi ROS intraselular, dan menghambat ekspresi gen inflamasi. *Spirulina* juga mengatur jalur pensinyalan ERK1/2, JNK, p38, dan I κ B, yang menghasilkan efek antioksidan dan anti-inflamasi (Wu *et al.*, 2016).

2.8 Mikroalga *Spirulina*

Alga adalah organisme fotosintetik yang mengubah energi cahaya dari sinar matahari menjadi energi kimia dengan proses fotosintesis. Alga memiliki struktur reproduksi sederhana. Biomassa ganggang mengandung berbagai senyawa dengan struktur dan fungsi yang beragam. Bioteknologi alga dibagi

menjadi mikroalga, makroalga dan cyanobacteria dengan spesifisitasnya yang unik (Becker, 2007).

Bioteknologi mikroalga mengacu pada produksi berbagai produk seperti phycocyanin, karotenoid, asam lemak dan lipid untuk aplikasi dalam makanan kesehatan, kosmetik, suplemen makanan, obat-obatan dan produksi bahan bakar.

Kelompok mikroalga yang sangat penting adalah *chlorophyte*, *bacillariophytes*.

Alga yang saat ini dibudidayakan untuk kandungan protein maksimalnya adalah spesies cyanobacterium *Athrospira*, yang biasa dikenal dengan *Spirulina* (Soni et

al., 2017). Telah diketahui bahwa *Spirulina* mengandung beberapa manfaat

diantaranya sebagai antioksidan, fitonutrien, probiotik, dan nutraceuticals. Dunia

Perserikatan Bangsa Bangsa pada konferensi makanan menyatakan bahwa

Spirulina sebagai makanan terbaik untuk masa depan, dan sekarang sudah mulai

populer (Pulz and Gross, 2004).

Dua spesies *Spirulina* yang paling penting adalah *Spirulina maxima* dan

Spirulina platensis. *Spirulina* memiliki kandungan mikro dan makronutrien yang

cukup tinggi. Komposisi kimia berat keringnya meliputi 60-70% protein,

karbohidrat, vitamin seperti provitamin A, vitamin C, vitamin E, mineral seperti besi,

kalsium, kromium, tembaga, magnesium, mangan, fosfor, potasium, natrium dan

seng. Asam lemak esensial γ -linolenat (GLA), pigmen, seperti klorofil a,

phycocyanin dan karoten juga ada. *Spirulina* juga digunakan dalam kosmetik,

obat-obatan dan pengolahan air limbah. Dinding selnya terdiri dari polisakarida

yang memiliki pencernaan 86%, dan mudah diserap tubuh manusia (Sjors, 2010).

Mikroalga ini mengandung klorofil a, oleh karena itu diklasifikasikan sebagai

mikroalga menurut ahli botani yang termasuk dalam kelas Cyanophyceae (Koru,

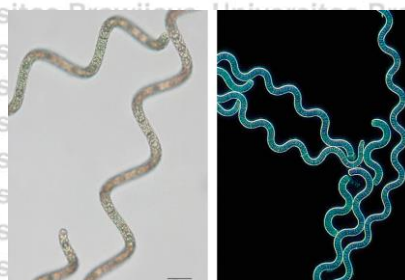
2009; Sudhakar dan Premlatha, 2015).

2.8.1 Klasifikasi dan Morfologi *Spirulina*

Spirulina merupakan spesies *Cyanobacteria* (alga biru-hijau atau *blue green algae*). Bold & Wynne (1985), menjelaskan klasifikasi *Spirulina* dalam sistematika (taksonomi) tumbuhan adalah sebagai berikut:

- Kingdom : *Protista*
- Divisi : *Cyanophyta*
- Kelas : *Cyanophyceae*
- Ordo : *Nostocales*
- Famili : *Oscillatoriaceae*
- Genus : *Spirulina*
- Spesies : *Spirulina* sp

Spirulina merupakan mikroalga biru-hijau multiseluler, berfilamen, dan berfotosintesis. *Spirulina* mempunyai bentuk sel silindris, selaras dalam spiral atau garis lurus. Bentuk heliks dari filamen adalah karakteristik genus *Spirulina*. Filamen ini memiliki panjang variabel (biasanya 50-500 µm) dan diameter mendekati 3-12 µm, namun dimensi sel, derajat gulungan, dan panjang filamen bervariasi. Sel *Spirulina* memiliki sejumlah inklusi, seperti membran tilakoid dengan phycobilisomes, carboxysomes, ribosom, fibril DNA, dan vakuola, serta butiran poliglukida, polifosfat, dan sianophycin. Permukaan tubuh *Spirulina* halus dan tanpa penutup, sehingga mudah dicerna dengan sistem enzimatik sederhana (Ciferri dan Tiboni, 1985; Habib *et al.*, 2008). Morfologi *Spirulina* sp dapat dilihat pada **Gambar 10** di bawah ini :



Gambar 10. *Spirulina* (Arthrospira) (Small, 2011).

2.8.2 Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan *Spirulina*

Faktor pertumbuhan mikroalga akan mempengaruhi hasil biomassa maupun jenis produk yang diinginkan. Tiga komponen penting yang harus diperhatikan untuk pertumbuhan sel mikroalga *Spirulina* yaitu cahaya, karbondioksida dan nutrisi. *Spirulina* adalah salah satu tanaman yang paling efisien dalam menangkap dan memanfaatkan energi cahaya dan CO₂ untuk keperluan fotosintesis (Diharmi, 2001). Menurut Hadiyanto dan Azim (2012) beberapa faktor pertumbuhan mikroalga yang harus diperhatikan diantaranya :

1. Intensitas cahaya

Cahaya merupakan faktor penting untuk pertumbuhan mikroalga karena dibutuhkan untuk proses fotosintesis. Satuan intensitas cahaya sering disebut sebagai microEinsteins/m²s atau sama dengan satuan mol photons. Beberapa satuan lain seperti micromol/m²s, Lux, dan W/m² juga sering digunakan. Jeon *et al.*, (2005) menjelaskan bahwa aktivitas fotosintesis akan naik ketika intensitas cahaya juga semakin tinggi. Apabila mikroalga dibiakkan pada kedalaman tertentu, maka intensitas cahaya yang dibutuhkan juga semakin tinggi. Intensitas cahaya yang dibutuhkan untuk pertumbuhan *Spirulina* yaitu sebesar ± 4000 lux berasal dari lampu TL 36 Watt (Suantika dan Hendrawandi, 2009).

2. Temperatur

Temperatur atau suhu menjadi parameter untuk pertumbuhan mikroalga yang penting. Sebagian besar algae bisa tumbuh pada kisaran suhu 15 – 40 °C. Beberapa mikroalga juga dapat tumbuh subur pada kondisi suhu yang berkisar antara 24 – 26 °C. Ketika suhu berada di bawah 16 °C mikroalga juga masih bisa tumbuh namun dalam keadaan lambat. Pada suhu di atas 35 °C beberapa mikroalga tidak dapat tumbuh bahkan mati atau lysis (pecah). Goldman dan Carpenter (1974) menyatakan bahwa

kenaikan temperatur atau suhu pada range tertentu dapat menaikkan growth rate pada mikroalga. Sedangkan suhu optimal untuk pertumbuhan *Spirulina* berkisar antara 20 – 30 °C (Heriyati, 2008).

3. Nutrien

Nutrient merupakan faktor penting dalam produksi biomass alga. Sebagian besar mikroalga membutuhkan makronutrien seperti karbon, (C), nitrogen (N), hidrogen (H), sulfur (S), kalium (K), magnesium (Mg), dan fosfor (P). Sedangkan mikronutrient digunakan untuk meningkatkan pertumbuhan sel dan metabolisme. Keberadaan mikronutrien tidak bisa diganti oleh zat lain.

Kebutuhan mikronutrien juga berbeda beda berdasarkan habitat mikroalga (air laut, payau, tawar). Beberapa unsur mikronutrien di antaranya, zat besi (Fe), boron (B), mangan (Mn), vanadium (Va), silikon (Si), selenium (Se), cuprum (Cu), nikel (Ni), dan molybdenum (Mo).

4. Oksigen

Oksigen dapat dihasilkan dari reaksi fotosintesis mikroalga. Jumlah oksigen terlarut dalam medium yang semakin tinggi bisa membahayakan proses fotosintesis. Jika sistem kultur pada bak terbuka maka gas oksigen akan mudah teruap ke atmosfer. Sedangkan untuk kultur bak tertutup, gas oksigen dapat terakumulasi pada medium dan menjadikan racun (Graneli dan Salomon, 2010).

5. Karbondioksida

Karbon dioksida biasanya digunakan mikroalga untuk proses fotosintesis seperti tumbuhan berklorofil lainnya. Ugwu *et al.*, (2008) dalam penelitiannya tentang transfer massa CO₂ pada medium mempengaruhi laju pertumbuhan mikroalga. Namun tingginya kadar CO₂ pada medium juga bisa mempengaruhi pH. Selain itu Kong *et al.*, (2010) juga melakukan penelitian yang sama dan hasilnya semakin tinggi kadar CO₂ kira-kira di

atas 33% dari komposisi udara normal maka laju pertumbuhan mikroalga menjadi terhambat.

6. pH

Sebagian besar kita ketahui mikroalga akan tumbuh pada kondisi pH normal antara 6 sampai 8. Namun ada beberapa mikroalga yang tumbuh pada kondisi alkali atau basa seperti *Spirulina platensis*. Namun pH yang optimal untuk pertumbuhan *Spirulina* berkisar antara 7.0 – 9.5 (Fogg, 1987; Elzenga, 2000).

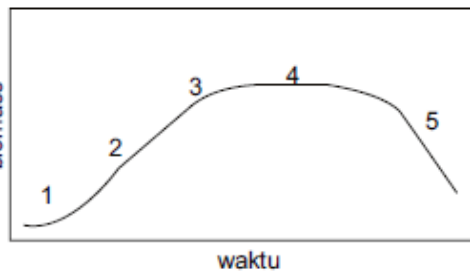
7. Salinitas

Salinitas juga menjadi faktor penting dalam pertumbuhan mikroalga. Mikroalga air laut pada umumnya sangat rentan terhadap perubahan salinitas pada medium. Salinitas yang optimal untuk pertumbuhan *Spirulina* berkisar antara 15 – 20 ppt (Heriyati, 2008).

2.8.3 Masa Pertumbuhan *Spirulina*

Masa pertumbuhan mikroalga bisa diukur berdasarkan biomas maupun jumlah sel pada mediumnya. Fase pertumbuhan mikroalga ditandai dengan bertambahnya ukuran sel atau bertambahnya jumlah sel dengan 5 fase pertumbuhan. Fase pertumbuhan mikroalga ini dapat digambarkan dengan grafik.

Diagram fase pertumbuhan mikroalga berdasarkan Fogg dan Thake (1987) adalah sebagai berikut:



Gambar 11. Grafik Pertumbuhan Mikroalga(Fogg dan Thake, 1987).

1. Fase Lag

Fase lag merupakan fase adaptasi pada medium baru. Pada tahap ini mikroalga memerlukan waktu untuk penyesuaian diri karena lingkungan inokulum (bibit) cenderung berbeda dari lingkungan sebelumnya. Selama proses adaptasi, sel alga cenderung sensitif terhadap nutrient, temperatur, dan kondisi yang berbeda dari kondisi aslinya. Pertumbuhan sel alga dapat berubah sewaktu-waktu, bahkan pertumbuhan sel yang semakin menurun, bisa juga terjadi kematian sel apabila tidak bisa beradaptasi dengan baik.

2. Fase Ekspensial (Fase Log)

Pada tahap ini kecepatan pertumbuhan mikroalga dapat dihitung. Perhitungan berdasarkan kenaikan biomass dan selisih waktu yang dibutuhkan. Kecepatan pertumbuhan (*growth rate*) merupakan salah satu indikasi penting ketika sel berhasil melalui fase adaptasi. Durasi pada fase ekspensial ini bergantung pada volume inokulum, kecepatan pertumbuhan, medium, dan kondisi lingkungan untuk mendukung pertumbuhan alga. Fase ekspensial ditandai dengan terjadinya periode pertumbuhan yang cepat. Sel membelah dengan laju konstan, aktivitas metabolik konstan, dan keadaan pertumbuhan seimbang antara supply makanan dan kenaikan jumlah sel. Pada fase ini dapat dilakukan pemanenan biomassa sehingga hasil yang didapatkan akan maksimum.

3. Penurunan Fase Log

Penurunan pertumbuhan secara umum dipengaruhi oleh biomassa, penurunan ini karena telah mencapai tahap populasi yang maksimum, sehingga kebutuhan makanan pada medium menjadi berkurang. Selain itu fase log ini dapat dipengaruhi oleh ketersediaan sumber cahaya dan akumulasi oksigen yang dihasilkan dari reaksi fotosintesis. Akumulasi

oksigen dapat mempengaruhi keasaman sel. Sedangkan jumlah sel yang semakin banyak dapat menghalangi cahaya masuk ke medium.

4. Fase Stasioner

Fase stasioner merupakan fase di mana tidak ada lagi pertumbuhan mikroalga, atau kecepatan pertumbuhan (*growth rate*) menjadi nol. Pada tahap ini terjadi akumulasi racun akibat metabolisme dari mikroalga itu sendiri, juga bisa karena kekurangan nutrisi, dan perubahan kondisi lingkungan. Pada fase ini jumlah sel yang hidup sama dengan jumlah sel yang mati.

5. Fase Kematian

Pada fase ini jumlah sel yang mati lebih banyak dibandingkan dengan jumlah sel yang hidup. Keberadaan nutrisi semakin menipis (bahkan tidak ada), selain itu cadangan makanan dalam tubuh sel terus berkurang, dan penumpukan racun semakin meningkat. Pada tahap ini banyak sel yang mati, bahkan dapat lisis (pecah) kemudian larut ke dalam medium.

2.8.4 Pemanfaatan Mikroalga *Spirulina*

Mikroalga memiliki berbagai potensi yang dapat dikembangkan sebagai sumber pakan, pangan, dan telah dimanfaatkan juga untuk berbagai macam keperluan mulai dari bidang perikanan sebagai makanan larva ikan, organisme penyaring, industri farmasi, dan suplemen makanan karena banyak mengandung protein, karbohidrat, lipid, dan berbagai macam mineral (Cresswell *et al.*, 1989).

Selain itu Mikroalga juga digunakan untuk berbagai aplikasi, diantaranya sebagai nutrisi untuk manusia dan hewan, untuk kosmetik, dalam bidang farmasi, pengurangan CO₂, dan produksi bioenergi. Manfaat tersebut dikarenakan sifat biologis dari mikroalga itu sendiri dan studi dari beberapa literatur banyak yang menyatakan bahwa komponen dari mikroalga ini dapat digunakan sebagai

antioksidan, antimikroba, agen antikanker, kesehatan anti-inflamasi dan kardiovaskular, anti obesitas, dan aktivitas antidiabetes (Dominguez, 2013).

Mikroalga laut kaya akan senyawa aktif biologis. Senyawa tersebut dapat digunakan untuk pengembangan farmasi dan nutraceutical. Mikroalga memiliki kapasitas untuk menghasilkan racun yang bisa digunakan untuk aplikasi farmasi (Venkatesan *et al.*, 2015). Salah satu mikroalga yang memiliki manfaat yaitu

Spirulina. Pada saat ini *Spirulina* dipamerkan karena bahan bioaktifnya yang memiliki aktivitas antioksidan (Wang *et al.*, 2007; Bai *et al.*, 2014). Sebagian besar aktivitas antioksidan *Spirulina* disebabkan oleh biliprotein dan phycoyanin yang terkandung dalam mikroalga ini. Bermejo *et al.*, (2008) menambahkan bahwa *Spirulina* dapat digunakan untuk membuat suplemen antioksidan makanan alami yang ditambahkan ke sereal, produk organik atau minuman, yang digunakan untuk mencegah beberapa penyakit kronis akibat terkena radikal bebas. Beberapa informasi juga tersedia mengenai efek stimulasi kekebalan tubuh *Spirulina* pada ikan. Duncan dan Klesius, (1996) menunjukkan bahwa *Spirulina* telah meningkatkan kekebalan nonspesifik dari lele (*Ictalurus punctatus*) sementara Watanuki *et al.*, (2006) menjelaskan bahwa *Spirulina* juga memiliki dampak stimulasi kekebalan pada sistem kekebalan tubuh ikan mas (*Cyprinus carpio*).

2.9 Acuan penggunaan dosis untuk uji in-vivo ikan kerapu cantang

Pemanfaatan mikroalga dalam meningkatkan sistem imun pada ikan telah diteliti melalui penelitian terdahulu, diantaranya penelitian Kok *et al.*, (2011) menjelaskan bahwa ekstrak metanol dari mikroalga dapat digunakan sebagai antiviral. Selain itu fraksi polisakarida dari mikroalga juga bermanfaat untuk menghambat produksi retrovirus (Talyshinsky *et al.*, 2002). Pemanfaatan mikroalga yang akan digunakan dalam bidang kesehatan tentunya sudah memperhitungkan dosis dan telah diuji secara klinis terlebih dahulu. Pemanfaatan

tersebut akan berhasil ketika sudah mendapatkan dosis yang optimal dan cara aplikasi yang tepat (penggunaannya).

Salah satu penggunaan dosis yang optimal untuk peningkatan sistem imun pada ikan kerapu mengacu pada Yanuhar (2011) dengan menggunakan dosis 33 µg/ml untuk 150 gram berat badan ikan, dan aplikasi penggunaan dosis untuk uji in-vivo pada ikan kerapu yaitu dengan metode oral (sonde). Metode oral digunakan karena aplikasi melalui suntik akan berakibat stress pada ikan dan akan berpengaruh terhadap sistem imun. Hal tersebut juga diperkuat dengan paten Yanuhar (2015) (Patent ID : P000045822). Hasil dari penelitian tersebut menjelaskan bahwa penggunaan dosis 33 µg/ml untuk 150 gram berat badan ikan telah menunjukkan hasil yang optimal untuk peningkatan sistem imun pada ikan kerapu. Dengan demikian pada penelitian yang akan dilakukan menggunakan dosis yang berbeda yakni 17 µg/ml, 33 µg/ml, dan 50 µg/ml dengan tujuan apakah dosis tersebut juga optimal dan mampu dalam menekan peradangan jaringan ikan kerapu dari infeksi VNN.

3. KERANGKA KONSEP PENELITIAN

3.1 Landasan Teori

Viral nervous necrosis (VNN merupakan sinonim dari ensefalo dan retinopati vaskular, VER), yang merupakan salah satu penyakit serius pada ikan teleost. Pada umumnya VNN menyebabkan tingkat kematian yang tinggi, dan menyerang lebih dari 20 spesies budidaya ikan laut di seluruh dunia (Muroga, 2001). Ikan yang terkena VNN menunjukkan perilaku berenang yang tidak normal dan secara histopatologis ditandai dengan vakuolasi dan nekrosis pada sistem saraf pusat. Secara umum ikan yang terkena VNN cenderung sangat tinggi pada tahap larva atau remaja, namun pada tahap ikan dewasa serangan VNN cenderung lebih kecil (Munday *et al.*, 2002).

Agen penyebab VNN adalah nodavirus ikan yang termasuk dalam genus Betanodavirus dalam famili Nodaviridae, berbentuk bola tidak dilipat dengan diameter 25-30nm, dan terdiri dari satu protein mantel tunggal dan dua molekul ss-RNA positif (Iwamoto *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2001; Schneemann *et al.*, 2005). Di Indonesia dilaporkan bahwa VNN (*Viral Nervous Necrosis*) telah menyerang sebagian besar pada budidaya ikan kerapu dengan tingkat kematian 100%. Gejala yang ditimbulkan adalah dengan ikan berputar-putar atau *whirling*, terjadi *sleeping dead* atau ikan berada di dasar seperti mati serta adanya gejala tingkah laku yang tidak wajar (Yuasa *et al.*, 2000).

Patogen atau virus yang masuk ke dalam sel akan mengaktifkan sistem imun, kemudian akan terjadi proses pengenalan sinyal bahaya dan aktivasi sinyal berikutnya (Arancibia *et al.*, 2007). Respon imun terhadap antigen yang pertama diperankan oleh *Toll-like receptors*. Keluarga multigene seperti *Toll-like receptors* merupakan reseptor pengenalan penting dari sistem kekebalan bawaan (*innate*) pada invertebrata maupun vertebrata (Roach *et al.*, 2005).

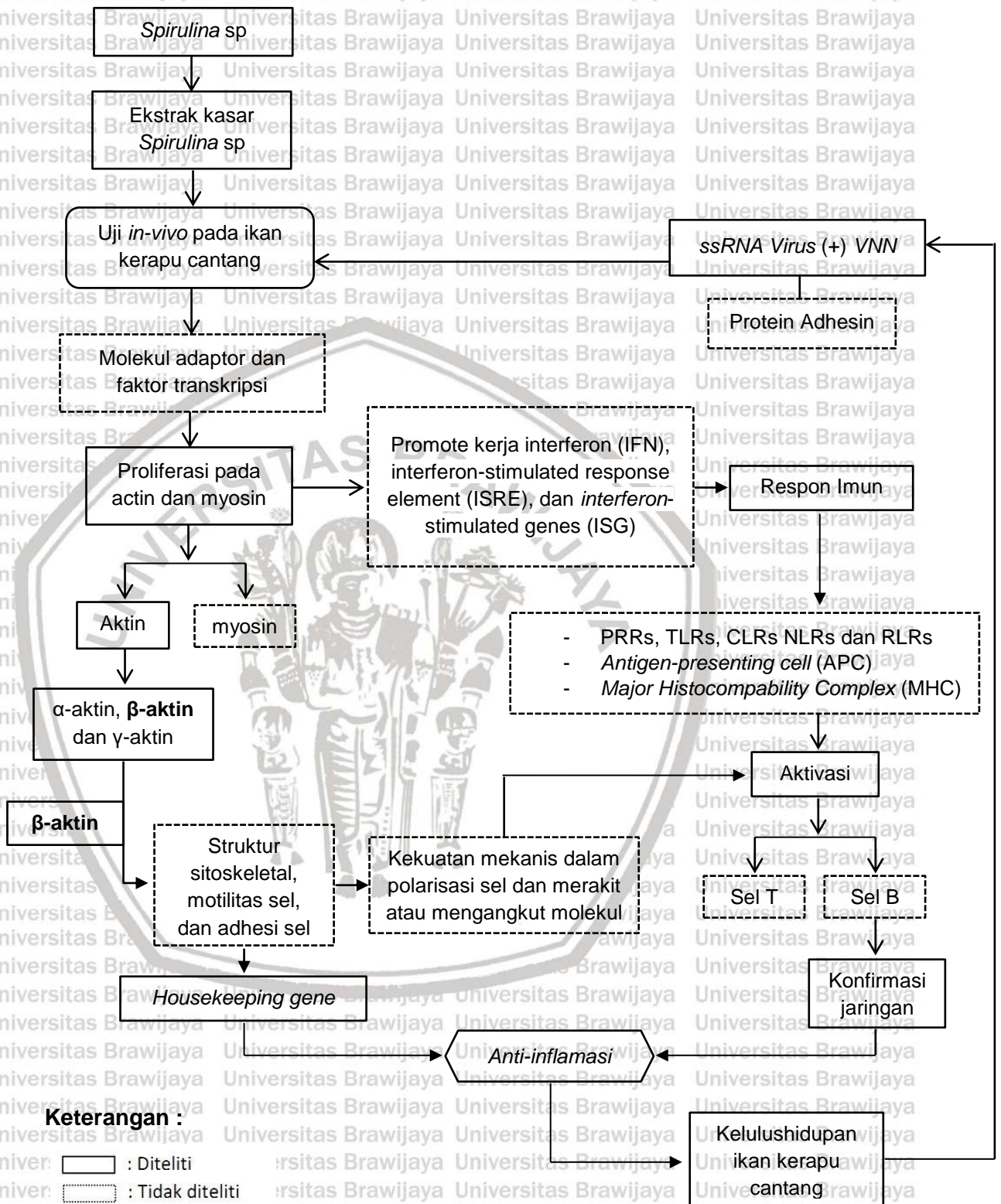
Respon imun terhadap virus juga diperankan oleh *Antigen Presenting Cell*.

APC berperan untuk menyerap, memproses, dan menyajikan antigen ke MHC kelas II serta akan dikenali oleh reseptor sel T dan langsung akan membunuh antigen yang sifatnya berbahaya, kemudian juga akan memberikan sinyal melalui reseptor sel B (BCR). Signaling melalui BCR menginduksi perubahan yang memfasilitasi presentasi antigen, proliferasi dan pematangan afinitas antibodi yang disekresikan, yang menghasilkan sel B sangat spesifik dan dapat bertahan sebagai memori sel B. Terkait dengan proses signaling dalam suatu sel, β -aktin merupakan salah satu komponen sitoskeleton yang sangat berperan penting.

Salah satu peran β -aktin adalah untuk mempertahankan struktur sitoskeletal, motilitas sel, dan adhesi sel (Ayscough, 2004). Selain itu β -aktin merupakan *housekeeping gene* yang berperan sebagai fasilitator dan juga mampu meningkatkan ekspresi protein serta dapat dijadikan sebagai indikator pada sistem pertahanan tubuh.

Spirulina sp merupakan salah satu mikroalga yang berpotensi untuk dikembangkan terutama dalam bidang perikanan karena mikroalga ini berpotensi sebagai antioksidan, antibakteri dan antivirus (Madhava *et al.*, 2000). Dengan memanfaatkan kandungan dan senyawa biologis *Spirulina* sp dalam bentuk ekstrak kasar (*crude extract*) diharapkan mampu berperan sebagai inducer β -aktin yang nantinya akan mempercepat respon imun dan meningkatkan sistem kekebalan tubuh pada ikan.

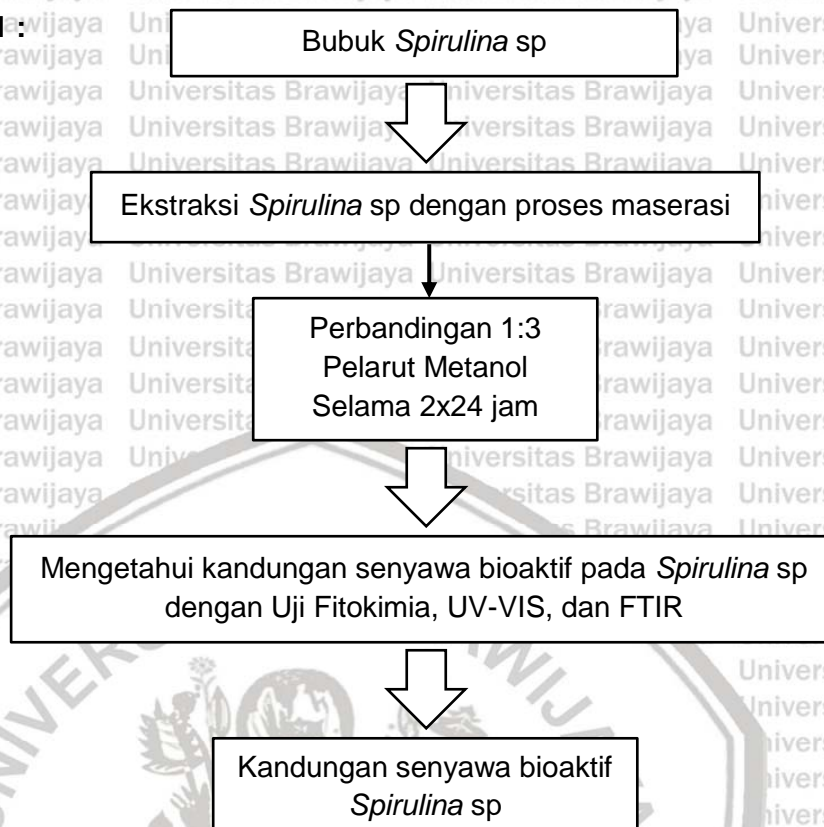
3.2 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 12. Kerangka konseptual penelitian

3.3 Kerangka Operasional Penelitian

Tahap 1 :

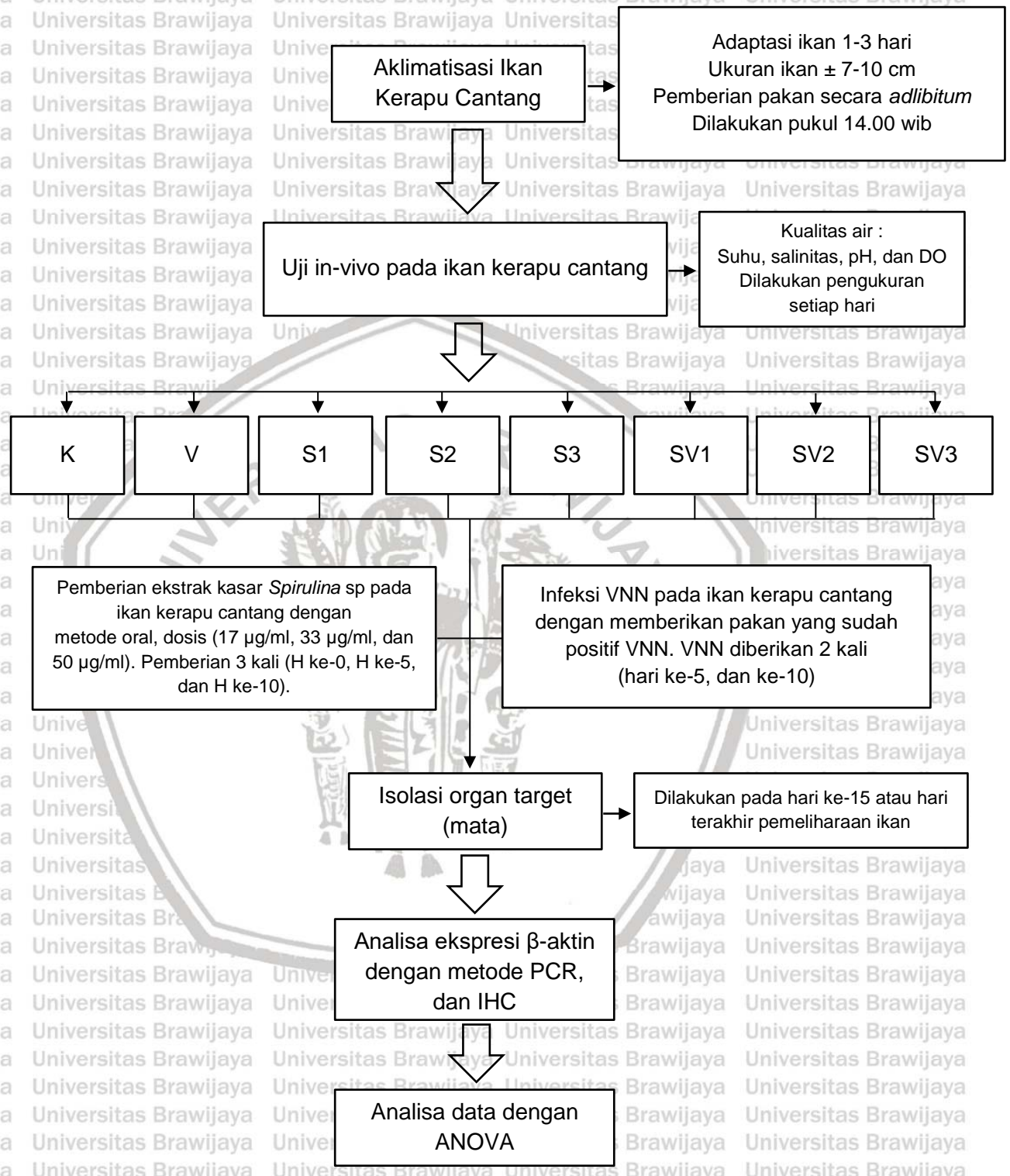


Gambar 13. Kerangka operasional penelitian tahap 1

Penelitian yang akan dilakukan pada tahap 1 yaitu :

- Penelitian diawali dengan mengekstrak bubuk mikroalga *Spirulina* sp yang didapatkan dari BPBAP Situbondo.
- Ekstraksi bubuk *Spirulina* sp dengan proses maserasi menggunakan pelarut metanol PA dengan perbandingan 1:3 dan dilakukan selama 2x24 jam, kemudian dilakukan proses penguapan menggunakan *rotary vacuum evaporator* dengan suhu 40 °C.
- Selanjutnya untuk mengetahui kandungan yang terdapat pada *Spirulina* sp, hasil ekstrak kasar *Spirulina* sp diuji dengan Uji Fitokimia, UV-VIS, dan FTIR
- Didapatkan kandungan ekstrak kasar *Spirulina* sp.

Tahap 2 :



Gambar 14. Kerangka operasional penelitian tahap 2

Penelitian yang akan dilakukan pada tahap 2 yaitu :

- Proses aklimatisasi ikan kerapu cantang, diadaptasikan dengan media yang baru kurang lebih 1-3 hari. Ukuran ikan \pm 7-10 cm. Ikan kerapu cantang diberi pakan dengan daging ikan segar yang dicacah. Pemberian pakan dilakukan secara ad libitum, dan pemberian pakan dilakukan satu kali dalam sehari yaitu pada pukul 14.00 wib.

- Deteksi daging ikan positif *viral nervous necrosis* dengan metode RT-PCR.

- Uji in-vivo dilakukan dengan 8 perlakuan yakni perlakuan kontrol positif (K+), kontrol negatif dengan penginfeksi VNN (K-), perlakuan ekstrak *Spirulina* sp dosis 17 μ g/ml (S1), perlakuan ekstrak *Spirulina* sp dosis 33 μ g/ml (S2), perlakuan ekstrak *Spirulina* sp dosis 50 μ g/ml (S3), perlakuan ekstrak *Spirulina* sp dosis 17 μ g/ml dan penginfeksi VNN (SV1), perlakuan ekstrak *Spirulina* sp dosis 33 μ g/ml dan penginfeksi VNN (SV2), perlakuan ekstrak *Spirulina* sp dosis 50 μ g/ml dan penginfeksi VNN (SV3). Pemberian ekstrak dilakukan sebanyak 3 kali dan dilakukan pada hari ke-0, hari ke-5, serta hari ke-10.

- Kemudian penginfeksi VNN dilakukan dengan metode oral sebanyak dua kali dengan cara memberikan daging ikan yang sudah positif terinfeksi VNN sebanyak 5 gram/ikan. Pemberian VNN dilakukan pada hari ke-5 dan hari ke-10.

- Proses isolasi organ target yaitu organ mata dilakukan pada hari ke-15 atau hari terakhir selama pemeliharaan ikan.

- Proses analisa ekspresi β -aktin dengan metode PCR, IHC, serta analisa data menggunakan ANOVA.

3.4 Hipotesis

H_0 : Pemberian ekstrak kasar *Spirulina* sp tidak berpengaruh terhadap ekspresi β -aktin ikan kerapu cantang (*Epinephelus* sp) yang diuji tantang *Viral Nervous Necrosis*

H_1 : Diduga pemberian ekstrak kasar *Spirulina* sp berpengaruh terhadap ekspresi β -aktin ikan kerapu cantang (*Epinephelus* sp) yang diuji tantang *Viral Nervous Necrosis*.

H_2 : Diduga pemberian ekstrak kasar *Spirulina* sp dapat mengurangi tingkat kerusakan jaringan pada ikan kerapu cantang (*Epinephelus* sp) yang diuji tantang *Viral Nervous Necrosis*.

3.5 Penelitian Terdahulu

Berikut ini merupakan hasil penelitian terdahulu tentang manfaat dan kandungan yang terdapat pada mikroalga, yang disajikan pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Penelitian Terdahulu

No	Judul Penelitian	Author (tahun)	Hasil / Kesimpulan
1	Pengaruh Pemberian Bahan Aktif Ekstrak Nannochloropsis oculata Terhadap Kadar Radikal Bebas Pada Ikan Kerapu Tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>) Yang Terinfeksi Bakteri <i>Vibrio alginolyticus</i>	Yanuhar, 2009	Penggunaan ekstrak <i>N. oculata</i> dapat memberikan pengaruh terhadap penurunan radikal bebas (<i>malonaldehyde</i>) pada ikan kerapu tikus
2	β -Actin is a useful internal control for tissue-specific gene expression studies using quantitative real-time PCR in the half-smooth tongue sole <i>Cynoglossus semilaevis</i> challenged with LPS or <i>Vibrio anguillarum</i>	Li <i>et al.</i> , 2010	β -actin telah sering digunakan sebagai kontrol internal (gen) atau sebagai gen housekeeping untuk menormalkan ekspresi tingkat gen atau mRNA target antara sampel yang berbeda.

3	Commercial and industrial applications of micro algae – A review	Priyadarshani dan Rath, 2012	Mikroalga mengandung 50-70% protein, 30% lemak, lebih dari 40% gliserol, hingga 8-14% karoten dan konsentrasi yang cukup tinggi vitamin B1, B2, B3, B6, B12, E, K, D, dll, dibandingkan dengan tanaman atau hewan lainnya.
4	Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content	Goiris, Muylaert, & Fraeye, 2012	Sumber antioxidant alami dapat diperoleh dari mikroalga, dengan memanfaatkan beberapa senyawa yang terkandung di dalamnya, seperti karotenoid dan fenolik.
5	Microalgae as versatile cellular factories for valued products	Koller, Muhr, dan Braunegg, 2014	Beberapa jenis mikroalga menghasilkan bio-produk: Pigmen, lipid, senyawa bioaktif, dan polisakarida tertentu. Juga menghasilkan tiga kelompok pigmen yang cukup besar, yaitu klorofil, karotenoid, dan phycobilins.
6	Effects of Pigment-Protein Fraction from <i>Nannochloropsis oculata</i> on TNF- α and IL-6 which Act as an Anti-Inflammatory Against Viral Nervous Necrosis (VNN) Infection	Yanuhar, 2015	Pigmen-protein dari <i>N. oculata</i> mampu menekan peradangan jaringan kerapu bila infeksi VNN itu terjadi. Tanda inflamasi berkurang dengan pemberian pigmen-protein. Hal tersebut diperkuat dengan meningkatnya ekspresi TNF- α dan IL-6.
7	The application of pigment-protein fraction from <i>Nannochloropsis oculata</i> on β -actin response of <i>Cromileptes altivelis</i> infected with viral nervous necrosis	Yanuhar dan Khumaidi, 2017	Fragmen pigmen protein dari mikroalga <i>Nannochloropsis oculata</i> yang diinduksikan pada ikan kerapu tikus dapat meningkatkan ekspresi β -Actin. Kenaikan tersebut menunjukkan bahwa FPP dapat dimanfaatkan sebagai imunostimulan dalam meningkatkan sistem imun.

3.6 Kebaruan Penelitian

Penelitian tentang manfaat mikroalga laut sebagai inducer β -actin untuk anti-inflamasi terakhir dipublikasikan pada tahun 2017 dengan menggunakan mikroalga dari jenis yang lain, yakni *Nannochloropsis oculata*. Pada penelitian yang saya lakukan yaitu dengan menggunakan ekstrak kasar *Spirulina* sp. Selain itu perbedaan juga terdapat pada informasi yang akan diterima oleh pembaca terkait manfaat dari *Spirulina* sp dalam meningkatkan sistem kekebalan tubuh pada ikan.

3.7 Strategi Publikasi

Hasil penelitian mengenai ekstrak kasar *Spirulina* sp sebagai Inducer β -aktin untuk anti-inflamasi pada ikan kerapu cantang (*Epinephelus* sp) yang diinfeksi *viral verovous vecrosis* (VNN) rencananya akan dipublikasikan di Journal of Fisheries and Marine Research, yang sudah terindeks DOAJ dan Google Scholar. Publikasi jurnal sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan studi di program Magister Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang.

4. METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratrium Hidrobiologi (Divisi Lingkungan dan Bioteknologi Perairan), Laboratorium Ilmu Teknologi Hasil Perairan (Divisi Perekayasaan Hasil Perikanan) Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Kimia Organik Fakultas Science and Technology Universitas Islam Negeri Malik Ibrahim Malang, Laboratorium Materia Medica Batu, dan Hatchery UD. Giso Bangkit Situbondo pada bulan Maret sampai bulan Juli 2018.

4.2 Desain Penelitian

Tabel 2. Desain Penelitian

Pokok Pembahasan	Hasil
Masalah Penelitian	Mengetahui apakah pemberian ekstrak kasar <i>Spirulina</i> sp berpengaruh terhadap ekspresi β -aktin sebagai penanda respon inducer anti inflamasi untuk VNN pada Ikan kerapu cantang (<i>Epinephelus</i> sp).
Tujuan Penelitian	Mengetahui manfaat ekstrak kasar <i>Spirulina</i> sp sebagai inducer β -aktin pada ikan kerapu cantang (<i>Epinephelus</i> sp) yang diinfeksi VNN.
Variabel Data dan Sumber Data	<ul style="list-style-type: none"> • variabel bebas adalah konsentrasi ekstrak kasar <i>Spirulina</i> sp • variabel terikatnya adalah organ pengamatan dan uji pengamatan (β-aktin)
Metode Pengumpulan Data	Ekperimental
Metode Analisis Data	PCR, RT-PCR, IHC dan ANOVA

4.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode eksperimental, dimana metode ini memungkinkan peneliti untuk memanipulasi variabel dan mencoba untuk mengetahui pengaruhnya. Penelitian eksperimen adalah penelitian yang berusaha mencari pengaruh variabel tertentu terhadap variabel

lain dengan kontrol yang ketat (Sedarmayanti dan Syarifudin, 2002). Sugiyono (2012) menambahkan bahwa penelitian eksperimen dapat diartikan sebagai metode penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap variabel lain dalam kondisi yang terkendali. Penelitian eksperimen menggunakan suatu percobaan yang dirancang secara khusus untuk mendapatkan data yang diperlukan dalam menjawab pertanyaan penelitian (Margono, 2005). Ketika melakukan eksperimen peneliti memanipulasi suatu stimulan, treatment atau kondisi-kondisi eksperimental, kemudian mengobservasi pengaruh yang diakibatkan oleh adanya perlakuan tersebut.

Ada dua karakteristik penting dalam metode eksperimen yaitu:

1. Variabel bebas, dalam hal ini ekstrak kasar *Spirulina* sp dan *viral nervous necrosis*, merupakan variabel yang dapat secara bebas ditentukan oleh peneliti dan dipertanggungjawabkan secara terbuka untuk memberikan dampak terhadap variabel terkait yaitu respon gen β -aktin pada ikan.
2. Observasi atau pengamatan secara langsung akan hasil atau efek yang diinginkan yaitu respon ekspresi gen β -aktin pada ikan setelah diberi ekstrak kasar *Spirulina* sp dan *viral nervous necrosis*.

4.4 Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

Mikroalga laut *Spirulina* sp dan ikan kerapu Cantang (*Epinephelus* sp) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Situbondo, untuk ukuran ikan yang digunakan yaitu sekitar $\pm 7-10$ cm.

Dalam penelitian ini ikan yang sehat akan diberi perlakuan menggunakan ekstrak kasar *Spirulina* sp dan ikan yang sehat juga akan diberi perlakuan dengan pemberian daging ikan yang sudah positif VNN. Penelitian ini dilakukan selama kurang lebih 30 hari. Pada hari terakhir penelitian (hari ke-15) dilakukan isolasi organ target yaitu mata. Ikan yang terserang VNN akan mengalami gejala seperti

kulit yang semakin menghitam, *whirling*, dan pergerakannya tidak beraturan. Hal ini terjadi karena rusaknya sistem saraf yang diakibatkan oleh virus ssRNA VNN sehingga menyebabkan dirinya tidak terkendali dan menyebabkan kematian.

4.5 Prosedur Pelaksanaan Penelitian

4.5.1 Persiapan Alat dan Bahan

Sebelum dilakukan penelitian terdapat beberapa rangkaian persiapan yang harus dilakukan, diantaranya persiapan alat dan bahan. Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian terdapat pada **Lampiran 1**.

4.5.2 Ekstraksi *Spirulina*

Ekstraksi merupakan proses pemisahan senyawa tertentu yang terdapat pada suatu bahan dengan bantuan pelarut. Pelarut yang digunakan harus sesuai dengan karakteristik senyawa yang diinginkan (Anam *et al.*, 2014). Pemilihan metode ekstraksi melalui proses maserasi karena mempunyai keuntungan lebih dibandingkan metode ekstraksi lainnya. Prinsip dasar ekstraksi yaitu melarutkan senyawa polar dalam pelarut polar dan senyawa non-polar dalam pelarut non-polar. Voight, (1994) juga menjelaskan bahwa proses ekstraksi ialah untuk mendapatkan senyawa yang diinginkan dari suatu bahan mentah dengan menggunakan pelarut sesuai kepolarannya.

Biomassa *Spirulina* sp yang digunakan yaitu dalam bentuk bubuk (kering). Penggunaan bahan dalam bentuk bubuk ini dikarenakan sudah tidak ada campuran lain seperti NaCl (garam) pada *Spirulina* sp (yang nantinya akan berpengaruh terhadap hasil maserasi), sehingga dalam proses ekstraksi sudah tidak ada kandungan garam di dalamnya dibandingkan dengan penggunaan *Spirulina* sp dalam bentuk basah karena masih banyak mengandung garam.

Spirulina sp dalam bentuk bubuk yang sudah kering dimaserasi menggunakan pelarut metanol PA selama 2x24 jam dengan perbandingan sampel terhadap

pelarut 1 : 3 (w/v). Setiap 1x24 jam dilakukan pengadukan atau pengocokan, kemudian setelah 2x24 jam disaring menggunakan kertas saring untuk menghilangkan ampasnya sehingga diperoleh ekstrak dengan pelarut. Selanjutnya untuk mendapatkan ekstrak, pelarut tersebut dihilangkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* dengan suhu 40 °C, kecepatan 60 rpm, dan tekanan 200 mBar sampai tidak ada lagi pelarut yang menetes (Adhianata, 2012).

4.5.3 Uji Fitokimia

Uji skrining fitokimia ini bertujuan untuk menentukan secara kualitatif ada atau tidaknya golongan senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai antioksidan. Pengujian yang dilakukan terkait fitokimia biasanya meliputi senyawa alkaloid, fenolik, triterpenoid, flavonoid, dan saponin (Mega dan Swastini 2010). Bintari dan Elyani (2017) menjelaskan prosedur untuk uji fitokimia yaitu :

- Identifikasi Flavonoid

Disiapkan 2 ml sampel ekstrak, ditambahkan 8 ml aquadest yang telah dipanaskan selama \pm 10 menit, filtrat disaring dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan HCL pekat beberapa tetes, ditambahkan sedikit serbuk Mg. Hasil positif : warna merah tua / merah muda.

- Identifikasi Alkaloid

Disiapkan 2 ml sampel ekstrak, ditambahkan 8 ml aquadest yang telah dipanaskan \pm 10 menit, filtrat disaring dan dimasukkan ke dalam tiga tabung reaksi. Ditambahkan 6 tetes Pereaksi Mayer pada tabung reaksi pertama, 6 tetes Pereaksi Dragendrof pada tabung reaksi kedua, dan 6 tetes Pereaksi Bouchardat pada tabung reaksi ketiga. Hasil positif : terdapat endapan putih Alkaloid dengan Pereaksi Mayer, terdapat endapan

jingga pada Alkaloid dengan Pereaksi Dragendrof, dan terdapat endapan cokelat pada Alkaloid dengan Pereaksi Bouchardat.

- Identifikasi Terpenoid

Disiapkan 2 ml sampel ekstrak, ditambahkan 8 ml aquadest yang telah dipanaskan selama \pm 10 menit, filtrat disaring dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan 3 tetes bouchardat. Hasil positif : warna hijau kebiruan mengandung Terpenoid jenis Steroid, warna orange atau jingga kecokelatan mengandung Terpenoid jenis Triterpenoid.

- Identifikasi Tanin

Disiapkan 2 ml sampel ekstrak, ditambahkan 8 ml aquadest yang telah dipanaskan selama \pm 10 menit, filtrat disaring dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan 3 tetes FeCl_3 1%. Hasil positif warna cokelat kehitaman, biru kehitaman, dan hijau kehitaman.

- Identifikasi Saponin

Disiapkan 2 ml sampel ekstrak, ditambahkan 8 ml aquadest yang telah dipanaskan selama \pm 10 menit, filtrat disaring dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan 2 ml air panas dan dikocok secara kuat. Hasil positif : terbentuk buih permanen selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm, ditambahkan HCL pekat 1 tetes, hasil positif : busa permanen tidak hilang.

4.5.4 Analisis Spektrofotometer UV-Vis (*Ultraviolet-Visible*)

Analisis spektrofotometer UV-Vis dilakukan dengan cara mengukur spektra panjang gelombang absorpsi radiasi ultra violet dari ekstrak *Spirulina* dengan spektrofotometer. Supernatan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada kisaran panjang gelombang 450-750 nm (penentuan spektra absorpsi) dan secara spesifik pada 562 nm, 620 nm, dan 652 nm (untuk

kandungan fikosianin, allofikosianin dan fikoeritrin). Sedangkan untuk pigmen non polar dari *Spirulina*, supernatan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada kisaran panjang gelombang 470-750 nm (penentuan spektra absorbansi) dan secara spesifik pada 470 nm dan 663 nm (untuk kandungan klorofil a dan karotenoid) (Sedjati *et al.*, 2012).

4.5.5 Analisis Spektrofotometer FTIR (*Fourier Transform Infra-Red*)

FTIR adalah salah satu metode yang paling banyak digunakan untuk mengidentifikasi unsur kimia dan menjelaskan struktur senyawa (Liu *et al.*, 2005).

Spektroskopi FTIR juga telah terbukti menjadi teknik yang ampuh untuk mempelajari makromolekul biologis dan sistem biologis kompleks seperti jaringan dan sel (Jackson dan Mantsch, 1996). Analisis FTIR ekstrak *Spirulina* mengacu pada Venkatesan *et al.*, (2012) yakni menggunakan analisis FTIR pada spektrum IR 4000 cm⁻¹-400 cm⁻¹.

4.5.6 Aklimatisasi Ikan Kerapu Cantang

Ikan uji yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ikan kerapu cantang (*Epinephelus* sp). Ikan kerapu cantang yang digunakan berukuran antara ± 7-10 cm yang didapat dari salah satu Hatchery di Kabupaten Situbondo. Benih ikan kerapu cantang yang baru datang tidak langsung diberikan pakan, karena memerlukan adaptasi terhadap media pemeliharaan yang baru. Kemudian ikan dipuasakan terlebih dahulu agar nafsu makannya terjaga. Pakan diberikan setelah ikan terlihat sehat dan agresif.

Pakan yang digunakan berupa ikan segar yang dicacah hingga ukurannya kecil dan disesuaikan dengan bukaan mulut ikan. Pemberian pakan dilakukan 2-3 hari setelah ikan pertama kali di masukkan pada media pemeliharaan. Pakan diberikan secara *adlibitum* yaitu pemberian pakan sedikit demi sedikit sampai ikan kenyang. Tujuan dari pemberian pakan secara *adlibitum* untuk menghindari

adanya pengendapan sisa pakan yang tidak dimakan pada dasar aquarium sehingga mengakibatkan aquarium akan mengalami penurunan kualitas air utamanya oksigen terlarut. Pemberian pakan dilakukan pada pukul 14.00 WIB. Selanjutnya pengukuran kualitas air dengan parameter suhu, salinitas, pH, dan DO dilakukan setiap sore hari selama pemeliharaan ikan.

4.5.7 Parameter Kualitas Air

Kualitas air merupakan mutu air yang memenuhi standar untuk tujuan tertentu. Syarat yang ditetapkan sebagai standar mutu air berbeda-beda tergantung tujuan penggunaan, sebagai contoh air yang digunakan untuk kelangsungan hidup ikan memiliki standar mutu yang berbeda dengan air untuk dikonsumsi. Kualitas air dapat diketahui nilainya dengan mengukur peubah fisika, kimia dan biologi (Rahayu, 2009).

Parameter kualitas air yang diukur dalam penelitian ini yaitu :

1. Suhu

Rahayu, (2009) menjelaskan bahwa alat yang digunakan dalam pengukuran suhu air adalah termometer standar. Langkah dalam pengukuran suhu adalah:

- Catat suhu udara sebelum mengukur suhu di dalam air.
- Masukkan termometer ke dalam air selama 1-2 menit.
- Baca suhu saat termometer masih di dalam air atau secepatnya setelah dikeluarkan dari dalam air.

2. Salinitas

Kordi (2002), menjelaskan pengukuran salinitas dilakukan dengan menggunakan alat refraktometer, adapun cara pengukuran salinitas adalah:

- Mengangkat penutup kaca prisma

- Meletakkan 1-2 tetes air yang akan diukur
- Menutup kembali dengan hati-hati agar jangan sampai terjadi gelembung udara dipermukaan kaca prisma
- Melihat kaca pengintai dan akan terlihat pada lensa nilai atau salinitas dari air yang sedang diukur
- Membersihkan permukaan prisma setelah selesai digunakan
- Melihat nilai salinitasnya dari air yang diukur melalui kaca pengintai.

3. Derajat Keasaman (pH)

Hartanti, (2008) menjelaskan bahwa pengukuran pH dapat dilakukan dengan menggunakan alat pH meter, adapun cara pengukuran pH adalah:

- Menstandarkan alat ukur (pH meter)
- Membilas elektroda (sensor) dengan aquades lalu mengeringkannya dengan menggunakan *tissue*
- Memasukkan ujung elektroda ke dalam perairan
- Mencatat nilai yang tertera pada alat

4. *Disolved Oxygen* (DO) / Oksigen Terlarut

Salmin, (2005) menjelaskan cara penentuan oksigen terlarut dengan metode elektrokimia adalah langsung untuk menentukan oksigen terlarut dengan alat DO meter prinsip kerjanya adalah:

- Menggunakan probe oksigen yang terdiri dari katoda dan anoda yang direndam dalam larutan elektrolit. Pada alat DO meter, probe ini biasanya menggunakan katode perak (Ag) dan anoda timbal (Pb) secara keseluruhan, elektroda ini dilapisi dengan membran plastik yang bersifat semi permeabel terhadap oksigen
- Probe yang menggunakan katoda perak (Ag) dan anoda timbal (Pb) dimasukkan kedalam sampel air

Ditunggu hasil yang ditunjukkan pada DO meter beserta nilai suhu yang ada.

4.5.8 Uji In-Vivo Ekstrak Kasar *Spirulina* sp Pada Ikan Kerapu Cantang

Pada penelitian ini dilakukan perlakuan in-vivo ekstrak kasar *Spirulina* sp pada ikan kerapu cantang. Proses pengujian dilakukan secara oral dan pemberian dosis mengacu pada Yanuhar (2011), yakni dengan penggunaan 33 µg/ml per 150 gram berat badan ikan, dan diencerkan sampai 1 ml. Pada penelitian yang akan dilakukan menggunakan dosis yang berbeda, yakni dengan pemberian dosis 17 µg/ml, 33 µg/ml, dan 50 µg/ml. Pemberian ekstrak dilakukan sebanyak 3 kali.

Pemberian ekstrak dilakukan pada hari ke-0, hari ke-5, dan hari ke-10. Selanjutnya pada hari terakhir pemeliharaan ikan atau hari ke-15 dilakukan isolasi organ target, yaitu organ mata.

4.5.9 Uji In-Vivo *Viral Nervous Necrosis* Pada Ikan Kerapu Cantang

Menyiapkan sampel ikan yang sudah positif terinfeksi VNN, kemudian untuk memastikan ikan terinfeksi virus, dilakukan pengujian terlebih dahulu yakni dengan uji RT-PCR (Tarsim *et al.*, 2013). Penginfeksi VNN pada ikan dilakukan dua kali, yakni dengan memberikan pakan daging ikan yang sudah positif terinfeksi VNN (Yanuhar dan Khumaidi, 2017). Infeksi VNN yaitu dilakukan pada hari ke-5 dan hari ke-10. Kemudian dilakukan pengamatan pada ikan, pengamatan ini bertujuan untuk melihat perubahan tingkah laku ikan dari normal sampai abnormal atau gejala spesifik seperti berenang yang tidak beraturan.

4.5.10 Prosedur Deteksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN)

- **Ekstraksi RNA (VNN)**

Pada penelitian ini ekstraksi RNA digunakan untuk mendapatkan virus RNA *viral nervous necrosis* pada organ target ikan kerapu cantang.

Organ target distribusi VNN pada benih ikan kerapu cangang yaitu organ mata. Tahapan berdasarkan (SNI 7546.1 : 2015) yaitu sebagai berikut :

- Mengisolasi organ target sebanyak 20-50 mg ke dalam mikrotube 1,5 ml.
- Menambahkan 500 μ l larutan kit RNA *extraction solution* (TRIzol®) ke dalam mikrotube, kemudian menggerus dengan pastel penggerus sampai halus, selanjutnya di diamkan pada suhu 25-30 °C selama 5 menit.
- Menambahkan 100 μ l kloroform dan vortex 15 detik kemudian menginkubasi pada suhu ruang 2-3 menit
- Mensentrifugasi pada kecepatan 12000 x g (12000 rpm r = 6 cm) selama 15 menit pada 4 °C
- Memindahkan 200 μ l supernatan ke dalam mikrotube baru dan tambahkan 200 μ l isopropanol, selanjutnya vortex selama 15 detik.
- Mensentrifugasi pada kecepatan 12000 x g selama 10 menit pada 4 °C.
- Kemudian supernatan dibuang, dan mencuci pelet dengan 500 μ l alkohol 75 %, mensentrifugasi selama 5 menit pada 4 °C dengan kecepatan 7500 x g, lalu membuang supernatant dan mengeringkan pellet RNA selama 5-10 menit.
- Melarutkan pellet RNA di dalam 200 μ l *nuclease free wáter* (DEPC ddH₂O).
- Apabila larutan RNA segera digunakan maka disimpan pada *deep freezer* suhu -20 °C, apabila digunakan dalam jangka waktu yang lama, maka disimpan pada suhu -80 °C.

• **Amplifikasi**

Pada penelitian ini untuk mendeteksi virus VNN menggunakan RT-PCR dan nested RT-PCR, adapun tahapannya yaitu :

1. RT-PCR

Setelah ekstraksi RNA, selanjutnya proses amplifikasi dengan urutan proses *reverse-transcriptase* PCR dilakukan menggunakan Access Quick-AMV® RT PCR (promega) diteruskan dengan *nested* RT-PCR menggunakan Go Taq® Green Master Mix (promega) dengan primer yang sama yaitu :

VNN adalah 2 set primer spesifik (Thiery *et al.*, 1999) yaitu :

- F2 : 5'-CGTGTCAGTCATGTGTCGCT-3'
- R3 : 5'-CGAGTCAACACGGGTGAAGA-3'
- NF2 : 5'-GTTCCCTGTACAACGATTCC-3'
- NR3 : 5'-GGATTTGACGGGGCTGCTA-3'

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

- Menyiapkan kontrol positif VNN dari contoh dan kontrol negatif atau *non template control*;
- Menyiapkan bahan untuk pendukung RT-PCR yaitu sebagai berikut

(Tabel 3).

Tabel 3. Susunan Bahan Amplifikasi Tahap I

No	Reagen RT - PCR	Volume (µl)	Konsentrasi Akhir
1	Nuclease free water	14,725	-
2	5x PCR Buffer	5,00	1 x
3	MgCl ₂ 25 mM	1,50	1,5 mM
4	dNTPmix (10 mM)	0,50	200 µM
5	Primer F2 (10 µM)	0,50	0,2 µM
6	Primer R3 10 µM)	0,50	0,2 µM
7	DNA Taq Polymerase 5 U/µl	0,125	0,625 U
8	RNase inhibitor (40 U/µl)	0,05	2 U
9	AMV Reverse transcriptase (10 U/µl)	0,10	1 U
10	RNA Template	2,00	0,4 ng - 4 ng
	Total	25	

- Menyebar bahan pada masing-masing mikrotube 0,2 ml dengan volume 23µl.
- Menambahkan *template* atau contoh uji RNA, termasuk kontrol positif dan kontrol negatif (ddH₂O), pada masing-masing tabung mikro sebanyak 2µl.
- Menghomogenkan dan memasukkan tabung mikro kedalam mesin PCR (*thermalcycler*).
- Mengoperasionalkan amplifikasi (Tabel 4).

Tabel 4. Kondisi Amplifikasi RT-PCR

No	Reaksi	Suhu (°C)	Waktu	Jumlah Siklus
1.	Inkubasi	45	30 menit	1
2.	Inaktivasi <i>Reverse-transcriptase</i>	94	2 menit	1
3.	Denaturasi	94	30 detik	40
4.	<i>Annealing</i>	60	30 detik	
5.	<i>Extention</i>	72	45 detik	
6.	<i>Final extention</i>	72	10 menit	1

2. Nested RT-PCR

- Menyiapkan reaksi PCR dengan komposisi (Tabel 5).

Tabel 5. Susunan Bahan Amplifikasi Tahap II

No	Reagen RT-PCR	Volume (µl)
1.	Master mix	12,5
2.	Primer NF2	1,0
3.	Primer NR3	1,0
4.	<i>Nuclease free water</i>	8,5
5.	DNA template (produk PCR)	2
Total		25

- Setelah semua bahan dicampur kecuali *template*, selanjutnya membagikan ke dalam tabung mikro 0,2 ml dengan volume masing-masing 23 µl.

- Menambahkan *template* atau contoh uji DNA, termasuk kontrol positif dan kontrol negatif (ddH₂O), pada masing-masing tabung mikro sebanyak 2 µl.
- Menghomogenkan dan memasukkkan tabung mikro kedalam mesin PCR (*thermalcycler*).
- Mengoperasionalkan amplifikasi tahap kedua (Tabel 6).

Tabel 6. Kondisi Amplifikasi nested RT-PCR

No	Reaksi	Suhu (°C)	Waktu	Jumlah Siklus
1.	Inkubasi	45	30 menit	1
2.	Inaktivasi <i>Reverse-transcriptase</i>	94	2 menit	1
3.	Denaturasi	94	30 detik	40
4.	<i>Annealing</i>	60	30 detik	
5.	<i>Extention</i>	72	40 detik	
6.	<i>Final extention</i>	72	10 menit	1

4.5.11 Prosedur Deteksi β-aktin

- **Ekstraksi DNA (β-aktin)**

Pada penelitian ini ekstraksi DNA digunakan untuk mendapatkan potongan DNA dari hasil ekspresi gen β-aktin pada organ mata. Tahapan ekstraksi DNA yaitu :

- Mengisolasi organ target sebanyak 20-50 mg ke dalam mikrotube 1,5 ml.
- Menambahkan 1000 µl (1 ml) larutan kit DNA *extraction solution* ke dalam mikrotube, selanjutnya menggerus dengan pastel penggerus sampai halus, kemudian di diamkan pada 25-30 °C selama 5-10 menit.
- Mensentrifugasi pada kecepatan 10000 x g (10000 rpm r = 6 cm) selama 10 menit pada suhu 4-25 °C.

- Memindahkan supernatan ke dalam mikrotube baru, menambahkan 500 μ l alkohol 100% per 1000 μ l pemakaian DNAzol, kemudian di vortex agar homogen. Selanjutnya menginkubasi pada suhu kamar 1-3 menit.
- Mensentrifugasi pada kecepatan 5000 x g pada 4-25 °C selama 5 menit.
- Membuang supernatan, kemudian mencuci pelet dengan 800-1000 μ l alkohol 75%, mensentrifugasi sebanyak 2x selama 1-2 menit pada suhu 4-25 °C dengan kecepatan 1000 x g, kemudian membuang supernatan dan mengeringkan pellet DNA selama 5-10 menit.
- Melarutkan pellet DNA di dalam 200-300 μ l *nuclease free water* (DEPC ddH₂O).
- Apabila larutan DNA segera digunakan maka disimpan pada *deep freezer* suhu -20 °C, apabila digunakan dalam jangka waktu yang lama, maka disimpan pada suhu -80 °C.

- **Amplifikasi**

- Menyiapkan sampel 10 μ l untuk analisis PCR.
- Menyiapkan tabung PCR 0.5 ml yang sudah steril. Jumlah tabung tergantung pada jumlah sampel.
- Kemudian memberi label pada setiap tabung PCR.
- Menambahkan DNA template sebanyak 3 μ l ke dalam masing-masing tabung PCR.
- Menambahkan Primer Forward dan Reverse sebanyak masing-masing 1 μ l ke dalam tabung PCR (kontrol internal digunakan gen beta aktin kerapu tikus dengan urutan basa mengacu pada Nuraini *et al.*, (2010).

Foward 5-ATGGTACGCAAAGGTGAGAAGAAATTG-3

Reverse 5-CTGGGAGATTCTCGACATACC-3.

- Menambahkan “master mix” sebanyak 5µl ke dalam masing-masing tabung PCR.
- Menambahkan Free water sebanyak 2 µl ke dalam masing-masing tabung PCR.
- Memasukkan tabung PCR ke *Thermal Cycler Mechine* dan jalankan mesin tersebut dengan START sesuai program yang diinginkan.

Tabel 7. Amplifikasi PCR β-aktin

No	Reaksi	Suhu	Waktu	Jumlah
1	Denaturasi	94	30 detik	35
2	<i>Annealing</i>	51	30 detik	
3	<i>Extention</i>	72	1 menit	
4	<i>Final extention</i>	72	10 menit	1

4.5.12 Elektroforesis

Elektroforesis adalah proses pemisahan DNA hasil amplifikasi berdasarkan berat molekul dalam medan listrik. Persiapan elektroforesis diawali dengan pembuatan larutan buffer elektroforesis dan gel agarose. Tahapan elektroforesis yaitu :

- Meletakkan gel yang sudah dicetak di atas *chamber* elektroforesis.
- Mengisi *chamber* dengan larutan bufer elektroforesis 1 x sampai gel terendam.
- Menyiapkan tabung mikro yang sudah diamplifikasi lalu tambahkan 5 µl 6x *loading dye* pada masing-masing tabung mikro, campur hingga homogen.
- Memasukkan 5 µl marker atau penanda DNA (100 bpDNA *ladder*).
- Memasukkan produk PCR yang sudah tercampur dengan *loading dye* dengan mikropipet ke dalam sumuran gel sebanyak 10 µl.

- Memasang tutup elektroforesis dan alirkan listrik dengan voltase diatur 100 V - 150 V selama 30 menit atau sampai pewarna biru-bromofenol mencapai 3/4 bagian panjang gel agarose.

- **Pengamatan hasil elektroforesis**

Tahapan pengamatan dan dokumentasi yaitu :

- Setelah selesai proses elektroforesis, gel diangkat dari *chamber*, selanjutnya melakukan pemeriksaan di bawah sinar ultra violet (*UV transillumination*).
- Mendiagnosa atau menginterpretasi dengan mengamati berat molekul band DNA sampel yang muncul dengan menggunakan pembanding DNA Marker
- Band DNA Kontrol positif VNN muncul pada posisi 294 bp. Sampel dinyatakan negatif VNN apabila pada hasil PCR tidak muncul band.
- Mengamati dan mendokumentasikan dengan foto.

4.5.13 Analisis Imunohistokimia (IHK)

Prosedur IHC mengacu pada metode Khan *et al.*, (2014) serta Yanuhar dan Khumaidi (2017) yaitu :

- Melakukan preparasi jaringan organ yang dipapar imunogenik.
- Melakukan deparafinasi preparat dengan xilol 20 μm selama \pm 5 menit.
- Melakukan dehidrasi dengan alkohol absolut sebanyak 2 kali ulangan pada konsentrasi 90%, 80% dan 70% masing-masing selama 5 menit.
- Preparasi dibilas dengan dionize water 20 μm sebanyak 3 kali ulangan, masing-masing 5 menit.
- Menyiapkan preparasi dalam refrigerator (*overnight*).
- Preparat dibilas dengan PBS pH 7,4 20 μm sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit.

- Preparat diinkubasi dengan H₂O₂ 3% selama 10 menit.
- Blocking *unspesific* protein dan inkubasi dalam 5% PBS dengan 1-2% BSA.
- Menyiapkan antibodi primer yang dilarutkan dalam larutan blotto dengan perbandingan 1:1000.
- Mencuci dengan antibodi primer Monoklonal Anti- β -aktin (AC-15), (1:1000) overnight 4 °C.
- Preparat kemudian dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit.
- Mengeringkan sisa-sisa PBS yang masih menempel dan menyiapkan antibodi sekunder yang dilarutkan dalam larutan blotto dengan perbandingan 1:200.
- Kemudian meneteskan preparat dengan larutan antibodi sekunder anti mouse conjugate pajotin dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang.
- Preparat dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit.
- Mengeringkan kembali sisa-sisa PBS yang masih menempel.
- Menginkubasi dalam SA-HRP dengan perbandingan 1:500 selama 40 menit.
- Preparat dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit.
- Menggunakan kromagen DAB selama 20 menit.
- Preparat dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit.
- Memberikan counterstain dengan majer *hemotoxilen* selama 10 menit.
- Preparat dibilas dengan DH₂O sebanyak 3 kali ulangan masing-masing selama 5 menit.

- Meringkakan kembali preparat dengan cara diangin-anginkan.
- Mengamati preparat hasil pewarnaan IHK dibawah mikroskop dengan perbesaran 40x.
- Mengambil gambar hasil IHK dengan menggunakan *olympus digital camera*.
- Mendapatkan hasil IHK.

4.6 Analisa Data

Analisa data pada penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 8 perlakuan dan 3 ulangan. Selanjutnya data dianalisa menggunakan cara statistik yaitu analisa keragaman (ANOVA), yang bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan pemberian perlakuan. Apabila dari analisa keragaman (sidik ragam) diketahui bahwa perlakuan menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata atau sangat berbeda nyata, maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) (Sastrosupadi, 2000). Selanjutnya analisis data dilakukan dengan program SPSS versi 16.

4.7 Matrik Variabel dan Jadwal Rencana Penelitian

Berikut ini merupakan variabel dan rencana jadwal kegiatan penelitian yang akan dilakukan (Tabel 8 dan Tabel 9).

Tabel 8. Matrik variabel penelitian

No	Tujuan Penelitian	Variabel (Parameter Uji)	Metode	Keterangan	Satuan
1	Analisa kandungan ekstrak <i>Spirulina sp</i>	- Residu - Filtrat	- Maserasi - Uji fitokimia - Uji UV-VIS - Uji FTIR	Untuk mengetahui kandungan senyawa bioaktif pada <i>Spirulina sp</i> apakah hasil uji kandungan mendapatkan hasil senyawa bioaktif yang sama	- Pasta (gram) - Filtrat (ml)
2	Manfaat ekstrak <i>Spirulina sp</i> pada	- VNN - β -aktin	- Uji Nested RT-PCR - Uji PCR - Uji IHK	-Diagnosa laboratorium ikan positif (+) VNN	- bp - DAB (%)

ikan kerapu cantang terhadap infeksi VNN				-Pengamatan gejala klinis benih ikan kerapu cantang pada media pemeliharaan -Diagnosa laboratorium pada organ target (β -aktin) serangan VNN yaitu mata dengan metode PCR
--	--	--	--	---

Dari hasil matrik variabel diatas, penulis merencanakan jadwal pelaksanaan penelitian dengan tahapan sebagai berikut :

Tabel 9. Jadwal Kegiatan

No	Kegiatan	Tahaun 2018						
		Januari	Februari	Maret	April	Mei	Juni	Juli
1	Penyusunan proposal							
2	Seminar kelayakan dan seminar proposal							
3	Penelitian Tahap 1							
4	Penelitian Tahap 2							
5	Analisis data							
6	Penyusunan laporan, seminar hasil, dan sidang tesis							

5. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Ekstrak dan Skrining Fitokimia *Spirulina* sp

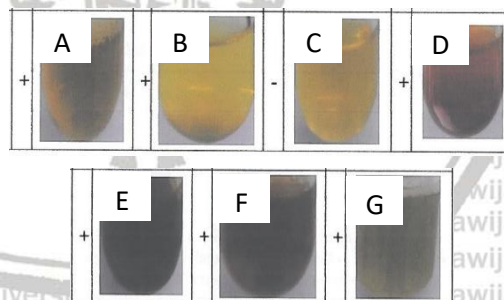
Hasil dari ekstraksi *Spirulina* sp didapatkan pasta sebanyak 20,2 gram.

Analisa persentase rendemen bisa dihitung berdasarkan perbandingan, yaitu berat ekstrak yg dihasilkan (berat akhir) dengan berat biomassa sel yang digunakan (berat awal), kemudian dikalikan 100% (Sani *et al.*, 2014). Hasil rendemen ekstrak *Spirulina* sp dengan pelarut metanol PA yaitu 6,7%.

Hasil uji fitokimia pada ekstrak kasar *Spirulina* sp terdapat pada **Tabel 10** dan **Gambar 15** dibawah ini :

Tabel 10. Hasil Skrining Fitokimia *Spirulina* sp.

Uji Fitokimia	Pereaksi	Hasil
Flavonoid	HCL Pekat + Mg	+
	Mayer	+
Alkaloid	Dragendrof	-
	Bouchardat	+
Terpenoid	Bouchardat	+
Tanin	FeCl ₃ 1%	+
Saponin	Air + HCL Pekat	+



Gambar 15. Hasil Uji Fitokimia (A) Uji flavonoid, (B) Uji alkaloid pereaksi mayer, (C) Uji alkaloid pereaksi dragendrof, (D) Uji alkaloid pereaksi bouchardat, (E) Uji terpenoid, (F) Uji tanin, dan (G) Uji saponin.

Hasil uji fitokimia ekstrak kasar *Spirulina* sp menunjukkan bahwa *Spirulina* sp memiliki kandungan senyawa aktif yang ditunjukkan dengan perubahan warna tertentu pada pereaksi spesifik. Uji flavonoid pada ekstrak kasar *Spirulina* sp menggunakan pereaksi HCL pekat + Mg menunjukkan adanya perubahan warna

larutan menjadi kemerahan, yang menyatakan bahwa *Spirulina* sp positif mengandung flavonoid. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Shalaby dan Shanab (2012), yang menyatakan bahwa indikasi warna merah muda tersebut mengandung flavonoid. Kandungan flavonoid dari ekstrak *Spirulina* memiliki aktivitas sebagai antioksidan (Wang *et al.*, 2007).

Uji alkaloid dengan pereaksi mayer menunjukkan adanya endapan pada larutan yang menyatakan bahwa *Spirulina* sp positif mengandung alkaloid. Hal yang sama juga ditunjukkan pada uji alkaloid dengan menggunakan pereaksi bouchardat menunjukkan hasil yang positif dengan adanya endapan berwarna coklat, namun pada uji alkaloid dengan menggunakan pereaksi dragendrof menunjukkan hasil yang berbeda yakni *Spirulina* sp tidak mengandung alkaloid. Hasil negatif yang terdapat pada uji alkaloid dengan pereaksi dragendrof dimungkinkan karena senyawa bioaktif jenis alkaloid pada ekstrak *Spirulina* sp tidak bisa berikatan dengan pereaksi dragendrof, sehingga menyebabkan hasil yang negatif, kandungan alkaloid pada ekstrak *Spirulina* memiliki aktivitas antioksidan seperti anticancer (Shanab *et al.*, 2012).

Uji terpenoid ekstrak kasar *Spirulina* sp dengan pereaksi bouchardat menunjukkan adanya endapan berwarna jingga kecokelatan yang berarti *Spirulina* sp positif mengandung terpenoid. Shanab *et al.*, (2012) menambahkan bahwa kandungan terpenoid dari ekstrak *Spirulina* tersebut dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan. Selain itu beberapa penelitian tentang kandungan flavonoid, alkaloid, dan terpenoid yang terdapat pada ekstrak kasar *Spirulina* sp memiliki berbagai aktivitas biologis seperti anticancer, antiproliferasi, dan antioksidan (Abad *et al.*, 2011).

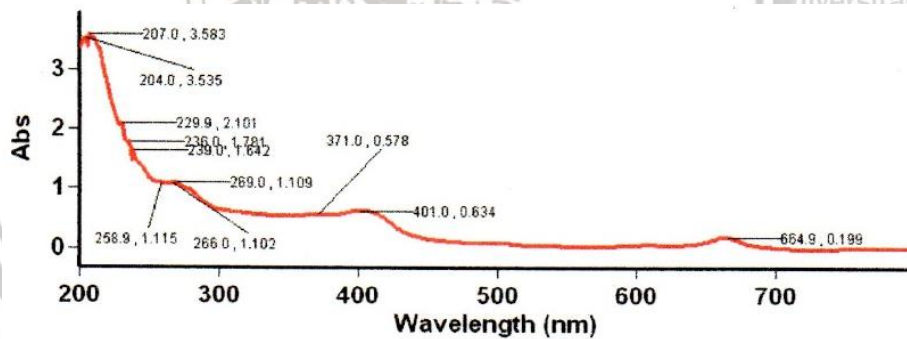
Uji tanin dengan pereaksi FeCl_3 1% juga menunjukkan hasil yang positif yakni ditunjukkan adanya perubahan warna menjadi coklat kehitaman, biru kehitaman, dan hijau kehitaman. Indikasi warna hijau kekuningan pada uji tanin

juga menandakan bahwa ekstrak tersebut positif mengandung tanin, kemudian senyawa tanin tersebut bisa dimanfaatkan sebagai antioksidan (Shalaby dan Shanab, 2012). Sedangkan uji saponin pada ekstrak kasar *Spirulina* sp dengan pereaksi Air + HCL pekat juga menunjukkan adanya busa permanen yang tidak hilang yang menunjukkan bahwa ekstrak kasar *Spirulina* sp positif mengandung saponin. Kandungan saponin pada ekstrak *Spirulina* dapat berpotensi sebagai antiradikal dan antioksidan (Shalaby dan Shanab, 2013).

5.2 Hasil Spektrofotometer Uv-Vis (*Ultraviolet-Visible*)

Hasil analisa spektrofotometer uv-vis menunjukkan bahwa ekstrak kasar *Spirulina* sp memiliki beberapa kandungan seperti klorofil a, flavonoid, alkaloid, terpenoid, dan saponin yang terdapat pada **Gambar 16**, sedangkan hasil panjang gelombang serta absorbansi uv-vis ekstrak kasar *Spirulina* sp dapat dilihat pada

Tabel 11.



Gambar 16. Hasil spektrofotometer uv-vis ekstrak *Spirulina* sp. Ket : nm (Panjang gelombang) dan abs (Absorbansi)

Tabel 11. Panjang gelombang (nm) dan Absorbansi spektrofotometer uv-vis ekstrak kasar *Spirulina* sp.

Panjang gelombang (nm)	Absorbansi	Keterangan
664,9	0,199	Klorofil a
401,0	0,634	Flavonoid
371,0	0,578	Flavonoid
269,0	1,109	Alkaloid
266,0	1,102	Alkaloid
258,9	1.115	Terpenoid
239,0	1.642	Terpenoid
236,0	1,781	Terpenoid
229,9	2,101	Terpenoid
207,0	3,583	Saponin
204,0	3,535	Saponin

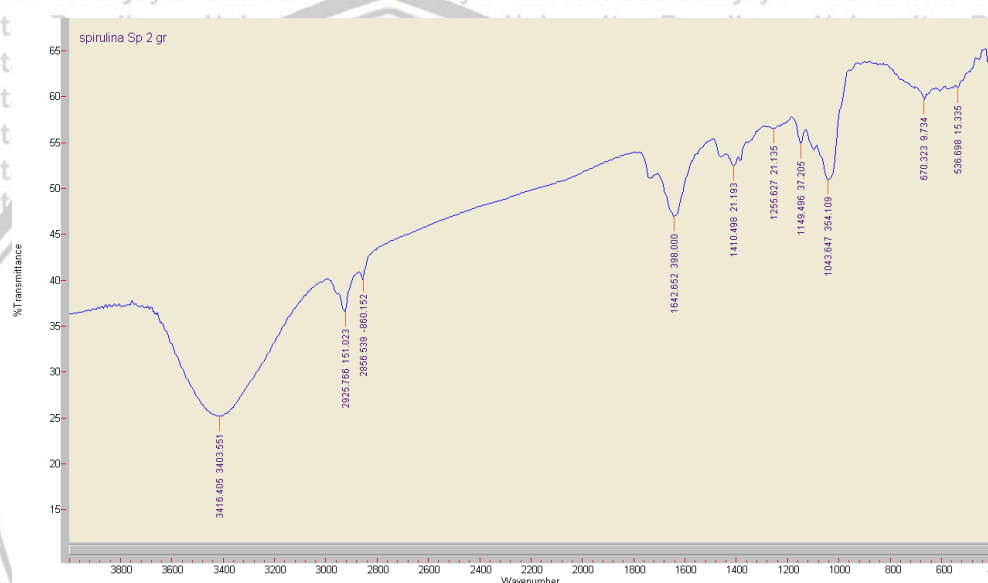
Hasil analisis spektrofotometer uv-vis (**Gambar 16** dan **Tabel 11**) terlihat bahwa panjang gelombang dari ekstrak kasar *Spirulina* sp dimulai dari 204,0 nm sampai dengan 664,9 nm. Panjang gelombang tertinggi yaitu 664,9 nm dengan absorbansi 0.199 menunjukkan *Spirulina* sp memiliki kandungan klorofil a. Beberapa penelitian seperti Prasanna *et al.*, (2010) dan Harun *et al.*, (2010) menjelaskan bahwa mikroalga *Spirulina* sp mengandung klorofil a. Selain itu pada panjang gelombang 401,0 nm dan 371,0 nm menunjukkan bahwa *Spirulina* sp mengandung senyawa flavonoid. Kandungan flavonoid tersebut memiliki aktivitas antioksidan sebagai penangkap radikal bebas (Cos *et al.*, 2001).

Spirulina sp juga mengandung senyawa aktif golongan alkaloid, yang dikonfirmasi pada panjang gelombang 269,0 nm dan 266,0 nm. Senyawa alkaloid tersebut memiliki kemampuan dalam meningkatkan aktivitas antioksidan (Khalaf *et al.*, 2007). Kandungan senyawa aktif dari golongan terpenoid yang paling banyak ditemukan, hal tersebut dapat dikonfirmasi pada panjang gelombang 258,9 nm, 239,0 nm, 236,0 nm, dan 229,9 nm dimana Simanjuntak (1995), menjelaskan bahwa senyawa jenis terpenoid yang dihasilkan oleh alga hijau memiliki aktivitas sebagai antimikroba, antiinflamasi, dan antivirus. Selain itu ekstrak kasar *Spirulina* sp juga mengandung senyawa aktif golongan saponin yang terdeteksi pada

panjang gelombang 207,0 dan 204,0. Kandungan senyawa aktif dari golongan saponin tersebut mempunyai aktivitas sebagai antioksidan (Agustini *et al.*, 2014).

5.3 Hasil Spektrofotometer FTIR (*Fourier Transform Infra-Red*)

Pada uji FT-R ekstrak kasar *Spirulina* sp menunjukkan 10 daerah frekuensi yang menunjukkan jenis ikatan dalam suatu senyawa, hasil uji FTIR ekstrak kasar *Spirulina* sp dapat dilihat pada **Gambar 17** dan panjang gelombang hasil uji FTIR ekstrak kasar *Spirulina* sp dapat dilihat pada **Tabel 12** dibawah ini.



Gambar 17. Hasil spektrofotometer Fourier Transform Infra Red (FTIR) ekstrak kasar *Spirulina* sp.

Tabel 12. Hasil Uji Fourier Transform Infra Red (FTIR) *Spirulina* sp

Panjang Gelombang	Gugus Fungsi
3416.405	Gugus O-H, N-H
2925.766	Gugus C-H, CH ₂ , CH ₃
2856.539	Gugus CH ₂ , O-H
1642.652	Fenol (O-H), N-H
1410.498	Gugus C-H
1255.627	Gugus C-H, Fenol (O-H)
1149.496	Gugus C-H
1034.647	Methyl benzenes (C-H)
670.323	Gugus C-H, O-H, N-H
536.698	Gugus C-H

Hasil pengujian spektrofotometer FTIR ekstrak kasar *Spirulina* sp ditemukan adanya 10 frekuensi. Frekuensi yang pertama pada panjang gelombang 3416.405 cm^{-1} menunjukkan adanya ikatan O-H dan N-H. Gugus C-H, CH_2 , dan CH_3 ditunjukkan pada panjang gelombang 2925.766 cm^{-1} . Gugus CH_2 dan O-H juga ditunjukkan pada frekuensi 2856.539 cm^{-1} . Pada frekuensi keempat yaitu 1642.652 cm^{-1} menunjukkan adanya fenol (O-H), dan gugus N-H. Gugus C-H ditemukan pada frekuensi 1410.498 cm^{-1} . Gugus C-H dan fenol (O-H) juga ditemukan pada frekuensi 1255.627 cm^{-1} . Pada frekuensi ke tujuh (1149.496 cm^{-1}) ditemukan gugus C-H, sedangkan pada frekuensi 1034.647 cm^{-1} ditunjukkan adanya Methyl benzenes (C-H). Pada frekuensi ke sembilan yaitu 670.323 cm^{-1} ditemukan juga gugus C-H, O-H, dan N-H. Sedangkan pada frekuensi terakhir (536.698 cm^{-1}) ditemukan juga adanya gugus C-H. Dari hasil analisa FTIR menunjukkan bahwa gugus C-H yang paling banyak ditemukan, gugus C-H tersebut merupakan golongan senyawa terpenoid yang dapat dimanfaatkan sebagai antivirus (Simanjuntak, 1995).

Dachriyanus, (2004) menjelaskan bahwa pada bilangan gelombang $3750-3000\text{ cm}^{-1}$ jenis ikatannya O-H dan N-H, pada bilangan gelombang $3000-2700\text{ cm}^{-1}$ jenis ikatannya $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$, C-H, dan C-H aldehyd, pada bilangan gelombang $2400-2100\text{ cm}^{-1}$ jenis ikatannya $-\text{C}\equiv\text{C}-$ dan $\text{C}\equiv\text{N}$, pada bilangan gelombang $1900-1650\text{ cm}^{-1}$ jenis ikatannya C=O (asam, aldehyd, keton, amida, ester, anhidrida), pada bilangan gelombang $1675-1500\text{ cm}^{-1}$ jenis ikatannya C=C (aromatik dan alifatik) dan C=N, pada bilangan gelombang $1475-1300\text{ cm}^{-1}$ jenis ikatannya C-H, sedangkan pada bilangan $1000-650\text{ cm}^{-1}$ jenis ikatannya yaitu C=C-H dan Ar-H.

Pada penelitian Cardoso *et al.*, (2012) tentang senyawa yang terdapat pada *Spirulina* dengan uji spektrum FTIR telah ditemukan beberapa frekuensi, diantaranya menunjukkan ikatan O-H yang bercampur dengan NH_2 pada panjang

gelombang 3370 cm^{-1} . Gugus dari kelompok CH_2 pada penelitian ini juga ditemukan, yakni pada panjang gelombang 2920 cm^{-1} dan 2859 cm^{-1} . Sedangkan pada panjang gelombang 1659 cm^{-1} dan 1535 cm^{-1} ditemukan adanya gugus dari kelompok NH_2 (Celekli *et al.*, 2009).

5.4 Aklimatisasi dan Uji In-vivo Ikan Kerapu Cantang

Sebelum dilakukannya uji in vivo pada ikan terlebih dahulu dilakukan aklimatisasi pada ikan kerapu cantang. Ikan uji untuk aklimatisasi pada stadia juvenil berukuran 10 cm dengan berat rata-rata 30 gr. Proses aklimatisasi berlangsung selama 2 sampai 3 hari setelah pemindahan pada media pemeliharaan. Selama proses aklimatisasi ikan tidak diberi makan dengan tujuan supaya adaptasi terlebih dahulu pada media pemeliharaan yang baru. Setelah proses aklimatisasi selesai atau setelah 3 hari berlangsung, ikan diberi pakan secara ad libitum dengan tujuan menghindari pakan yang tersisa atau yang tidak dimakan. Pemberian pakan menggunakan ikan rucah yang disesuaikan dengan bukaan mulut ikan. Pemberian pakan dilakukan sore hari yakni pada pukul 14.00 wib dan dilakukan juga pengukuran kualitas air dengan parameter suhu, salinitas, pH dan DO.



Gambar 18. Ikan kerapu cantang (Dokumentasi Pribadi, 2018)

Setelah proses aklimatisasi ikan selesai selanjutnya ialah tahap perlakuan atau tahap uji in-vivo ekstrak *Spirulina* sp pada ikan kerapu cantang dilakukan selama 15 hari. Ekstrak *Spirulina* sp diberikan dengan metode oral dengan proses sonde (Yanuhar, 2011). Pada ikan kontrol termasuk dalam kondisi normal karena ikan kontrol tidak diberi perlakuan, selain itu dilihat dari aktivitas berenang juga normal, warna tubuhnya tergolong cerah dan responsif terhadap pemberian pakan.

Ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp tidak terjadi perbedaan aktivitas pada ikan, namun warnanya sedikit berubah. Hal tersebut diindikasikan bahwa pemberian ekstrak *Spirulina* sp dengan proses sonde membuat ikan sedikit lebih stress. Rachmawati *et al.*, (2010) menjelaskan bahwa stress merupakan bentuk pertahanan hewan terhadap penyebab stress (stressor). Akan tetapi perlakuan dengan metode oral (sonde) memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan perlakuan lainnya seperti melalui suntik, karena akan mempengaruhi sistem imun ikan itu sendiri, bahkan ketika salah melakukan prosedur bisa menyebabkan kematian pada hewan coba.

Ikan dengan pemberian VNN terlihat adanya perubahan pada aktivitas berenang dan warna tubuh yang sedikit gelap. Yuwanita *et al.*, (2013) menambahkan bahwa ikan yang terinfeksi VNN akan menampakkan tingkah laku berenang yang tidak normal dan umumnya ikan berdiam di dasar. Sedangkan pada ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp dan penginfeksi VNN, keadaan ikan bisa dikatakan masih normal. Hal ini dapat dilihat dari keadaan ikan saat berenang masih dalam keadaan normal, warna tubuhnya yang sedikit putih keabu-abuan, walaupun sedikit mengalami permasalahan seperti kurang responsif terhadap pemberian pakan. Hal tersebut juga diperkuat dengan pernyataan Munday *et al.*, (2002) bahwa ikan yang terserang VNN menunjukkan perilaku

seperti kehilangan keseimbangan, dan terjadi perubahan warna kulit, biasanya sedikit menghitam.



Gambar 19. Gambaran ikan normal dan terinfeksi VNN. Ikan normal (warna tubuhnya cerah) (19a); ikan gejala VNN (warna tubuhnya gelap) (19b) (Dokumentasi Pribadi, 2018).

Dari hasil aklimatisasi dan uji in vivo pada ikan kerapu cantang untuk pengamatan tingkah laku pada ikan dapat dilihat pada **Tabel 13** dibawah ini :

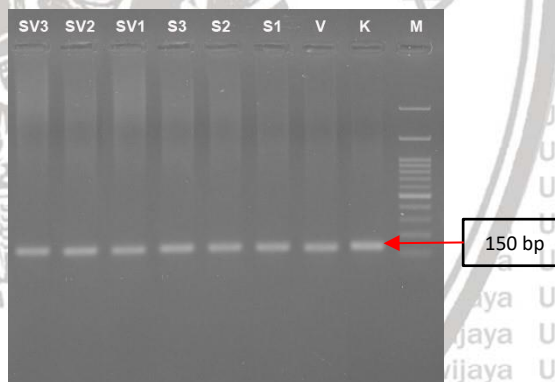
Tabel 13. Pengamatan gejala klinis pada ikan

No	Perlakuan	Gejala Klinis	Keterangan
1	Ikan kontrol	Normal	Aktivitas berenang juga normal, warna tubuhnya cerah dan responsif terhadap pemberian pakan.
2	Ikan dengan pemberian ekstrak <i>Spirulina</i> sp	Tergolong dalam keadaan normal.	Ikan sedikit lebih stress karena perlakuan pemberian ekstrak. Selain itu terjadi kematian satu ekor ikan (hari ke-11) pada perlakuan kode S2 (penambahan ekstrak 33 µg/ml) yang dimungkinkan ikan dalam keadaan stress
3	Ikan dengan penginfeksi VNN	Perubahan tingkah laku, berdiam diri di dasar tempat media pemeliharaan.	Indikasi adanya serangan VNN pada ikan kerapu cantang. Terjadi kematian serentak setelah penginfeksi VNN (satu ember berisi 5 ekor ikan) pada hari ke-6 atau setelah penginfeksi VNN
4	Ikan dengan pemberian ekstrak <i>Spirulina</i> sp kemudian diinfeksi VNN	Ikan dalam keadaan normal, namun sedikit kurang responsif terhadap pemberian pakan.	Pada perlakuan ini ikan tidak mengalami kematian, namun kurang sedikit responsif pada pemberian pakan yang dimungkinkan adanya efek dari penginfeksi VNN. Selain itu ikan yang sedikit mengalami cacat pada bagian mata, dapat mengalami penyembuhan setelah pemberian ekstrak <i>Spirulina</i> sp (perlakuan SV2)

5.5 Hasil Amplifikasi PCR β -aktin

PCR merupakan suatu metode atau suatu teknik yang sensitif dan dapat diaplikasikan dalam berbagai bidang diantaranya biologi molekuler, analisis forensic, diagnostic, dan lain-lain. Pada penelitian ini untuk mendeteksi profil band β -aktin menggunakan deteksi PCR. Aktin termasuk komponen penting dari sitoskeleton, beberapa peran aktin diantaranya untuk migrasi sel (Inagaki dan Katsuno, 2017), pembelahan serta penyusunan sel. β -aktin merupakan salah satu dari 3 bentuk aktin yang ada di dalam sel. β -aktin termasuk salah satu protein yang berperan penting dalam pengaturan mekanisme sistem kekebalan tubuh (Jönsson *et al.*, 2012), dan bertindak sebagai fasilitator dalam sel (*housekeeping gen*) (Lin dan Redies, 2012).

Berikut ini merupakan gambaran hasil elektroforesis uji PCR band β -aktin yang terdapat pada **Gambar 20** dibawah ini.



Gambar 20. Hasil elektroforesis band β -aktin 150 bp pada organ mata ikan kerapu cantang. Keterangan : (M) marker, (K) ikan kontrol tanpa perlakuan, (V) ikan dengan penginfeksian VNN, (S1) ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 17 $\mu\text{g/ml}$, (S2) ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 33 $\mu\text{g/ml}$, (S3) ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 50 $\mu\text{g/ml}$. Sedangkan (SV1) ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 17 $\mu\text{g/ml}$ dan penginfeksian VNN, (SV2) ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 33 $\mu\text{g/ml}$ dan penginfeksian VNN, (SV3) ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 50 $\mu\text{g/ml}$ dan penginfeksian VNN.

Hasil analisa band β -aktin pada **Gambar 20** diatas, positif terdeteksi band target β -aktin pada 8 sampel uji. Band β -aktin sesuai target yaitu pada 150 bp (panah merah) sampel organ mata ikan kerapu cantang. Hal tersebut sesuai pendapat Kruse *et al.*, (1997) yakni target skuens dari β -aktin berada pada panjang amplicon 150 bp. Analisa band β -aktin dari hasil uji PCR tidak memberikan perbedaan antar perlakuan, hal tersebut terjadi karena ekspresi β -aktin di dalam tubuh ikan akan tetap berlangsung walaupun ada atau tidaknya patogen (virus) yang menyerang tubuh ikan. Pada kondisi normal (tidak ada stressor) maupun kondisi ada stressor (infeksi VNN) dalam tubuh ikan akan tetap mengekspresikan β -aktin terkait dari sistem kerja actin remodeling (Hauser *et al.*, 2015).

Seberapa besar nilai kisaran intensitas band β -aktin pada hasil PCR yang terdapat pada **Gambar 20** dapat dikuantifikasi (semi kualitatif) menggunakan software imageJ, dan hasil kuantifikasi PCR β -aktin dapat dilihat pada **Gambar 21**. Band yang muncul pada uji PCR (β -aktin) merupakan hasil uji secara kualitatif. Band tersebut dapat diketahui berapa jumlahnya atau berapa nilai yang dihasilkan oleh band yang muncul dengan uji secara semi kuantitatif menggunakan software imageJ. Hasil kuantifikasi (semi kuantitatif) intensitas band β -aktin secara semi kualitatif dengan ImageJ menunjukkan bahwa jumlah nilai intensitas band hampir sama. Hasil intensitas tertinggi terdapat pada perlakuan (SV2) dengan intensitas 16659,7 atau sekitar 14,1%.

menunjukkan bahwa intensitas band cenderung rendah yakni sebesar 13518,6 atau sekitar 11,4%. Pada perlakuan (S) atau ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp juga menunjukkan ekspresi β -aktin dengan intensitas band sekitar 13%, akan tetapi prosentase intensitas band pada perlakuan (S) masih dibawah perlakuan (SV), hal ini terjadi karena pada perlakuan (S) tidak ada serangan VNN sehingga ekspresi β -aktin relatif lebih rendah. ImageJ sendiri merupakan salah satu software yang dapat dimanfaatkan untuk analisa suatu gambar dengan kode sumbernya tersedia secara terbuka dan penggunaannya bebas lisensi (Abramoff *et al.*, 2004).

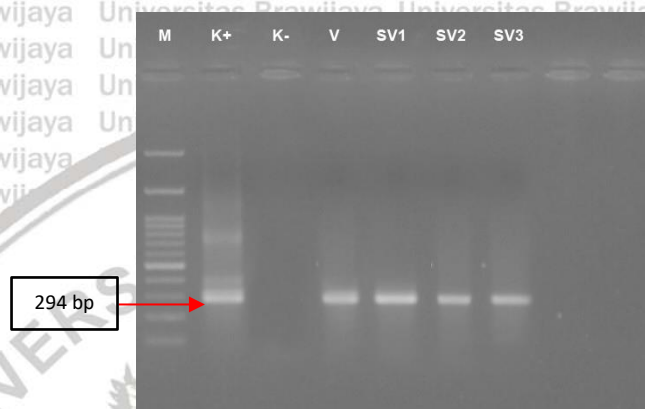
β -aktin di dalam sel bertindak sebagai fasilitator dengan cara memberi kekuatan mekanis dalam polarisasi sel dan merakit atau mengangkut molekul sehingga ekspresi β -aktin di dalam sel tetap berlangsung. Selain itu Linzer dan Nathans, (1983) juga menyatakan bahwa β -aktin termasuk salah satu gen yang dapat mentranskripsi kode yang mana digunakan sebagai dasar induksi untuk ekspresi gen. Selain itu β -aktin juga dapat diartikan sebagai senyawa kompleks dari dua molekul yang berbeda, yang memperluas antara molekul satu dengan molekul yang lain pada profilin (komponen membran yang dapat merangsang ekspresi gen) (Chik *et al.*, 1996).

5.6 Hasil Amplifikasi *nested* RT-PCR VNN

Virus merupakan nukleoprotein yang memperbanyak diri dalam sel dan dapat menyebabkan penyakit bahkan terjadi kematian. VNN menjadi salah satu masalah yang sampai saat ini belum bisa terpecahkan. VNN merupakan salah satu jenis virus ssRNA (nodaviridae) yang menginfeksi ikan pada masa juvenil (saat sistem imun belum terbentuk secara sempurna). VNN menyerang sistem saraf pada ikan terutama organ otak dan mata, serangan VNN menyebabkan retinopati dan ensefalopati (Yuasa *et al.*, 2000). Oleh karena itu untuk mendeteksi

profil band VNN menggunakan deteksi *nested* RT-PCR. Metode *nested* RT-PCR digunakan karena VNN merupakan jenis virus dari golongan *single strain* RNA (ssRNA) (King *et al.*, 2012), dengan demikian RNA akan ditranskrip ke cDNA untuk memperbanyak DNA virus tersebut.

Berikut ini merupakan gambaran hasil uji *nested* RT-PCR profil band VNN yang terdapat pada **Gambar 22** dibawah ini.



Gambar 22. Hasil elektroforesis band VNN 294 bp pada organ mata ikan kerapu cantang. Keterangan : (M) marker, (K+) positif terinfeksi VNN, (K-) negatif terinfeksi VNN, (V) ikan dengan penginfeksi VNN, (SV1) ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 17 μ g/ml dan penginfeksi VNN, (SV2) ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 33 μ g/ml dan penginfeksi VNN, (SV3) ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 50 μ g/ml dan penginfeksi VNN.

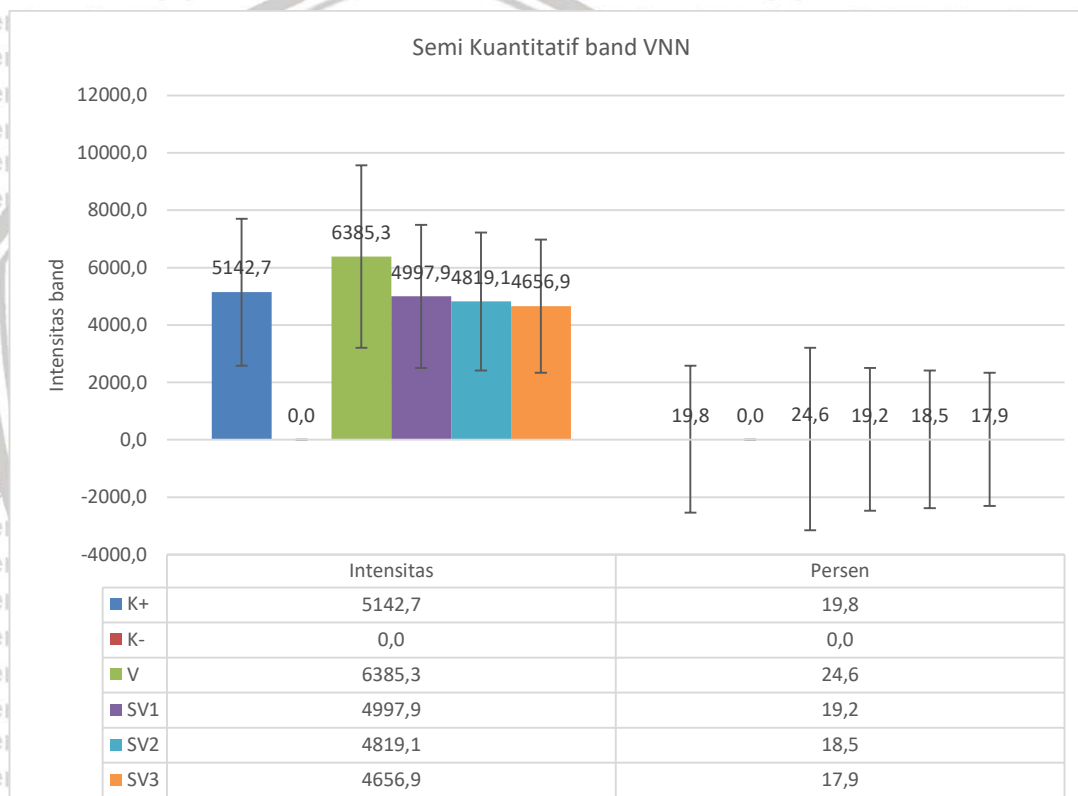
Hasil analisa band VNN pada **Gambar 22** diatas menunjukkan bahwa positif terdeteksi band target VNN pada 4 sampel uji yakni K+, SV1, SV2, dan SV3.

Band VNN sesuai target yaitu pada kisaran 294 bp (panah merah) sampel organ mata ikan kerapu cantang. Analisa band VNN dari hasil uji *nested* RT-PCR tidak memberikan perbedaan antar perlakuan. Dari keempat sampel yang diuji

semuanya positif terinfeksi VNN ditunjukkan dengan munculnya band yang terdapat pada hasil elektroforesis (294 bp). Hal tersebut sesuai pendapat Liu *et al.*, (2015) yakni target skuens dari VNN untuk uji *nested* RT-PCR berada pada panjang amplicon dengan kisaran 294 bp. Selain itu dasar penggunaan metode *nested* RT-PCR untuk uji diagnostig VNN dipilih karena spesifisitas, sensitivitas,

sedikit tenaga kerja, sedikit waktu dan biaya dibandingkan dengan metode RT-PCR standar (Valle *et al.*, 2000).

Seberapa besar nilai kisaran intensitas band VNN pada hasil nested RT-PCR yang terdapat pada **Gambar 22** dapat dikuantifikasi (semi kualitatif) menggunakan software imageJ. Metode analisis citra atau imageJ merupakan suatu alat kuantitatif dan dapat digunakan untuk menganalisis data mikroskopi fluoresensi (Hartig, 2013). Hasil kuantifikasi dapat dilihat pada **Gambar 23** dibawah ini.



Gambar 23. Hasil semi kuantitatif band VNN. Keterangan : (M) marker, (K+) positif terinfeksi VNN, (K-) negatif terinfeksi VNN, (V) ikan dengan penginfeksian VNN, (SV1) ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 17 µg/ml dan penginfeksian VNN, (SV2) ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 33 µg/ml dan penginfeksian VNN, (SV3) ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 50 µg/ml dan penginfeksian VNN.

































Band yang muncul pada uji nested RT-PCR (VNN) merupakan hasil uji secara kualitatif. Band tersebut dapat diketahui berapa jumlahnya atau berapa nilai yang dihasilkan oleh band yang muncul dengan uji secara semi kuantitatif menggunakan software imageJ. Hasil nested RT-PCR yang didapatkan secara semi kuantitatif mampu memberikan interpretasi data walaupun data tersebut masih belum seakurat dengan hasil yang kuantitatif. Hasil kuantifikasi secara semi kualitatif intensitas band VNN dengan ImageJ menunjukkan bahwa intensitas band VNN (K+) sebesar 5142,69 atau sekitar 19,778 %. Pada (K-) tidak adanya intensitas band atau dengan kata lain nilainya 0. Pada perlakuan (V) intensitas band VNN naik menjadi 6385,296 atau setara dengan 24,557%. Kemudian hasil intensitas band VNN menurun pada perlakuan (SV1, SV2, dan SV3). Penurunan ini dikarenakan penggunaan ekstrak kasar *Spirulina* sp mampu menekan replikasi dari VNN, sehingga menunjukkan hasil intensitas band VNN yang lebih rendah. Beberapa kandungan senyawa bioaktif seperti alkaloid dan terpenoid yang terdapat pada ekstrak *Spirulina* sp dapat dimanfaatkan sebagai anticancer, antiproliferasi, dan antioksidan (Shanab *et al.*, 2012; Abad *et al.*, 2011), sehingga ekstrak *Spirulina* sp mampu memodulasi actin untuk remodeling actin serta berpengaruh terhadap ekspresi β -aktin dan mampu menekan replikasi VNN.

5.7 Respon Imunologi Hasil Uji In vivo Pada Organ Mata Ikan Kerapu Cantang

Respon imunologi merupakan respon tentang urutan suatu kejadian yang terjadi di dalam tubuh terhadap adanya antigen. Patogen atau virus akan masuk ke dalam tubuh melalui jaringan mukosa (insang, kulit, dan usus), kemudian akan dihambat atau diblokir oleh hambatan fisik seperti lendir, sisik, dan epitel yang mengandung lysozime/Igs, ketika patogen berhasil masuk ke dalam sel maka akan dihambat oleh respon seluler bawaan (*innate*). *Innate* tersebut aktif karena dipicu oleh reseptor pengenalan seperti PRRs dan PAMPs, kemudian disisi lain akan

terjadi proses presentasi antigenik oleh MHC pada jaringan limfoid (Castro dan Tafalla, 2015). Hasil respon imunologi pada organ mata ikan kerapu cantang dapat dilihat pada **Tabel 14**, dan secara lebih lengkap dapat dilihat pada **Lampiran 2**.

Tabel 14. Hasil rata-rata respon imunologis pada ikan kerapu cantang

Perlakuan	Jumlah rata-rata respon imunologis							
	Eritrosit		Neutrofil		Basofil		Platelet	
	Jumlah	Gambar	Jumlah	Gambar	Jumlah	Gambar	Jumlah	Gambar
K	22		23		16		9	
V	30		35		21		38	
S1	18		13		4		4	
S2	24		17		8		4	
S3	8		6		5		3	
SV1	23		28		8		7	
SV2	30		37		8		11	
SV3	28		33		13		19	

Ket: Gambar sel dan hasil rata-rata respon imunologis pada jaringan mata ikan kerapu cantang.

(K) ikan kontrol tanpa perlakuan,

(V) ikan dengan penginfeksian VNN

(S1) ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 17 µg/ml

(S2) ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 33 µg/ml

(S3) ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 50 µg/ml

(SV1) ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 17 µg/ml dan VNN

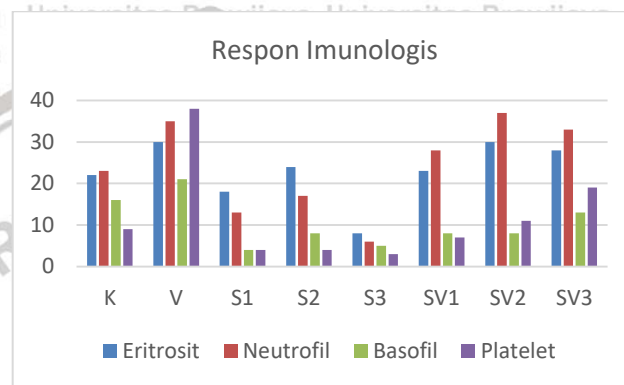
(SV2) ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 33 µg/ml dan VNN

(SV3) ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 50 µg/ml dan VNN

Hasil respon imunologis ditinjau dari jumlah rata-rata eritrosit tertinggi terdapat pada perlakuan (V) dan (SV2) dengan jumlah 30 mm² sedangkan rata-rata terendah terdapat pada perlakuan (K) dengan jumlah 22 mm² dan pada perlakuan (S3) dengan jumlah 8 mm². Ditinjau dari jumlah rata-rata neutrofil tertinggi terdapat pada perlakuan (SV2) dengan jumlah rata-rata 37 mm² sedangkan rata-rata terendah terdapat pada perlakuan (S3) dengan rata-rata 8 mm². Ditinjau dari jumlah basofil rata-rata tertinggi terdapat pada perlakuan (V) dengan jumlah 21 mm², sedangkan nilai rata-rata terendah terdapat pada

perlakuan (S1) dengan jumlah 4 mm². Ditinjau dari jumlah platelet nilai rata-rata tertinggi dari semua perlakuan terdapat pada perlakuan (V) dengan jumlah 38 mm², sedangkan nilai rata-rata terendah terdapat pada perlakuan (S3) dengan jumlah rata-rata 3mm².

Setelah diketahui nilai rata-rata respon imunologis pada organ mata ikan kerapu cantang, kemudian grafik perubahan respon imunologis pada ikan kerapu cantang dapat dilihat pada **Gambar 24** dibawah ini.



Gambar 24. Hasil rata-rata respon imunologis pada jaringan mata ikan kerapu cantang. Ket : (K) ikan kontrol tanpa perlakuan, (V) ikan dengan penginfeksi VNN, (S1) ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 17 µg/ml, (S2) ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 33 µg/ml, (S3) ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 50 µg/ml. Sedangkan (SV1) ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 17 µg/ml dan penginfeksi VNN, (SV2) ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 33 µg/ml dan penginfeksi VNN, (SV3) ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 50 µg/ml dan penginfeksi VNN.

Pada hasil pengamatan respon imunologis **Gambar 24** menunjukkan beberapa perbedaan antar perlakuan. Respon tertinggi terdapat pada perlakuan (V) dikarenakan sel merespon adanya VNN yang masuk ke dalam tubuh ikan, dengan demikian sel berupaya untuk mempertahankan diri dengan memberi respon terhadap VNN. Salah satu respon yang ditunjukkan yaitu tingginya jumlah neutrofil dan platelet, dimana neutrofil dan platelet berperan penting untuk hemostatis dalam tubuh (mencegah kehilangan darah ketika terjadi pecah pada

pembuluh darah), disamping itu platelet juga mampu untuk membentuk bekuan darah (Guyton & Hall, 1997).

Selanjutnya respon yang tinggi juga ditunjukkan pada perlakuan (SV), akan tetapi pada perlakuan ini responnya lebih rendah daripada perlakuan (K). Hal ini terjadi karena pada perlakuan (SV) sudah diberikan ekstrak *Spirulina* sp terlebih dahulu, yang berperan sebagai inducer β -aktin dalam peningkatan sistem imun.

Hasil respon imunologis yang terendah terdapat pada perlakuan (S) atau dengan penambahan ekstrak *Spirulina* sp. Pada perlakuan (S) respon imunologis termasuk dalam kategori rendah dibandingkan perlakuan lainnya karena antigen yang masuk pada sel bersifat tidak berbahaya, akan tetapi sel tetap respon adanya antigen. Salah satu bentuk respon imunologis yaitu jumlah eritrosit. Eritrosit dapat menggambarkan status kesehatan pada organisme dan mempunyai fungsi penting dalam pengaturan fisiologis tubuh yaitu sebagai transportasi komponen di dalam tubuh seperti nutrisi, oksigen, dan sistem imun.

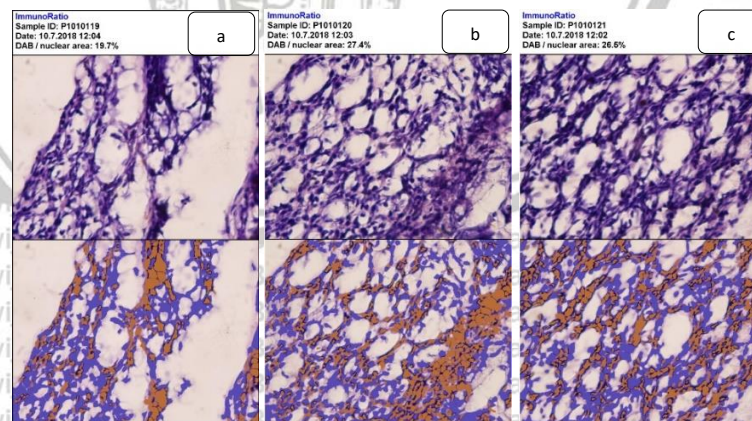
Hasil pengamatan eritrosit dari semua perlakuan menunjukkan rata-rata yang tinggi, kecuali jumlah eritrosit yang terdapat pada perlakuan (S3) menunjukkan hasil yang rendah. Banyaknya jumlah eritrosit dalam suatu perlakuan mengindikasikan bahwa ikan dalam keadaan normal atau dapat dikatakan dalam penyesuaian kondisi fisiologis terhadap lingkungan (Ravichandra, 2012), sedangkan eritrosit dalam jumlah yang sedikit mengindikasikan ikan dalam keadaan sakit atau anemia (Robert, 1978). Salah satu kondisi lingkungan yang dapat mempengaruhi jumlah eritrosit adalah suhu (Docan *et al.*, 2011). Jumlah eritrosit akan meningkat seiring dengan meningkatnya suhu, hal itu terjadi karena peningkatan suhu akan meningkatkan aktivitas penyerapan oksigen oleh eritrosit (Bozorgnia *et al.*, 2011).

5.8 Ekspresi β -aktin Pada Organ Mata Ikan Kerapu Cantang

Profil β -aktin dapat diketahui dengan menggunakan metode Imunohistokimia (IHK). Metode imunohistokimia banyak digunakan dalam penelitian maupun praktek klinis. Imunohistokimia mampu menggambarkan komponen sel, seperti protein atau makromolekul lainnya pada sampel jaringan. Metode imunohistokimia secara konseptual sangat sederhana, selain itu metode imunohistokimia banyak yang menggunakan karena sensitifitas dan spesifitasnya (Ramos-Vara, 2005). Sedangkan untuk teknik analisa yang biasa digunakan dalam IHK yaitu dengan menggunakan analisa ImmunoRatio (IR) (Tuominen *et al.*, 2010).

5.8.1 Perlakuan K

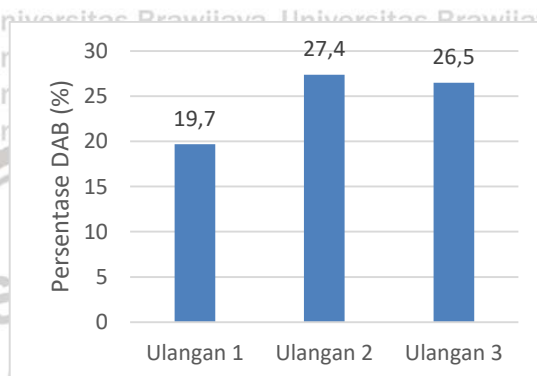
Perlakuan K merupakan ikan kontrol atau ikan tanpa adanya perlakuan, dan digunakan sebagai pembandingan dari perlakuan yang akan digunakan. Ekspresi β -aktin juga diamati pada organ mata ikan kontrol. Hasil analisa ekspresi β -aktin organ mata pada ikan kontrol menggambarkan sel atau jaringan yang normal dan tidak terjadi kerusakan, dapat dilihat pada (**Gambar 25**) dibawah ini.



Gambar 25. Hasil Immunoratio Organ Mata Ikan Kontrol. (a) ulangan 1, (b) ulangan 2, dan (c) ulangan 3.

β -aktin merupakan salah satu protein yang berperan penting di dalam sel (Jönsson *et al.*, 2012) terutama dalam sistem kekebalan, dan dianggap sebagai

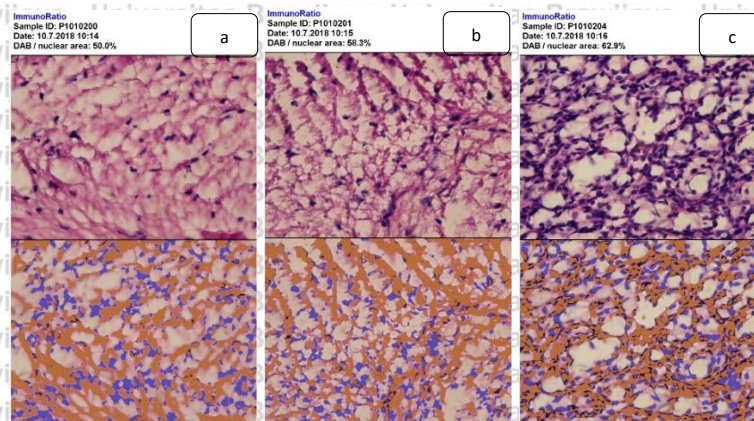
gen pengatur sel internal (Pollard dan Cooper, 2009). Hasil analisa ImmuoRatio menunjukkan nilai DAB 19,7% (Gambar 25a), DAB 27,4% (Gambar 25b), dan DAB 26,5% (Gambar 25c). Persentase nilai DAB ikan kontrol menunjukkan rata-rata 24,5% yang berarti bahwa terdeteksinya gen target yaitu β -aktin, yang ditandai dengan adanya warna kuning kecokelatan pada hasil IR. Grafik persentase DAB β -aktin perlakuan K dapat dilihat pada gambar 26 dibawah ini.



Gambar 26. Grafik data persentase DAB perlakuan K (tanpa ada perlakuan).

5.8.2 Perlakuan S1

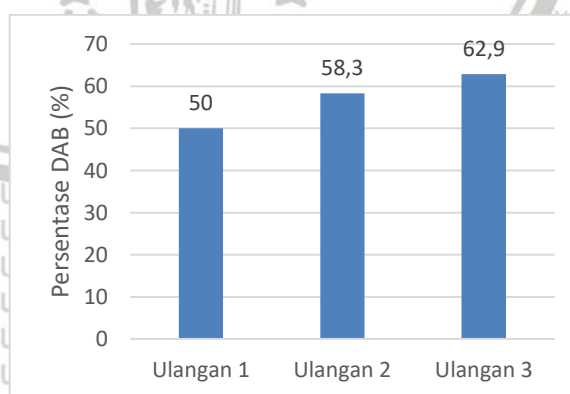
Perlakuan S1 merupakan perlakuan ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 17 $\mu\text{g/ml}$. *Spirulina* sp merupakan salah satu jenis mikroalga laut dan memiliki kandungan yang lengkap salah satunya kandungan senyawa aktif biologis seperti pigmen (Bhat & Madyastha, 2000). Kandungan vitamin A pada *Spirulina* sp juga dapat dimanfaatkan untuk peningkatan sistem kekebalan tubuh pada ikan (Kim *et al.*, 2008). Perlakuan ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* berbeda dengan perlakuan ikan kontrol serta perlakuan ikan dengan penginfeksi VNN. Berikut ini merupakan hasil analisa ImmuoRatio ekspresi β -aktin pada ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 17 $\mu\text{g/ml}$ yang terdapat pada **Gambar 27**.



Gambar 27. Hasil ImmunoRatio ekspresi β -aktin ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 17 μ g/ml. (a) ulangan 1, (b) ulangan 2, dan (c) ulangan 3.

Hasil analisa ImmuoRatio ekspresi β -aktin ikan kerapu cantang dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 17 μ g/ml menunjukkan nilai DAB sebesar 50% (Gambar 27a), DAB ikan kedua 58,3% (Gambar 27b), dan DAB ikan ketiga 62,9% (Gambar 27c). Persentase nilai DAB ikan kontrol tersebut menunjukkan bahwa nilai rata-rata 57% terdeteksi gen target yaitu β -aktin. Pada perlakuan ini memberikan hasil yang berbeda dengan perlakuan K, hal tersebut dapat dilihat pada perubahan ekspresi β -aktin dengan meningkatnya prosentase nilai DAB (%).

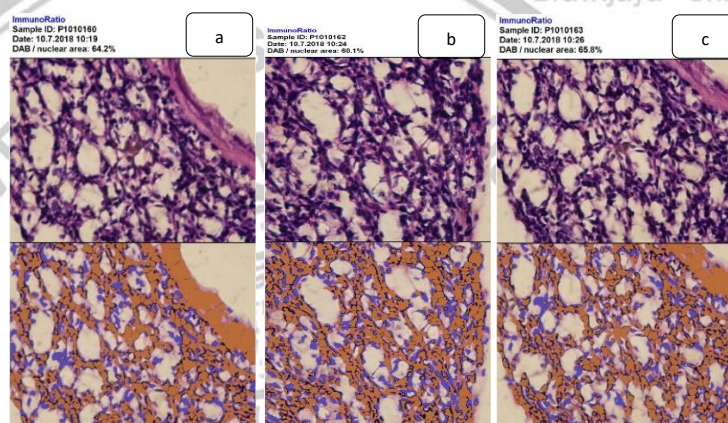
Grafik persentase DAB β -aktin perlakuan S1 dapat dilihat pada gambar 28 dibawah ini.



Gambar 28. Grafik data persentase DAB perlakuan S1 (perlakuan ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 17 μ g/ml)

5.8.3 Perlakuan S2

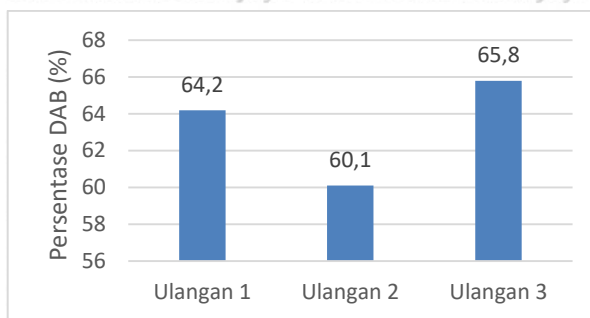
Perlakuan S2 merupakan ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 33 µg/ml. Hasil analisa ImmuoRatio ekspresi β-aktin ikan kerapu cantang dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 33 µg/ml menunjukkan prosentase nilai DAB pada ikan kerapu cantang sebesar 64,2% (Gambar 29a), DAB ikan kedua 60,1% (Gambar 29b), dan DAB ikan ketiga 65,8% (Gambar 29c). Persentase nilai DAB ikan kontrol tersebut menunjukkan bahwa nilai rata-rata 63,3% terdeteksi gen target yaitu β-aktin. Hasil analisa ImmunoRatio dapat dilihat pada **Gambar 29** dibawah ini.



Gambar 29. Hasil ImmunoRatio ekspresi β-aktin ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 33 µg/ml. (a) ulangan 1, (b) ulangan 2, dan (c) ulangan 3.

Dari hasil imunoratio dapat diamati prosentase nilai DAB β-aktin mengalami peningkatan, namun peningkatan ini tidak berbeda jauh dengan perlakuan S1. Peningkatan ekspresi β-aktin ini mengindikasikan bahwa tubuh merespon atau menerima adanya antigen untuk menjadi imunomodulator. Pemberian ekstrak *Spirulina* sp yang bertindak sebagai modulator mampu meningkatkan prosentase nilai ekspresi β-aktin, hal ini dikarenakan *Spirulina* sp termasuk bahan alami yang bermanfaat dalam bidang kesehatan, selain itu didukung juga dengan penelitian Yanuhar (2015) yang menyatakan bahwa pemanfaatan fragmen pigmen protein dari *N. oculata* dapat meningkatkan sistem

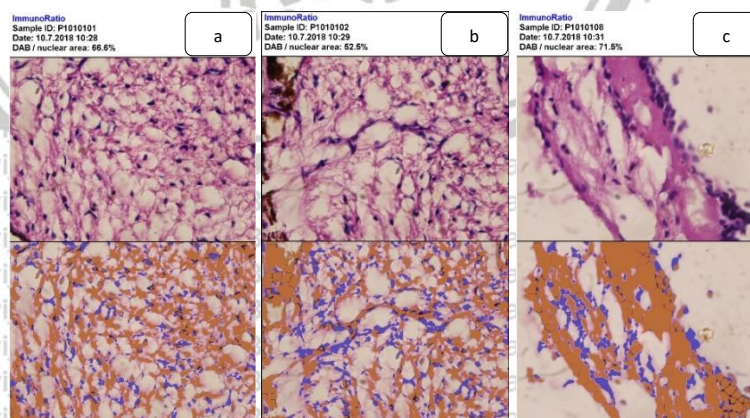
kekebalan pada *C. altivelis*. Selanjutnya grafik prosentase nilai DAB β -aktin perlakuan S2 dapat dilihat pada gambar 30 dibawah ini.



Gambar 30. Grafik data persentase DAB perlakuan S2 (perlakuan ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 33 μ g/ml).

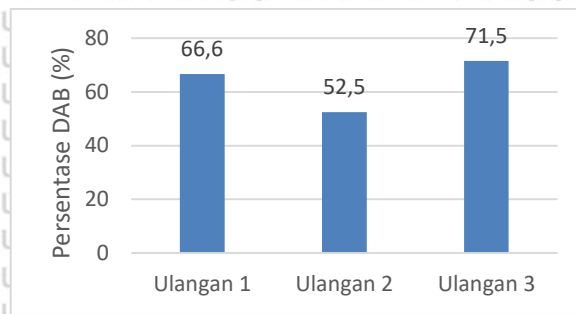
5.8.4 Perlakuan S3

Perlakuan S3 merupakan perlakuan ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 50 μ g/ml. Hasil analisa ImmunoRatio ekspresi β -aktin ikan kerapu cantang dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 50 μ g/ml menunjukkan nilai DAB ikan sebesar 66,6% (Gambar 31a), DAB ikan kedua 52,5% (Gambar 31b), dan DAB ikan ketiga 71,5% (Gambar 31c). Persentase nilai DAB ikan kontrol tersebut menunjukkan bahwa nilai rata-rata 63,5% yang berarti bahwa terdeteksi gen target yaitu β -aktin. Hasil analisa ImmunoRatio dapat dilihat pada **Gambar 31** dibawah ini.



Gambar 31. Hasil ImmunoRatio ekspresi β -aktin ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 50 μ g/ml. (a) ulangan 1, (b) ulangan 2, dan (c) ulangan 3.

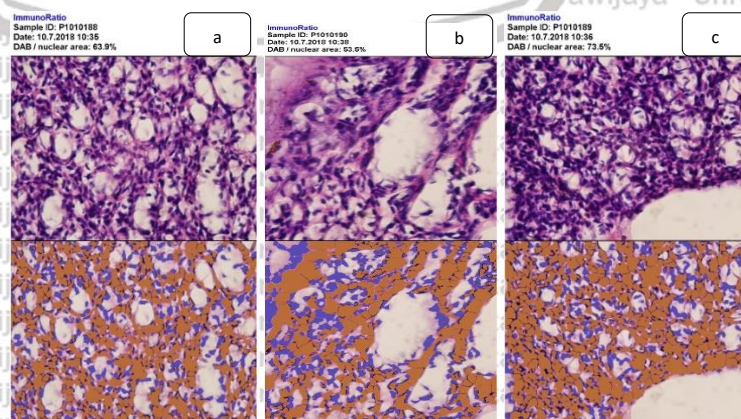
Selanjutnya grafik persentase DAB β -aktin pada perlakuan S3 dapat dilihat pada gambar 32 dibawah ini.



Gambar 32. Grafik data persentase DAB perlakuan S3 (perlakuan ikan dengan pemberian ekstrak Spirulina sp 50 μ g/ml).

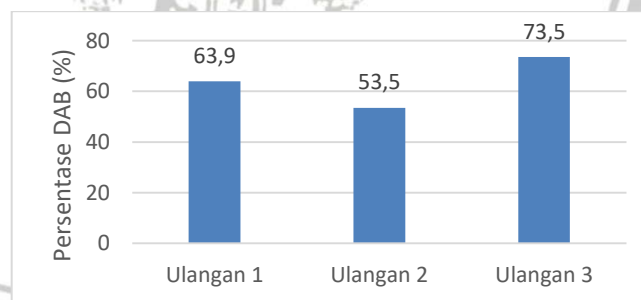
5.8.5 Perlakuan V

Perlakuan V merupakan ikan perlakuan dengan penginfeksi VNN. Virus merupakan kendala utama dalam proses budidaya, terutama pada budidaya ikan kerapu. Akibat dari serangan virus ini dapat menyebabkan kematian mencapai 80% hingga 100% (Yanuhar *et al.*, 2012). Serangan VNN juga dapat menyebabkan kerusakan pada sel seperti terjadinya vakuolasi, nekrosis, dan apoptosis. Infeksi VNN dapat mempengaruhi sistem kerja sel, salah satunya peran β -aktin dalam sel. VNN merupakan nodavirus dan termasuk salah satu jenis virus dari golongan ssRNA+ (King *et al.*, 2012). Berikut ini merupakan hasil analisa ImmunoRatio ekspresi β -aktin pada organ mata ikan kerapu cantang yang diinfeksi VNN.



Gambar 33. Hasil ImmunoRatio organ mata ikan yang terinfeksi VNN. (a) ulangan 1, (b) ulangan 2, dan (c) ulangan 3.

Hasil analisa ImmuoRatio menunjukkan prosentase nilai DAB ikan positif terinfeksi VNN sebesar 63,9% (Gambar 33a), DAB ikan kedua 53,5% (Gambar 33b), dan DAB ikan ketiga 73,5% (Gambar 33c). Prosentase nilai DAB ikan positif VNN tersebut menunjukkan bahwa nilai rata-rata 63,6% terdeteksi gen target yaitu β -aktin, yang ditandai dengan adanya warna kuning kecokelatan pada hasil IR. Infeksi VNN dapat mempengaruhi sistem kerja dalam sel, salah satunya peran dan fungsi β -aktin di dalam sel. Infeksi VNN akan berpengaruh terhadap proliferasi aktin dan myosin, selain itu infeksi VNN dapat memberikan dampak kerusakan pada sel bahkan menyebabkan kematian. Salah satu gejala yang tampak ketika ikan positif terinfeksi VNN yaitu berenang berputar-putar, warna tubuh semakin gelap, berada di dasar, dan bahkan terjadi kematian massal (Yuwanita *et al.*, 2013). Selain itu terjadinya vakuolisasi pada sel merupakan dampak dari infeksi VNN, dan kebanyakan terjadi pada saraf pusat terutama otak dan retina (Grotmol *et al.*, 1997a, b). Selanjutnya grafik persentase DAB β -aktin pada perlakuan V dapat dilihat pada gambar 34 dibawah ini.

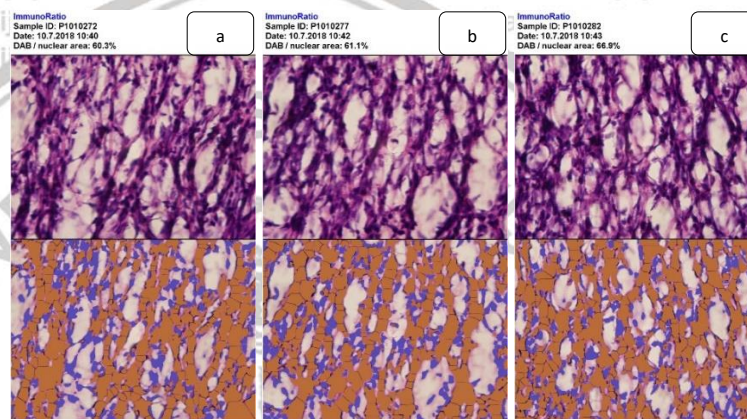


Gambar 34. Grafik data persentase DAB perlakuan V (Ikan dengan penginfeksi VNN).

5.8.6 Perlakuan SV1

Perlakuan SV1 merupakan ikan perlakuan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 17 μ g/ml dan penginfeksi VNN. Perlakuan ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp kemudian diinfeksi VNN memberikan hasil yang berbeda dengan perlakuan lainnya seperti perlakuan K, S dan V. Hal ini bertujuan

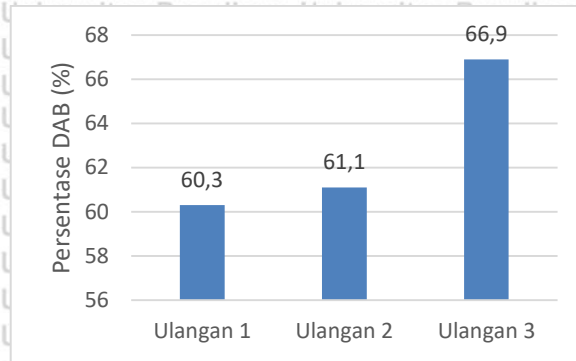
pemberian ekstrak *Spirulina* sp yang diberikan di awal bertujuan untuk meningkatkan sistem imun pada ikan kerapu cantang (sebagai imunomodulator) sebelum diinfeksi VNN. Kandungan yang senyawa bioaktif yang terdapat pada *Spirulina* sp diharapkan mampu memodulasi sistem kerja sel, sehingga ketika VNN diinfeksi pada ikan kerapu cantang, sistem imun sudah mengalami peningkatan. Berikut ini merupakan hasil analisa ImmunoRatio ekspresi β -aktin pada ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 17 $\mu\text{g/ml}$ dan penginfeksian VNN yang terdapat pada **Gambar 35**.



Gambar 35. Hasil ImmunoRatio ekspresi β -aktin ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 17 $\mu\text{g/ml}$ dan penginfeksian VNN. (a) ulangan 1, (b) ulangan 2, dan (c) ulangan 3.

Hasil analisa ImmuoRatio ekspresi β -aktin ikan kerapu cantang dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 17 $\mu\text{g/ml}$ dan penginfeksian VNN menunjukkan prosentase nilai DAB sebesar 60,3% (Gambar 35a), DAB ikan kedua 61,1% (Gambar 35b), dan DAB ikan ketiga 66,9% (Gambar 35c). Persentase nilai DAB ikan tersebut menunjukkan bahwa nilai rata-rata 62,7% terdeteksi gen target.

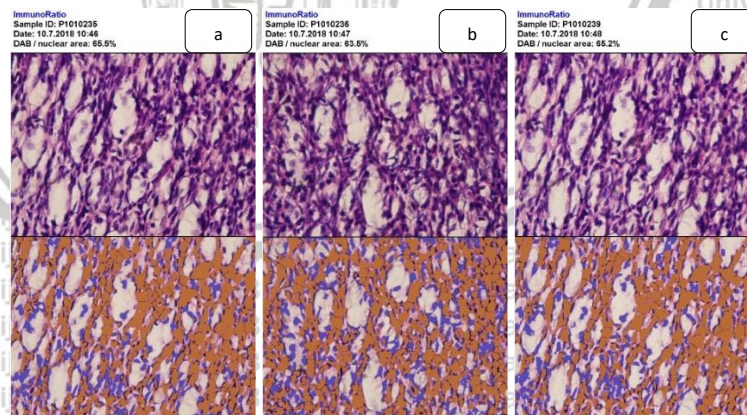
Selanjutnya grafik persentase DAB β -aktin pada perlakuan SV1 dapat dilihat pada gambar 36 dibawah ini.



Gambar 36. Grafik data persentase DAB perlakuan SV1 (Ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 17 µg/ml dan penginfeksi VNN).

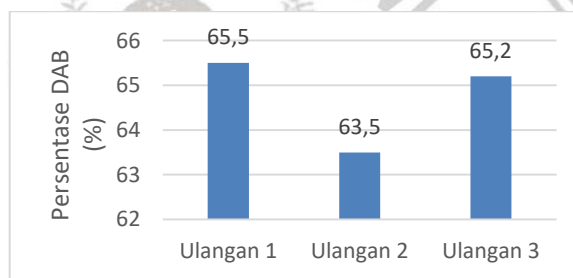
5.8.7 Perlakuan SV2

Perlakuan SV2 merupakan perlakuan ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 33 µg/ml dan penginfeksi VNN. Hasil analisa ImmuoRatio ekspresi β-aktin ikan kerapu cantang dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 33 µg/ml dan penginfeksi VNN menunjukkan prosentase nilai DAB ikan sebesar 65,5% (Gambar 37a), DAB ikan kedua 63,5% (Gambar 37b), dan DAB ikan ketiga 65,2% (Gambar 37c). Persentase nilai DAB ikan kontrol tersebut menunjukkan bahwa nilai rata-rata 64,7% terdeteksi gen target β-aktin. Hasil analisa ImmuoRatio dapat dilihat pada **Gambar 37** dibawah ini.



Gambar 37. Hasil ImmuoRatio ekspresi β-aktin ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 33 µg/ml dan penginfeksi VNN. (a) ulangan 1, (b) ulangan 2, dan (c) ulangan 3.

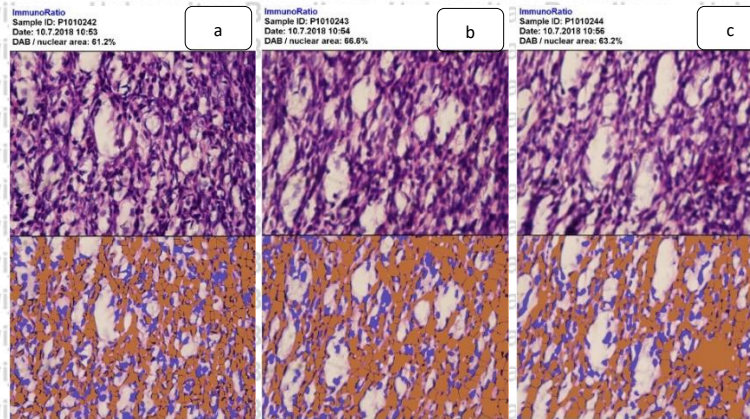
Hasil analisa imunoratio menunjukkan bahwa perlakuan SV2 juga berpengaruh terhadap ekspresi β -aktin, yang mempengaruhi ekspresi β -aktin pada perlakuan ini yaitu pemberian ekstrak *Spirulina* sp (sebagai modulator) dan infeksi VNN sehingga menyebabkan ekspresi β -aktin pada perlakuan ini tergolong tinggi. Adanya antigen atau patogen yang masuk ke dalam sel akan mempengaruhi respon sinyal oleh TLR/NLR yang memicu remodeling aktin, kemudian sitoskeleton akan melakukan serapan sinyal terkait adanya antigen atau patogen yang masuk, serta mekanisme penyampaian sinyal akan diteruskan dan akan mempengaruhi respon inflamasi (Hauser *et al.*, 2015). Selanjutnya grafik persentase DAB β -aktin pada perlakuan SV2 dapat dilihat pada gambar 38 dibawah ini.



Gambar 38. Grafik data persentase DAB perlakuan SV2 (Ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 33 μ g/ml dan penginfeksi VNN).

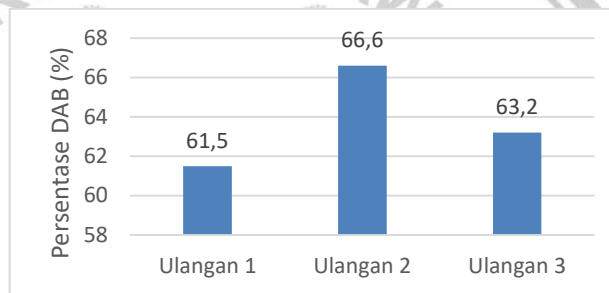
5.8.8 Perlakuan SV3

Perlakuan SV3 merupakan perlakuan ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 50 μ g/ml dan penginfeksi VNN. Hasil analisa ImmuoRatio ekspresi β -aktin ikan kerapu cantang dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 50 μ g/ml dan penginfeksi VNN menunjukkan peningkatan nilai DAB ikan sebesar 61,2% (Gambar 39a), DAB ikan kedua 66,6% (Gambar 39b), dan DAB ikan ketiga 63,2% (Gambar 39c). Persentase nilai DAB ikan kontrol tersebut menunjukkan bahwa nilai rata-rata 63,6% terdeteksi gen target β -aktin. Hasil analisa ImmuoRatio dapat dilihat pada **Gambar 39** dibawah ini.



Gambar 39. Hasil ImmunoRatio ekspresi β-aktin ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 50 µg/ml dan penginfeksi VNN. (a) ulangan 1, (b) ulangan 2, dan (c) ulangan 3.

Selanjutnya grafik persentase DAB β-aktin pada perlakuan SV3 dapat dilihat pada gambar 40 dibawah ini.



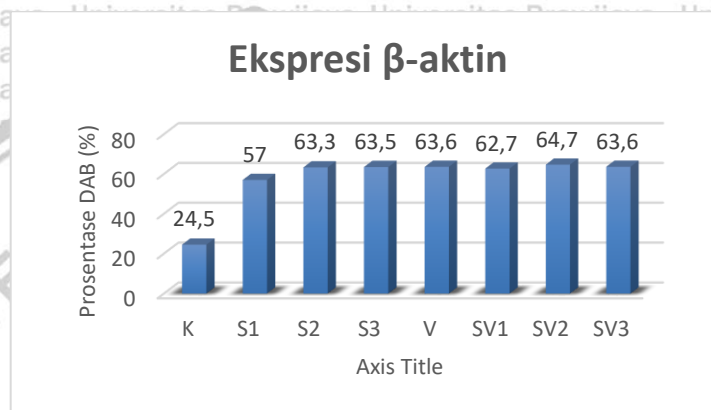
Gambar 40. Grafik data persentase DAB perlakuan SV3 (Ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 50 µg/ml dan penginfeksi VNN).

Dari hasil grafik prosentase nilai DAB β-aktin yang terdapat pada perlakuan K(ikan kontrol atau ikan tanpa perlakuan), perlakuan S1 (pemberian ekstrak *Spirulina* sp 17 µg/ml), perlakuan S2 (pemberian ekstrak *Spirulina* sp 33 µg/ml), perlakuan S3 (pemberian ekstrak *Spirulina* sp 50 µg/ml), perlakuan SV1 (pemberian ekstrak *Spirulina* sp 17 µg/ml dan penginfeksi VNN), perlakuan SV2 (pemberian ekstrak *Spirulina* sp 33 µg/ml dan penginfeksi VNN) dan perlakuan SV3 (pemberian ekstrak *Spirulina* sp 17 µg/ml dan penginfeksi VNN) terdapat perbedaan prosentase nilai DAB β-aktin pada ulangan 1, ulangan 2, dan ulangan 3. Perbedaan prosentase nilai DAB β-aktin tersebut dikarenakan adanya perbedaan pada setiap tubuh ikan dalam menerima ataupun merespon adanya

antigen, sehingga pemberian ekstrak *Spirulina sp* dengan perbedaan dosis akan memberikan perbedaan ekspresi β -aktin pada ikan kerapu cantang (*Epinephelus sp*).

Dari hasil ImmunoRatio ekspresi β -aktin pada setiap perlakuan, selanjutnya data tersebut dapat dianalisis perubahan ekspresi β -aktin dengan mengetahui rata-rata prosentase DAB tiap perlakuan yang dapat dilihat pada

Gambar 41.



Gambar 41. Grafik perubahan ekspresi β -aktin pada organ mata ikan kerapu cantang.

Dari hasil grafik pada **Gambar 41** menunjukkan bahwa terjadi perubahan ekspresi β -aktin, hal tersebut dapat dilihat pada perubahan prosentase rata-rata nilai DAB. Hasil prosentase nilai DAB tertinggi terdapat pada perlakuan S2 dan SV2, dimana perlakuan S2 (pemberian ekstrak *Spirulina sp* 33 μ g/ml) dan SV2 (pemberian ekstrak *Spirulina sp* 33 μ g/ml dan penginfeksi VNN) mampu meningkatkan ekspresi β -aktin. Peningkatan pada ekspresi β -aktin ini diindikasikan bahwa kandungan senyawa bioaktif seperti flavonoid, alkaloid, terpenoid, tanin, dan saponin yang terdapat pada ekstrak kasar *Spirulina sp* mampu meningkatkan sistem kerja molekul adaptor dan faktor transkripsi pada sel. Sehingga hal tersebut juga berpengaruh terhadap proliferasi aktin dan miosin.

Remodeling aktin akan terjadi di dalam sel karena dipicu aktifnya sinyal reseptor (TLR/NLR) yang memberi pesan bahwa adanya infeksi patogen, kemudian actin

akan berperan dalam respon inflamasi dengan cara memberikan sinyal kepada sel lain (Hauser *et al.*, 2015). Peran dan fungsi dari β -aktin di dalam sel yaitu bertindak sebagai fasilitator (penyampaian sinyal) dan berperan dalam pemeliharaan seluler (Lin dan Redies, 2012). Sedangkan pada perlakuan dengan penginfeksi VNN juga meningkatkan ekspresi β -aktin, hal ini terjadi karena ssRNA VNN merupakan virus yang dapat menyebabkan ensefalofati dan retinopati (Yuasa *et al.*, 2000).

5.9 Analisa Data

Analisa data pada penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) faktorial dengan 8 perlakuan dan 3 ulangan. Perlakuan dalam penelitian ini yaitu ikan kontrol (K), ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 17 $\mu\text{g/ml}$ (S1), ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 33 $\mu\text{g/ml}$ (S2), ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 50 $\mu\text{g/ml}$ (S3), ikan dengan penginfeksi VNN (V), ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 17 $\mu\text{g/ml}$ dan penginfeksi VNN (SV1), ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 33 $\mu\text{g/ml}$ (SV2) dan penginfeksi VNN, ikan dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 50 $\mu\text{g/ml}$ dan penginfeksi VNN (SV3). Data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu data hasil persentase DAB β -aktin pada setiap perlakuan. Setelah didapatkan data tersebut, selanjutnya data dianalisa dengan menggunakan cara statistik yaitu analisa keragaman (ANOVA), dengan tujuan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan pemberian perlakuan.

Tabel 15. Hasil uji ANOVA DAB β -aktin.

SK	JK	Db	KT	F hit	F tab 5%	F tab 1%
Perlakuan	3936.453	7	562.350	15.618	2.66	4.03
Galat	576.113	16	36.007			
Total	4512.566	23				

Berdasarkan hasil ANOVA menunjukkan bahwa nilai F hitung lebih besar dari nilai F tabel ($F_{hitung} > F_{tabel}$). Hal tersebut menjelaskan bahwa pemberian perlakuan yang berbeda berpengaruh langsung terhadap ekspresi β -aktin. Setelah diketahui hasil uji anova menunjukkan adanya pengaruh, maka dapat dilakukan uji lanjutan berupa uji Beda Nyata Terkecil (BNT). Uji BNT perlu dilakukan untuk mengetahui bagaimana pengaruh dari perlakuan yang berbeda terhadap ekspresi β -aktin. Hasil uji BNT menunjukkan bahwa perlakuan K tidak sama dengan perlakuan S1, perlakuan K dan perlakuan S1 memiliki pengaruh yang berbeda dengan perlakuan SV1, S2, S3, V, SV3, dan SV2, akan tetapi perlakuan SV1, S2, S3, V, SV3, dan SV2 memiliki pengaruh yang sama. Hasil analisa data dapat dilihat pada **Lampiran 3**.

5.10 Analisis Kualitas Air Ikan Kerapu Cantang

Kualitas air merupakan faktor penting dalam pemeliharaan ikan. Kualitas air menentukan kelangsungan hidup dari suatu organisme. Pada penelitian ini pengukuran kualitas air ikan kerapu cantang meliputi suhu, salinitas, pH, dan DO. Hasil pengukuran kualitas air dapat dilihat pada **Tabel 16**. Secara lebih rinci hasil pengukuran kualitas air pada penelitian ini dapat dilihat pada **Lampiran 4**.

Tabel 16. Hasil pengukuran kualitas air ikan kerapu cantang.

Parameter	Kisaran
Suhu	29-32
Salinitas	33-35
pH	8,0-8,4
DO	8,8-9,2

Kualitas air adalah salah satu faktor penunjang untuk mencapai keberhasilan dalam suatu usaha, terutama dalam bidang perikanan. Kualitas air dapat dipertahankan dengan mengganti air pada media pemeliharaan. Pergantian air tidak disarankan secara total, karena hal ini bisa membuat ikan menjadi stress

(Supriyadi dan Lentera, 2004). Suhu merupakan parameter utama kualitas air yang nantinya juga akan berpengaruh pada pertumbuhan ikan. Hasil pengukuran suhu pada media pemeliharaan ikan kerapu cantang berkisar antara 29-32 °C. Hasil pengukuran salinitas juga termasuk dalam kategori normal yakni berkisar antara 33-35 ppt. Hasil pengukuran pH berada pada kisaran 8,0-8,4. Sedangkan hasil pengukuran oksigen terlarut (DO) berada pada kisaran 8,8-9,2 ppm. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kualitas air pada media pemeliharaan ikan kerapu cantang termasuk dalam kondisi yang optimal.

Hasil pengukuran kualitas air diatas sesuai dengan pendapat Kordi (2008) yang menyatakan bahwa kisaran suhu yang baik untuk pemeliharaan ikan kerapu berkisar antara 27-32 °C, oksigen terlarut (DO) berkisar antara 5-6 ppm, pH (derajat keasaman) berkisar antara 7-8, dan salinitas yang optimal untuk pertumbuhan ikan kerapu berkisar antara 25-35 ppt. Selain itu pendapat lain terkait salinitas yang optimal untuk budidaya ikan kerapu juga berada pada kisaran 30-35 ppt (Akbar dan Sudaryanto, 2001).

6. PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa kandungan senyawa aktif seperti flavonoid, alkaloid, terpenoid, tanin, dan saponin yang terdapat pada ekstrak kasar *Spirulina* sp mampu meningkatkan sistem imun pada ikan kerapu cantang (*Epinephelus* sp). Berdasarkan analisa sidik ragam, pemberian ekstrak kasar *Spirulina* sp berpengaruh terhadap β -aktin, dan perlakuan S2 (dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp 33 $\mu\text{g/ml}$) merupakan perlakuan yang terbaik. Peningkatan sistem imun pada ikan kerapu cantang ditinjau dari meningkatnya prosentase DAB β -aktin seiring dengan pemberian ekstrak *Spirulina* sp, sehingga kandungan senyawa aktif ini bermanfaat sebagai inducer β -aktin dimana β -aktin berperan penting dalam pengaturan mekanisme sistem kekebalan tubuh.

6.2 Saran

Diperlukan penelitian lanjutan tentang kandungan senyawa bioaktif *Spirulina* sp terkait peningkatan sistem imun pada ikan, sehingga *Spirulina* sp dapat dimanfaatkan sebagai sumberdaya hayati dalam menejemen lingkungan dan kesehatan ikan khususnya untuk menanggulangi serangan virus VNN pada ikan kerapu cantang (*Epinephelus* sp).

DAFTAR PUSTAKA

- Abad, M.J., Bedoya, L.M., Bermejo, P. 2011. Marine Compounds and Their Microbial Activities. *Science agnaist microbial pathogen*. 1293-1306.
- Abràmoff M. D., Magalhães P, J., and Ram S. J. 2004. Image Processing with ImageJ. Photonic Solutions for Biotechnology and Medicine, Biophotonics International
- Adhianata, H. 2012. Uji Aktivitas Senyawa Anti mikroba Ekstrak Mikroalga (*Tetraselmis chuii*) Metode Sonikasi. Thesis. Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya.
- Affan. 2012. Identifikasi lokasi untuk pengembangan budidaya keramba jaring apung (KJA) berdasarkan faktor lingkungan dan kualitas air di perairan pantai timur Bangka Tengah. *Depik*, 1(1):78-85.
- Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology*. Fifth Edition. Elsevier Academic Press. London. 948 p.
- Agustini, T. W., Suzery M., Sutrisnanto D., Ma'rufa W. F., dan Hadiyanto. 2014. Comparative Study of Bioactive Substances Extracted from Fresh and Dried *Spirulina* sp. *Procedia Environmental Sciences*, 23 (2015) 282 – 289.
- Akbar, S dan Sudaryanto. 2001. *Pembenihan dan Pembesaran Kerapu Bebek*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Anam, C., Agustini T. W dan Romadhon. 2014. Pengaruh pelarut yang berbeda pada ekstraksi *Spirulina* platensis serbuk sebagai antioksidan dengan metode soxhletasi. *Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan*, 3 (4):106-112.
- Anggereini, E. 2008. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Suatu Metode Analisis DNA Dalam Menjelaskan Berbagai Fenomena Biologi. *Biospecies* 1(2):73-76.
- Arancibia, S. A., Beltran, C. J., Aguirre, I. M., Silva, P., Peralta, A. L., Malinarich, F., Hermoso, M.A., 2007. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol. Res*, 40, 97-112.
- Arimoto, M., Mori K., Nakai T., Muroga K dan Furusawa I. 1993. Pathogenicity of the causative agent of viral nervous necrosis disease in striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch and Schneider). *J. Fish Disease*, 16, 461-469.
- Artman, L., Recllet, V. D., Roretz, C. V. 2014. Planning your every move: The role of β -actin and its post-transcriptional regulation in cell motility. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 34, 33-43.
- Ayscough, K. R. 2004. Endocytosis: actin in the driving seat. *Curr Biol*, 14, R124-R126

Atamas, S. P. 1997. Alternative splice variants of cytokines: making a list. *Life Sci*, 61, 1105-1112.

Balai Budidaya Air Payau Situbondo. 2012. Ikan Kerapu Cantang : Hibrida antara Ikan Kerapu Macan Betina dengan Ikan Kerapu Kertang Jantan. www.bbapsitubondo.com (Diakses 30 Mei 2018).

Bai, S. D., Reddy D., Kalarani V. 2014. Influence of *Spirulina* on growth and immunity of the fingerlings common carp, (*Cyprinus carpio*, L. 1758), challenged with pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Int. J. Pharm. Life Sci*. 5 (6):3590-3602.

Baynes, J. and Dominiczak M. H. 2009. *Medical biochemistry*. Elsevier Health Sciences.

Becker, E. W. 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25, 207-210.

Beemiller, P. and Krummel, M. F. 2010. Mediation of T-cell activation by actin meshworks. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a002444.

Bell, J. G., McEvoy J., Tocher D. R., and Sargent J. R. 2000. Depletion of α -tocopherol and astaxanthin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects autoxidative defense and fatty acid metabolism. *Journal of Nutrition*, 130 (7):1800-1808.

Bermejo, P., Piñero E., Villar Á.M. Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from a protean extract of *Spirulina platensis*. *Food Chem.* 110 (2):436-445.

Bhat, V. B., & Madyastha, K. M. 2000. C-phycocyanin: A potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 275, 20-25.

Bhosale, P. 2004. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Appl. Mic. Biotech*, 63, 351-361.

Bintari, Y. R dan Elyani H. 2017. Ekstraksi Senyawa Bioaktif dari *Cladophora sp.* Dengan Metode Solvent Free Microwave Assisted Extraction (SFMAE). *JIMR - Journal of Islamic Medicine Research*, 1 (1):1-11.

Birkemo, GA, Luders T, Andersen O, Nes IF, Nissen-Meyer J. 2003. Hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L). *Journal of Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics*, 1646, 207-215.

Bold, H. C. and Wyne, Michael, J. 1985. Introduction to the Algae Structure and Reproduction, Second Edition. New Jersey: Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs.

Boshra, H., Li, J., Sunyer, J.O., 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol*, 20, 239-262.

Botella-Pavía P and Rodríguez-Concepción M. 2006. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. *Physiologia Plantarum*, 126 (3):369-381.

Bozorgnia, A., Alimohammadi, and M. Hosseinifard. 2011. Acute Effects of Different Temperature in the Blood Parameters of Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Second International Conference on Environmental Science and Technology IPCBEE vol.6. IACSIT Press, Singapore*:V252-V255.

Bunnell, T. M., Burbach, B. J., Shimizu, Y., and Ervasti, J. M. 2011. β -actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool. *Mbc Article*, 22, 4047-4058.

Bustin, SA, Nolan T. 2004. Pitfalls of quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech*, 15:155-166.

Cardoso N. F., Lima E. C., Royer B., Bach M. V., Dotto G. L., Pinto L. A. A., and Calvete T. 2012. Comparison of *Spirulina platensis* microalgae and commercial activated carbon as adsorbents for the removal of Reactive Red 120 dye from aqueous effluents. *Journal of Hazardous Materials*, 241-242 (2012) 146-153.

Carlier, M.F., Pantaloni, D. 1997. Control of actin dynamics in cell motility. *J Mol Biol*, 269, 459-67.

Castro, R and Tafalla, C. 2015. Overview of fish immunity. *Mucosal Health in Aquaculture*. Elsevier.

Celekli M. A and Yavuzatmaca M. 2009. Predictive modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of nitrate and NaCl concentrations, *Bioresour. Technol.* 100 : 1847-1851.

Cheng, Y. K., Wu Y. C., and Chi S. C. 2016. Humoral and cytokine responses in giant groupers after vaccination and challenge with betanodavirus. *Developmental and Comparative Immunology*, 30, 1-10.

Chi, S. C., Lo, C. F., Kou, G. H., Chang, P. S., Peng, S. E., Chen, S. N.. 1997. Mass mortalities associated viral nervous necrosis disease in two species of hatchery-reared grouper, *Epinephelus fuscogutatus* and *Epinephelus akaara* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis*, 20, 185-193.

Chi, S.C., Shieh, J.R., Lin, S.J., 2003. Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic organisms in Taiwan. *Dis. Aquat. Organ*, 55, 221-228.

Chi, S. C., Wu, Y. C., and Hong, J. R. 2016. *Nodaviruses of fish*. Aquaculture Virology, Academic Press is an imprint of Elsevier.

Chik, J. K., Linberg U., and Schutt, C. E. 1996. The structure of an open state of β -actin at 2.65 Å resolution. *J. Mol. Biol*, 263, 607-623.

Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv*, 25, 294-306.

Ciferri, O., Tiboni, O. 1985. The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. *Annu. Rev. Microbiol*, 39, 503–526.

Cohen, Z., 1999. *Chemicals from Microalgae*. Taylor & Francis, London, UK.

Cos, P., Calomme, M., Sindambiwe, J.B., Bruyne, T.D., Cimanga, K., Pieters, L., Vlietinck, A.J., and Berghe, D.V. 2001. Cytotoxicity and Lipid Peroxidation-Inhibiting Activity of Flavonoids. *Planta Med*, 67 : 515-519.

Cresswell, R. C, Rees T. A. V, and Shah N. 1989. *Alga and Cyanobacterial Biotechnology*. Mc Graw Hill, London.

Dachriyanus. 2014. *Analisis Struktur Senyawa Organik Secara Spektroskopi*. Lembaga Pengembangan Teknologi Informasi dan Komunikasi (LPTIK):Universitas Andalas. ISBN 978-602-60613-5-5.

Demissie, A, Abebe M, Aseffa A. 2004. Healthy individuals that control a latent infection with Mycobacterium tuberculosis express high levels of Th1 cytokines and the IL-4 antagonist IL-4delta2. *J Immunol*, 172, 6938-6943.

Diharmi, A. 2001. *Pengaruh Pencahayaan Terhadap Kandungan Pigmen Bioaktif Mikroalga Spirulina platensis Strain Local (Ink)*. Institut Pertanian Bogor, Bogor

Dinarello, C. A. 1997. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Review*, 8, 253-265.

Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya-Kementrian Kelautan Perikanan. 2018. Ikan Kerapu Cantang, Hibrida Antara Ikan Kerapu Macan Betina dengan Ikan Kerapu Kertang Jantan. <http://djpb.kkp.go.id/index.php/arsip/c/588/Ikan-Kerapu-Cantang/> (Diakses Pada 30 Mei 2018).

Docan, A.V., V. Cristea, and D. Lorena. 2011. Influence of thermal stress on the hematological profile of oncorhynchus mykiss held in different stocking densities in recirculating aquaculture systems. *Lucrări Științifice*. 55:267-272.

Dominguez, H., 2013. Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals. *Woodhead Publishing Limited*. Elsevier.

Duncan P. L and Klesius P. H. 1996. Effects of feeding *Spirulina* on specific and nonspecific immune responses of channel catfish. *J. Aquatic Animal Health* 8(4):308-313.

Ellis, A.E., 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol*, 25, 827-839.

Elzenga, J. T. M, Prins H. B. A, and Stefels J. 2000. The role of extracellular carbonic anhydrase activity in inorganic carbon utilization of *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae): a comparison with other marine algae using the isotopic disequilibrium technique. *Limnology and Oceanography* 45(2):372-380.

Engqvist-Goldstein AE, Drubin DG. 2003. Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 19, 287-332.

Erdman, J. W. 1999. Variable bioavailability of carotenoids from vegetables. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70(2):179-180.

Fischer, U., Utke, K., Somamoto, T., Kollner, B., Ototake, M., Nakanishi, T., 2006. Cytotoxic activities of fish leucocytes. *Fish Shellfish Immunol*, 20, 209-226.

Fletcher, H. A, Owiafe P, Jeffries D. 2004. Increased expression of mRNA encoding interleukin (IL)-4 and its splice variant IL-4delta2 in cells from contacts of *Mycobacterium tuberculosis*, in the absence of in vitro stimulation. *Immunology*, 112, 669-673.

Fogg, G. E., dan Thake, B. 1987. *Algal Cultures dan Phytoplankton Ecology*. The University of Wisconsin Press, Madison

Frederickson ,R M, Micheau M. R, Iwamoto A, Miyamoto NG. 1989. 50 flanking and first intron sequences of the human beta-actin gene required for efficient promoter activity. *Nucleic Acids Res*, 17, 253-70.

Furusawa, R., Okinaka, Y., Nakai, T., 2006. Betanodavirus infection in the freshwater model fish medaka (*Oryzias latipes*). *Journal of General Virology*, 87, 2333–2339.

Gelse, K, Poschl E, Aigner T. 2003. Collagens-structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, 1531-1546.

Glazebrook, J. S., Heasman, M. P., de Beer, S. W., 1990. Picorn-like viral particles associated with mass mortalities in larval *barramundi*, *Lates calcarifer* (Bloch). *Journal of Fish Diseases*, 13, 245-249.

Glowacki, J. Mizuno S. 2008. Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers*, 89, 338-44.

Goiris, K., Muylaert, K., and Fraeye, I. antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *J APPL Phycol*, 24, 1477-1486.

Goldman, JC., and Carpenter, EJ. 1974. A Kinetic Approach to the Effect of Temperature on Algal Growth. *Limnol. Oceanogr*, 19,756-766.

Graneli, Enda., & Salomon, PS.2010. Factor Influenceing Allelopathy And Toxicity in *Prymnesium parvum*. *Journal of The American Water Resources Association*, 46, 1.

Gross, J. 1987. *Pigment in Fruits*. New York: Academic Press

Grotmol, S., Totland, G.K., Kryvi, H., 1997a. Detection of a nodavirus-like agent in heart tissue from reared Atlantic salmon *Salmo salar* suffering from cardiac myopathy syndrome (CMS). *Dis. Aquat. Organ*, 29, 79-84.

Grotmol, S., Totland, G.K., Torud, K., Hjeltnes, B.K., 1997b. Vacuolating encephalopathy and retinopathy associated with a nodavirus-like agent: a

- probable cause of mass mortality of cultured larval and juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Dis. Aquat. Organ*, 29, 85-97.
- Gunning, P., Leavitt J., Muscat G., Ng SY., Kedes L. 1987. A human beta-actin expression vector system directs high-level accumulation of antisense transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84, 4831-5.
- Guyton, A.C., & Hall, J. E. 1997. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran Edisi 9*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Habib, M.A.B., Parvin, M., Huntington, T.C. 2008. A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish. *FAO Fish. Aquaculture Circular* No. 1034.
- Hadiyanto dan Azim, M. 2012. *Mikroalga – Sumber Pangan dan Energi Masa Depan*. UPT UNDIP Press Semarang, 978-602-097-298-3.
- Hardie LJ, Laing KJ, Daniels GD, Grabowski PS, Cunningham C, Secombes CJ. 1998. Isolation of the first piscine transforming growth factor β gene: analysis reveals tissue specific expression and a potential regulatory sequence in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytokine*, 10, 555-563.
- Hartig S, M. 2013. Basic Image Analysis and Manipulation in ImageJ. *Current Protocols in Molecular Biology* 14.15.1-14.15.12, April 2013.
- Harun, R., M. Singh., G.M. Forde, & M. K. Danquah. 2010. Bioprocess engineering of microalgal to produce a variety of consumer product. *Renewable and Sustainable Energy Rev.* 14: 1037-1047.
- Hausser A., Ellwanger K., & Kufer T. 2015. Sensing of pathogen-induced F-actin perturbations – a new paradigm in innate immunity. *DGZ Cell News* 1/2015.
- Hegde, A., Teh, H.C., Lam, T.J., Sin, Y.M., 2003. Nodavirus infection in freshwater ornamental fish, guppy, *Poecilia reticulata*—comparative characterization and pathogenicity studies. *Arch. Virol*, 148, 575-586.
- Hartanti, N. 2008. Pencemaran Organik Limbah Tahu di Sungai Desa Kalisari Kecamatan Ajibarang Kabupaten Banyumas. *CERMIN*. Edisi 042. Hlm 4.
- Hema, GS, Shyni K, Mthew S, Ananda R, Ninan G, Lakshmanan PT. 2003. A simple method for isolation of fish skin collagen-biochemical characterization of skin collagen extracted from albacore tuna (*Thunnus alalunga*), dog shark (*Scoliodon sorrakowah*), and Rohu (*Labeo rohita*). *Annals of Biological Research*, 4(1): 271-278.
- Heriyati, R. 2008. Pertumbuhan dan Biomassa *Spirulina* sp dalam Skala Laboratoris. *BIOMA*, 10(1):19-22.
- Hirahashi, T., Matsumoto M., Hazeki K., Saeki Y., Ui M., Seya T. 2002. Activation of the human innate immune system by *Spirulina*: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. *Int. Immunopharmacol*, 2(4):423-434.

Inagaki, Naoyuki and Katsuno, Hiroko. 2017. Actin Waves: Origin of Cell Polarization and Migration. *Trends in Cell Biology* 1320 No. of Page 12.

Iwamoto, T., Mise, K., Mori, K., Arimoto, M., Nakai, T., Okuno, T. 2001. Establishment of an infectious RNA transcription system for striped jack nervous necrosis virus, the type species of the betanodaviruses. *J. Gen. Virol*, 82, 2653-2662.

Jackson, M., Mantsch, H., 1996. Biomedical infrared spectroscopy, In: H.H. Mantsch and D. Chapman (eds.), *Infrared spectroscopy of biomolecules* pp.233.

Jalali, M., Zaborowska J., and Jalali M. 2017. *The Polymerase Chain Reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR*. Basic Science Methods for Clinical Researchers.

Jeon, MW, Ali MB, Hahn EJ, Paek KY. 2005. Effect of photon flux density on the morphology, photosynthesis, and growth of a CAM orchid, *Doritaenopsis* during postmicropropagation acclimatization. *Plant Growth Regul*, 45, 139-147.

Johnston B. and Yeeting B. 2006. Economics and marketing of the live reef fish trade in Asia–Pacific. ACIAR Working Paper No. 60. *Australian Centre for International Agricultural Research*: Canberra.

Jönsson F, Gurniak CB, Fleischer B, Kirfel G, Witke W. 2012. Immunological responses and actin dynamics in macrophages are controlled by n-cofilin but are independent from ADF. *PLoS ONE*, 7: e36034.

Jung, W. K., Rajapakse, N., and Kim, S. K. 2005. Antioxidative activity of low molecular peptide derived from the sauce of fermented blue mussel *Mytilus edulis*. *Eur. Food Res. Technol*, 220, 535-539.

Khalaf NA, Ashok KS, Atif AO, Zaha EA, Husni F. 2007. Antioxidant activities of some common plants. *Turk J Biol* (31):1-5.

Khan, Z, Bhadouria P, Bisen PS. 2005. Nutritional and therapeutic potential of *Spirulina*. *Curr Pharm Biotechnol* 6(5):373-379.

Khan S. A., Tyagi M., Sharma A. K., Barreto S. G., Sirohi B., Ramadwar M., Shrikhande S. V., Gupta S. 2014. Cell-type specificity of β -actin expression and its clinicopathological correlation in gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol*, 20(34): 12202-12211.

Kielty, C.M., Hoplinson, I., Grant, M.E., 1993. *Part I: Connective tissue and its heritable disorders*. In: Royce, P.M., Steinmann, B. (Eds.). Wiley-Liss, Inc, New York, pp. 103–147.

Kim, M. K., S. H. Ahn, and Y. C. Lee-Kim. 2001. Relationship of serum α -tocopherol, carotenoids and retinol with the risk of breast cancer. *Nutrition Research*, 21 (6):797-809.

Kim, S. K., Ravichandran Y. D., Khan S. B., and Kim Y. T. 2008. Prospective of the Cosmeceuticals Derived from Marine Organism. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13:511-523.

Kim, S. K and Kang K. H. 2011. Medicinal Effect of Peptides from Marine Microalgae. *Advances in Food and Nutrition Research*, 64, 313-323.

King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. 2012. *Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, New York, NY.

Kok, YY., WL. Chu, SM. Phang, SM. Mohamed, R. Naidu, P.J. Lai, SN. Ling, JW. Mak, PK. Lim, P. Balraj, & AS. Khoo. 2011. Inhibitory activities of microalgal extracts against Epstein-Barr virus DNA release from lymphoblastoid cells. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 12(5):335-345.

Koller, M., Muhr, A., & Braunegg, G. 2014. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *ALGAL*, 6, 52-63.

Kordi, H.G.M., 2002. *Usaha Pembesaran Ikan Kerapu Di Tambak*. Kanisius. Jakarta.

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

Koru, E. 2009. Earth Food *Spirulina (Arthrospira)*. *Production and Quality Standards, Turkey Journal of Agriculture*, 11(3):133-134.

Kruse Niels., Pette Martin., Toyka Klaus., and Rieckmann Peter. 1997. Quantification of cytokine mRNA expression by RT PCR in samples of previously frozen blood. *Journal of Immunological Methods* 210, (1997):195-203.

Lehninger, A.L. 1982. *Dasar-dasar Biokimia*. Penerjemah : Thenawidjaja, M. Institut Pertanian Bogor: Bogor.

Lewis, K. L., Cid, N. D and Traver D. Prespectives on antigen presenting cells in zebrafish. *Developmental and Comparative Immunology*, 46, 63-73.

Li, Z. Y., Guo, S. Y., & Li, L. 2003. Bioeffect of selenite on the growth of *Spirulina platensis* and its biotransformation. *Bioresource Technology*, 89, 171-176.

Li, Zhaojie., Yang Lijun., Wang Jing., Shi Wenchun., Pawar, R. A., Liu Yumin., Xu Chenggang., Cong Weihong., Hu Qiaoru., Lu Taiyi., Xia Fan., Guo Wei., Meng Zhao., dan Zhang Yuanyuan. 2010. β -Actin is a useful internal control for tissue-specific gene expression studies using quantitative real-time PCR in the half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* challenged with LPS or *Vibrio anguillarum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 29, 89-93.

Lin, Juntang dan Redies Christoph. 2012. Histological evidence: housekeeping genes beta-actin and GAPDH are of limited value for normalization of gene expression. *Dev Genes E*, 222, 369-376.

Linzer, D.I., and Nathans, D. 1983. Growth-related changes in specific mRNAs of cultured mouse cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 4271-4275.

Liu, Hong-xia., Sun Su-qin., Lv Guang-hua., and Chan K.K.C. 2005. Study on Angelica and its different extracts by Fourier transform infrared spectroscopy and two-dimensional correlation IR spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A*, 64, 321-326.

Liu X. D., Huang J. N., Weng S. P., Hu X. Q., Chen W. J, Qin Z. D, Dong X. X., Liu X. L., Zhou Y., Asim M, Wang W. M., He J. G and Lin L. 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* 2015, 38, 533–540.

Lu, M.W., Chao, Y.M., Guo, T.C., Santi, N., Evensen, O., Kasani, S.K. 2008. The interferon response is involved in nervous necrosis virus acute and persistent infection in zebrafish infection model. *Mol. Immunol*, 45, 1146-1152.

Madhava, C., Bhat, V. B., Kiranmai, G., Reddy, M. N., Reddanna, P., & Madyastha, K. M. 2000. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycoyanin, a biliprotein from *Spirulina platensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 277, 599-603.

Maeno, Y., Leobert D. De La Pena and Erlinda R. Cruz-Lacierda. 2007. Susceptibility of Fish Species Cultured in Mangrove Brackish Area to Piscine Nodavirus. *JARQ*, 41(1):95-99.

Magnadottir, B. 2010. Immunological control of fish diseases. *Journal of Marine Biotechnology*, 12, 361-379.

Maier, V. H., Dorn K. V., Gudmundsdottir B. K., Gudmundsson G. H. 2008. Characterisation of cathelicidin gene family members in divergent fish species. *Mol Immunol*, 45, 3723-3730.

Margono, S. 2005. *Metodologi Penelitian Pendidikan*. Jakarta: PT. Rineka Cipta

Mao, T. K, Van D. W. J, Gershwin M. E. 2000. Effect of *Spirulina* on the secretion of cytokines from peripheral blood mononuclear cells. *J Med Food*, 3(3):135-140

Mega, M, Swastini D. 2010. Screening fitokimia dan aktivitas antiradikal bebas ekstrak metanol daun gaharu (*Gyrinops versteegii*). *Jurnal Kimia*, 4(2):187-192.

Morist, A., Montesinos, J. L., Cusido, J. A., & Godia, F. 2001. Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. *Process Biochemistry*, 37, 535-547.

Mullis, K. B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am Apr*, 262(4):56–61. 4–5. PubMed PMID: 2315679.

Munday, B. L., Kwang, J., Moody, N. 2002. Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *J. Fish Dis*, 25, 127-142.

Murdjani. 2003. Identifikasi dan Patologi Bakteri *Vibrio alginolyticus* Pada Ikan Kerapu Tikus. *Disertasi*. Program Pasca Sarjana. Universitas Brawijaya.

Muroga, K. 2001. Viral and bacterial diseases of marine fish and shellfish in Japanese hatcheries. *Aquaculture*, 202, 23-44.

Novisa E., Tarsim., dan Harpeni E. 2015. Pengaruh Jintan Hitam (*Nigella Sativa*) Terhadap Histopatologi Organ Kakap Putih (*Lates Calcarifer*) Yang Terinfeksi *Viral Nervous Necrosis* Secara Buatan. *e-Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan*, 3(2):ISSN 2302-3600.

Nuraini, Y. L, Subyakto S, Triastutik G, Fatmawati, Alimuddin. 2010. *Pembuatan vaksin DNA untuk virus VNN ikan kerapu dan uji ekspresinya secara in vivo*. Balai Budidaya Air Payau Situbondo. p18.

Otles, S., & Pire, R. 2001. Fatty acid composition of *Chlorella* and *Spirulina* microalgae species. *Journal of AOAC International*, 84, 1708-1714.

Ozbiosciences. 2018. <http://www.ozbiosciences.com/content/46-vaccine-adjuvants-vaccinationresearch>. Diakses pada tanggal 05 februari 2018 pukul 21.55 wib.

Pallazo, A. 2006. *Actin differentiation through Arginylation*. <http://science.sciencemag.org> diakses pada 07 februari 2018 pukul 23.15 wib.

Pati, F., Adhikari B., and Dhara S. 2010. Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. *Bioresource Technology*, 101, 3737-3742.

Pepper, M. S. 1997. Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17, 605-19.

Pihlanto-Leppala, A. 2001. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ACE-inhibitory peptides. *Trends Food Sci. Technol*, 11, 347-356.

Pinto, R. D, Nascimento D. S, Reis M. I R, do Vale A, dos Santos N. M. S. 2006. Molecular characterization, 3D modelling and expression analysis of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) interleukin-10. *Molecular Immunology*, 44, 2066-2075.

Prasanna, R., A. Sood, A. Suresh, S. Nayak, & B.D. Kaushik. 2007. Potential and applications of algal pigment in biology. *Acta Botan. Hungaria* 49 (1- 2): 131-156.

Prayogo, I dan Arifin, M. 2015. Teknik Kultur Pakan Alami *Chlorella* sp dan *Rotifera* sp Skala Massal dan Manajemen Pemberian Pakan Alami Pada Larva Kerapu Cantang. *Samakia : Jurnal Ilmu Perikanan* 6(2):2015, ISSN:2086-3861.

Priyadarshani, I., & Rath, B. 2012. Commercial and industrial applications of microalgae – A review. *J. Algal Biomass Utiln* 3(4):89-100.

Pulz, M.O., Gross, W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology Biotechnology*, 6, 635-648.

Rahayu. 2009. *Monitoring Air di Daerah Aliran Sungai*. World Agroforestry Centre. Hlm 38.

Ramos-Vara, J. A. 2005. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Vet Pathol* 42:405-426

Ravichandra, J. A. 2012. Influence of acute temperature stress on hemoglobin content in snakeheaded fish (*Channa punctatus*) Gavari River, Nanded, India. *Int. J. Biomed. Adv. Res.* 3(11):1-5.

Rimmer M. A., McBride S. and Williams K. C. 2004. Advances in grouper aquaculture. ACIAR Monograph No. 110. *Australian Centre for International Agricultural Research*: Canberra.

Roach, J. C., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M. K., Smith, K. D., Hood, L. E., and Aderem, A. 2005. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *PNAS* 102(27):9577-9582.

Roberts, R.J. 1978. The Bacteriology of Teleostei in Fish Pathology. *Ballier Tindall London*. 205-308 hlm.

Robertsen, B. 2006. The interferon system of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 20, 172-191.

Ruan, W, Lai M. 2007. Actin, a reliable marker of internal control?. *Clinica Chimica Acta*, 385:1-5.

Rubenstein, P. A. 1990. The functional importance of multiple actin isoforms. *Bioessays*, 12, 309-315.

Sadovy, Y., Thierry, C., Choat, J.H., Cabanban, A.S., 2008. *Cromileptes altivelis*, Humpback Grouper. *The IUCN Red List of Threatened Species™*. ISSN 2307-8235 (online).

Salmin. 2005. Oksigen Terlarut (DO) dan Kebutuhan Oksigen Biologi (BOD) Sebagai Salah Satu Indikator untuk Menentukan Kualitas Perairan. *Oseana*, 30(3):21-26.

Sani R. N., Nisa F. C., Andriani R. D., dan Maligan J. M. 2014. Analisis Rendemen Dan Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Mikroalga Laut *Tetraselmis chuii*. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 2(2):121-126.

Sastrosupadi, A. 2000. *Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.

Saurabh, S., Sahoo, P.K., 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquacult. Res.* 39, 223-239.

Schneemann, A., Ball, L.A., Delsert, C., Johnson, J.E., Nishizawa, T. 2005. Family Nodaviridae. In: Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U. & Ball L.A., eds. Elsevier Academic Press, London, UK, 865-872.

Secombes, C. J., Fletcher T. C. 1992. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Disease*, 2, 53-71.

Secombes, C. J. 2008. Will advances in fish immunology change vaccination strategies. *Fish and Shellfish Immunology*, 25, 409-416.

Secombes, C. J., Wang, T. 2012. The innate and adaptive immune system of fish. *Infectious disease in aquaculture*. Woodhead Publishing Limited 2012.

Sedarmayanti dan Syarifudin Hidayat. 2002. *Metodologi Penelitian*. Bandung: Mandar Maju.

Sedjati, S., Yudiati E., dan Suryono. 2012. Profil Pigmen Polar dan Non Polar Mikroalga Laut *Spirulina* sp. dan Potensinya sebagai Pewarna Alami. *ILMU KELAUTAN* 17(3), 176-181.

Shalaby, E. A & Shanab, S. M. M. 2012. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* Vol. 42(5), September 2013, pp. 556-564.

Shalaby, E. A & Shanab, S. M. M. 2013. Antiradical and Antioxidant Activities of Different *Spirulina platensis* Extracts against DPPH and ABTS Radical Assays. *Journal of Marine Biology & Oceanography* (2013), 2:1.

Shanab, S. MM., Mostafa, S. SM., Shalaby E. A., and Mahmoud G. I. 2012. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* (2012) 608-615.

Simanjuntak, P. 1995. Senyawa bioaktif dari alga. *Hayati*. 2(2): 49-54.

Sjors, V. I and Alessandro F. 2010. Algae based biofuels, Applications and coproducts. *Bioenergy monitoring and assessment*.

Small, E., 2011. *Spirulina*—food for the universe. *Biodiversity*, 12, 255-265.

SNI, 7546.1. 2015. Deteksi nervous necrosis virus (NNV) Bagian 1 : Metode Transcription Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Badan Standardisasi Nasional ICS 65.150*

Soni, R. A., Sudhakar, K., and Rana, R. S. 2017. *Spirulina* – from growth to nutritional product: A Review. *Trends in Food Science & Technology* S0924-2244(17)30218-2.

Sturzenbaum, S. R, Kille P. 2001. Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 130, 281-9

Suantika, G dan Hendrawandi D. 2009. Efektivitas Teknik Kultur menggunakan Sistem Kultur Statis, Semi-kontinyu, dan Kontinyu terhadap Produktivitas dan Kualitas Kultur *Spirulina sp.* *Jurnal Matematika dan Sains*, Juni 2009, vol. 14 no. 2

Sudhakar, K and Premalatha M. 2015. Characterization of Micro Algal Biomass Through FTIR/TGA /CHN Analysis: Application to *Scenedesmus sp.* *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 37, 2330-2337.

Suetsugu S, Takenawa T. 2003. Regulation of cortical actin networks in cell migration. *Int Rev Cytol*, 229, 245-286.

Suetsuna, K., Maekawa, K., and Chen, J. 2004. Antihypertensive effects of *Undaria pinnatifida* (wakame) peptide on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Biochem*, 15, 267-272.

Sugiyono. 2012. *Metode Penelitian Kombinasi (Mixed Methods)*. Bandung: Alfabeta

Supriyadi., H. dan T. Lentera. 2004. *Membuat Ikan Hias tampil sehat dan Prima*. PT Agromedia Pustaka. Jakarta.

Suzuki, T., Higgins P. J., Crawford DR. 2000. Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques*, 29, 332-337.

Talyshinsky, M. M., Souprun Y. Y., and Huleihel M. 2002. Anti-viral activity of red microalgal polysaccharides against retroviruses. *Cancer Cell International* 2002, 2:8.

Tan, C., Huang, B., Chang, S.F., Ngoh, G.H., Munday, B., Chen, S.C., Kwang, J. 2001. Determination of the complete nucleotide sequences of RNA1 and RNA2 from greasy grouper (*Epinephelus tauvina*) nervous necrosis virus, Singapore strain. *J. Gen. Virol*, 82, 647-653.

Tarsim., Setyawan A., Harpen E dan Pratiwi A. R. 2013. The Effication Of Black Cummin (*Nigella Sativa*) As Immunostimulant In Humpback Grouper (*Cromileptes altivelis*) Against Vnn (*Viral Nervous Necrosis*) Infection. *Seminar Nasional Sains & Teknologi V Lembaga Penelitian*. Universitas Lampung.

Thellin, O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G. 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol*, 75, 291-295.

Thiery, R., Raimond, J.C., Castric, J. 1999. Natural outbreak of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*: study by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Virus Res*, 63, 11-17.

Toda, H, Yasutaka, S., Takuhito, K., Fumio, T., Kyosuke, A., Takeshi, Y., Tomonori, S., Hiroaki, S., Yuzuru, S., Mitsuru, O., Tadaaki, M., Teruyuki, N. 2011.



- Conservation of characteristics and functions of CD-4 positive lymphocytes in a teleost fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 35, 650-660.
- Tuominen V. J., Ruotoistenmäki S., Viitanen A., Jumppanen M., and Isola J. 2010. ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67. *Breast Cancer Research* 2010, 12:R56
- Trombetta, E.S., Mellman, I., 2005. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu. Rev. Immunol*, 23, 975-1028.
- Tsuruki, T., Kishi, K., Takahashi, M., Tanaka, M., Matsukawa, T., and Yoshikawa, M. 2003. Soymetide, an immunostimulating peptide derived from soybean b-conglycinin, is an Fmlp agonist. *FEBS Lett*, 540, 206-210.
- Tumadang L. S. N., Sampekalo J., dan Lantu S. 2016. Pengaruh pemberian beberapa jenis pakan pada pertumbuhan ikan kerapu Cantang *Epinephelus* sp di Karamba Jaring Apung di Teluk Talengen Kepulauan Sangihe. *Budidaya Perairan*, Vol. 4 No.3: 1 – 9.
- Ugwu, CU., Aoyagi, H., dan Uchiyama, H. 2008. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99, 4021-4028.
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., and Moran, G. 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni Medicina*, 56(10):486-503.
- Valle L. D., Zanella L., Patarnello P., Paolucci L., Belvedere P and Colombo L. 2000. Development of a sensitive diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on RT-PCR plus nested PCR. *Journal of Fish Diseases* 2000, 23, 321–327.
- Van der Merwe, P. A. and Dushek, O. 2011. Mechanisms for T cell receptor triggering. *Nat. Rev. Immunol*, 11, 47-55.
- Venkatesan S., Pugazhendy K., Sangeetha D., Vasantharaja C., Prabakaran S and Meenambal M. 2012. Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectoroscopic Analysis of *Spirulina*. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 3(4):969-972.
- Venkatesan J., Manivasagan P., and Kim, S. K. 2015. Marine Microalgae Biotechnology: Present Trends and Future Advances. *Department of Marine-Bio Convergence Science and Marine Bioprocess*. Research Center, Busan, South Korea.
- Voight, R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Edisi 5. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Wang, L., Pan B., Sheng J., Xu J., Hu Q. 2007. Antioxidant activity of *Spirulina platensis* extracts by supercritical carbon dioxide extraction. *Food Chem*, 105(1):36-41.

Watanuki, H., Ota K., Tassakka A.C.M.A., Kato T., Sakai M. 2006. Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, *Cyprinus Carpio*. *Aquac*, 258(1):157-163.

Whyte, S. K. 2007. The innate immune response of fish – a review of current knowledge. *Fish Shellfish Immunol*, 23, 1127–1151.

Wilson, M. R, Bengten E, Miller N, Clem L. W, Du Pasquier L, Warr G. W. 1997. A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 4593-4597.

Winarno. F.G. 2004. *Kimia Pangan dan Gizi*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.

Wu, Q., Liu L., Miron A., Klimova B., Wan D., and Kuca K. 2016. The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of *Spirulina*: an overview. *Arch toxicol*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Xue, C., Hu, Y., Saito, H., Zhang, Z., Li, Z., & Cai, Y. 2002. Molecular species composition of glycolipids from *Spirulina platensis*. *Food Chemistry*, 277, 9-13.

Yanuhar, U. 2009a. The Role, Expression and Production of Brain Receptor Protein of Humpback grouper *Cromileptes altivelis* to Viral Nervous Necrotic infection for development of Diagnostic Material. *Proceeding of International Biotechnology Conference*. Institute Technology of Bandung.

Yanuhar, U. 2009b. Pengaruh Pemberian Bahan Aktif Ekstrak *Nannochloropsis oculata* Terhadap Kadar Radikal Bebas Pada Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) Yang Terinfeksi Bakteri *Vibrio alginolyticus*. *Management of Water Resources*, Faculty of Fisheries and Marine Science.

Yanuhar U. 2011. Respon Immun Sel Interleukin -4 (IL-4) Pada Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) Yang Dipapar Protein Immunogenik *Vibrio harveyi*. *Jurnal Kelautan*, 4(2):ISSN 1907-9931.

Yanuhar U., Gusman E., dan Arfiati D. 2012. The Exposure Immunogenic Protein of Viral Nervous Necrotic on Humpback Grouper That Influences to Proliferation and Expression of Immune Cells (Interferon γ and NFKb Cell). *Advances in Environmental Biology*, 6(1): 388-396, 2012

Yanuhar, U. 2015. Effects of Pigment-Protein Fraction from *Nannochloropsis oculata* on TNF α and IL-6 which Act as an Anti-Inflammatory Against Viral Nervous Necrosis (VNN) Infection. *Procedia Chemistry*, 14, 437-443

Yanuhar, U dan Khumaidi, A. 2015. Pengaruh Fraksi Protein Pigmen *Nannochloropsis oculata* Terhadap Respon β -aktin Pada Ikan Kerapu Tikus yang Diinfeksi Viral Nervous Necrosis. *Lab. Ilmu-ilmu Perairan dan Bioteknologi*, FPIK UB.

Yanuhar U. 2015. Protein Adhesin 39 kDa *Vibrio alginolyticus* dan Penggunaannya Sebagai Imunomodulator Major Histocompatibility Complex Pada Ikan

Kerapu Tikus *Cromileptes altivelis*. Paten Indonesia:IDP000045822. Direktorat Jenderal Kekayaan Intelektual Republik Indonesia.

Yanuhar, U dan Khumaidi, A. 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.

Yoshikoshi, K., Inoue, K., 1990. Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis*, 13, 69-77.

Yu, Y., Smoligovets A. A and Groves J. T. 2013. Modulation of T cell signaling by the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, 126, 1049-1058.

Yuasa, K., Des Roza, I. Koesharyani, F. Johnny and K. Mahardika. 2000. General Remarks On Fish Disease Diagnosis. Pp. 5-18. *Textbook for the Training Course on Fish Disease Diagnosis*. Lolitkanta-JICA Booklet No. 12.

Yuseff, M.I., Pierobon, P., Reversat, A., Lennon-Dumenil, A.M., 2013. How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity. *Nat. Rev. Immunol*, 13, 475-486.

Yuwono, T. 2005. *Biologi Molekuler*. Yogyakarta: Penerbit Erlangga.

Zou, J, Clarke M, Secombes CJ. 2003. Characterisation, expression and promoter analysis of an interleukin 10 homologue in the puffer fish, *Fugu rubripes*. *Immunogenetics*, 55, 325-335.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian.

Berikut ini merupakan alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian.

Alat penelitian	Bahan penelitian
<ul style="list-style-type: none"> Alat-alat yang digunakan untuk ekstraksi mikroalga laut <i>Spirulina</i> yaitu: erlenmeyer bertutup 300 ml, 1000 ml dan 2000 ml, beaker glass 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml dan 1000 ml, erlenmeyer 250 ml, 500 ml dan 1000 ml, timbangan digital, oven, magnetik stirer, botol vial, corong dan rotary vacuum evaporator. Alat-alat yang digunakan untuk identifikasi senyawa mikroalga laut <i>Spirulina</i> adalah gelas ukur 100 ml, spatula, erlenmeyer (50 ml, 100 ml, 250 ml, 1000 ml), set alat fitokimia, spektrofotometer <i>Ultraviolet-Visible</i>, spektrofotometer <i>Fourier Transform Infrared</i>. Alat-alat yang digunakan untuk uji In-vivo yaitu : akuarium 30x30x30, aerator, selang aerasi, batu aerasi, setio set, seser, 	<ul style="list-style-type: none"> Ikan kerapu cantang (<i>Epinephelus</i> sp) ± 7-10 cm yang berasal dari Balai Perikanan Budidaya Air Payau Situbondo, Jawa Timur. Mikroalga laut <i>Spirulina</i> yang berasal dari Balai Perikanan Budidaya Air Payau Situbondo, Jawa Timur Virus VNN berasal dari Balai Karantina Ikan Juanda, Surabaya, Jawa Timur. Pelarut metanol Kertas label Serat fiber, kapas, alumunium foil, kertas saring Whatman. Bahan untuk uji VNN dan β-actin Ethanol Dua pasang primer VNN F2 :5'-CGTGTCAAGTCATGTGTCGCT-3' R3 :5'-CGAGTCAACACGGGTGAAGA-3' NF2 :5'-GTTCCCTGTACAACGATTCC-3' NR3 :5'-GGATTTGACGGGGCTGCTA-3' (product size : 294 bp). Satu pasang primer β-actin F: 5-ATGGTACGCAAAGGTGAGAAGAAATTG-3 R: 5-CTGGGAGATTCTCGACATACC-3. Marker Reagen TRIZol® (invitrogen) Kloroform Isopropanol

toples plastik dan nampan.

Sedangkan peralatan untuk mengamati kualitas air digunakan pH meter,

thermometer dan DO meter.

- Alat yang digunakan untuk

analisa PCR yaitu :

Disetting set

(gunting+pinset), *Glass*

ware, mikropipet,

ependorff, mikrotube, tip

mikropipet, penggerus atau

pestle, sentrifus, inkubator,

vortex mixer, minispin,

timbangan analitik, *water*

bath,

thermalcycler(GeneAmp®

PCR System 9700),

encluser, *electrophoresis*

horizontal, *gel*

documentation, RNA/DNA

spektrofotometer (*Gene*

Quant pro), dan kamera

digital.

- Alkohol 75%

- DEPC

- *Staining solution* (6x loading dye)

- Kertas parafilm

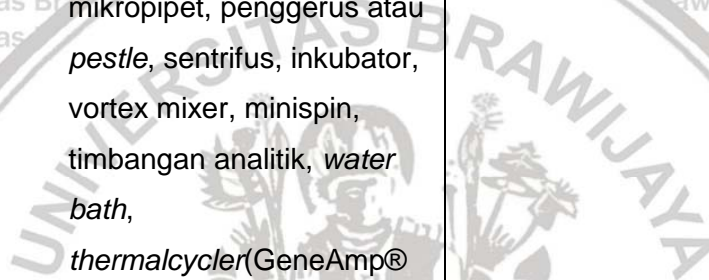
- Agarose

- Larutan TAE buffer

- SvBr save (invitrogen)

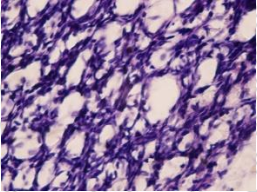
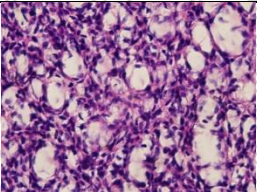
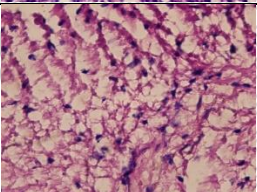
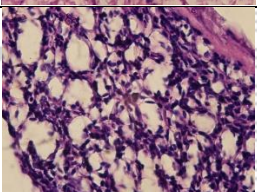
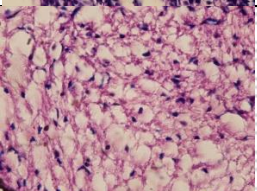
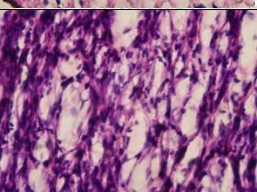
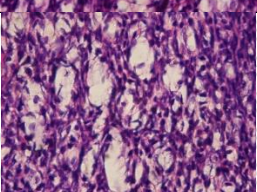
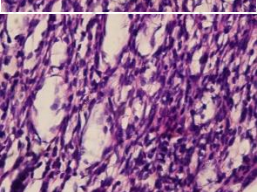
- Antibody Monoclonal Anti-β-aktin

(AC-15)



Lampiran 2. Hasil respon imunologis ikan kerapu cantang.

Berikut ini merupakan gambaran sel tentang respon imunologis pada ikan kerapu cantang, ditinjau dari jumlah eritrosit, neutrofil, basofil, dan platelet.

Perlakuan	Jumlah rata-rata respon imunologis				Gambar
	Eritrosit	Neutrofil	Basofil	Platelet	
K	22	23	16	9	
V	30	35	21	38	
S1	18	13	4	4	
S2	24	17	8	4	
S3	8	6	5	3	
SV1	23	28	8	7	
SV2	30	37	8	11	
SV3	28	33	13	19	

Lampiran 3. Hasil analisa data RAL faktorial.

Berikut ini merupakan hasil analisa rancangan acak lengkap faktorial dengan 8 perlakuan dan 3 ulangan.

	K	PERLAKUAN							
		S1	S2	S3	V	SV1	SV2	SV3	
ULANGAN	1	19,70%	50%	64,20%	66,60%	63,90%	60,30%	65,50%	61,20%
	2	27,40%	58,30%	60,10%	52,50%	53,50%	61,10%	63,50%	66,60%
	3	26,50%	62,90%	65,80%	71,50%	73,50%	66,90%	65,20%	63,20%
RATA - RATA		24,53%	57,07%	63,37%	63,53%	63,63%	62,77%	64,73%	63,67%

95% Confidence Interval for Mean

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum
K	3	24.5333	4.20991	2.43059	14.0753	34.9913	19.70	27.40
S1	3	57.0667	6.53784	3.77462	40.8258	73.3076	50.00	62.90
S2	3	63.3667	2.93995	1.69738	56.0634	70.6699	60.10	65.80
S3	3	63.5333	9.86425	5.69512	39.0292	88.0375	52.50	71.50
V	3	63.6333	10.00267	5.77504	38.7853	88.4813	53.50	73.50
SV1	3	62.7667	3.60185	2.07953	53.8192	71.7142	60.30	66.90
SV2	3	64.7333	1.07858	.62272	62.0540	67.4127	63.50	65.50
SV3	3	63.6667	2.73008	1.57621	56.8848	70.4486	61.20	66.60
Total	24	57.9125	14.00709	2.85918	51.9978	63.8272	19.70	73.50

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.051	7	16	.111

Ket : - jika nilai signifikansi > 0,05 maka distribusi data adalah homogen
 - jika nilai signifikansi < 0,05 maka distribusi data adalah tidak homogen

Hasil ANOVA

SK	JK	Db	KT	F hit	F tab 5%	F tab 1%
Perlakuan	3936.453	7	562.350	15.618	2.66	4.03
Galat	576.113	16	36.007			
Total	4512.566	23				

Ket : $F_{hitung} > F_{tabel}$, berbeda nyata sehingga dilanjutkan ke uji BNT

$$\begin{aligned} \text{SED} &= \frac{\sqrt{2} \text{KTG}}{n \text{ (perlakuan)}} \\ &= \frac{\sqrt{2} \times 36,007}{16} \\ &= 2,12 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{BNT } 5\% &= T \text{ Tabel } 5\% \cdot \text{SED} \\ &= 1,74588 \times 2,12 \\ &= 3,701 \end{aligned}$$

Tabel BNT

P	Rata-rata β -aktin	24.5333	57.0667	62.7667	63.3667	63.5333	63.6333	63.6667	64.7333	notasi	BNT 5%
K	24.5333		32,5334	38,2334	38,8334	39	39,1	39,1334	40,2	A	
S1	57.0667			5,7	6,3	6,4666	6,5666	6,6	7,6666	B	
SV1	62.7667				0,6	0,7666	0,8666	0,9	1,9666	C	
S2	63.3667					0,1666	0,2666	0,3	1,3666	C	3,701
S3	63.5333						0,1	0,1334	1,2	C	
V	63.6333							0,0334	1,1	C	
SV3	63.6667								1,0666	C	
SV2	64.7333									C	

Ket : Hasil uji BNT menunjukkan bahwa perlakuan K tidak sama dengan perlakuan S1, perlakuan K dan perlakuan S1 memiliki pengaruh yang berbeda dengan perlakuan SV1, S2, S3, V, SV3, dan SV2, akan tetapi perlakuan SV1, S2, S3, V, SV3, dan SV2 memiliki pengaruh yang sama.

Lampiran 4. Hasil pengukuran kualitas air ikan kerapu cantang.

Berikut ini merupakan hasil analisa kualitas air selama pemeliharaan ikan, hasil kualitas air meliputi suhu, salinitas, pH, dan oksigen terlarut.

- Tabel hasil pengukuran suhu (°C)

Suhu	K	V	S1	S2	S3	SV1	SV2	SV3
Hari ke 0	30	30	29	29	30	29	29	30
Hari ke 3	30	29	30	29	30	30	29	30
Hari ke 6	29	29	30	29	30	29	29	30
Hari ke 9	31	32	32	32	31	31	31	32
Hari ke 12	33	33	32	33	33	32	33	32
Hari ke 15	30	29	30	30	29	29	30	30

- Tabel hasil pengukuran salinitas (ppt)

Salinitas	K	V	S1	S2	S3	SV1	SV2	SV3
Hari ke 0	33	33	33	34	33	35	33	34
Hari ke 3	33	33	35	33	34	35	34	33
Hari ke 6	35	34	34	35	35	35	34	34
Hari ke 9	34	33	33	33	34	33	34	33
Hari ke 12	35	35	34	35	34	34	34	35
Hari ke 15	34	35	35	35	35	34	35	34

- Tabel hasil pengukuran derajat keasaman (pH)

pH	K	V	S1	S2	S3	SV1	SV2	SV3
Hari ke 0	8,1	8,3	8,4	8,1	8,3	8,3	8,4	8,0
Hari ke 3	8,3	8,1	8,1	8,3	8,3	8,4	8,1	8,2
Hari ke 6	8,2	8,2	8,3	8,4	8,4	8,3	8,1	8,2
Hari ke 9	8,2	8,3	8,3	8,4	8,2	8,1	8,0	8,1
Hari ke 12	8,4	8,2	8,3	8,0	8,3	8,3	8,2	8,3
Hari ke 15	8,3	8,1	8,2	8,2	8,3	8,1	8,0	8,2

- Tabel hasil pengukuran oksigen terlarut (DO)

DO	K	V	S1	S2	S3	SV1	SV2	SV3
Hari ke 0	8,8	8,9	8,9	8,9	8,8	9,0	9,1	9,0
Hari ke 3	8,9	8,9	9,0	9,0	8,9	9,2	8,8	8,9
Hari ke 6	9,2	9,1	9,2	9,2	8,9	8,8	8,9	8,9
Hari ke 9	9,1	9,0	8,9	9,0	9,1	8,9	9,0	8,8
Hari ke 12	8,9	9,0	8,9	8,9	9,0	9,0	8,8	8,9
Hari ke 15	8,8	8,9	9,1	9,1	8,9	8,8	9,0	8,9

Lampiran 5. Dokumentasi hasil penelitian.

Berikut ini merupakan dokumentasi hasil penelitian tesis mulai dari proses awal sampai selesai penelitian.

No	Kegiatan Penelitian	Keterangan
1		<p>Penimbangan bubuk <i>Spirulina</i> sp yang akan diekstraksi.</p>
2		<p>Proses ekstraksi bubuk <i>Spirulina</i> sp menggunakan pelarut metanol PA</p>
3		<p>Proses penyaringan hasil ekstraksi bubuk <i>Spirulina</i> sp</p>



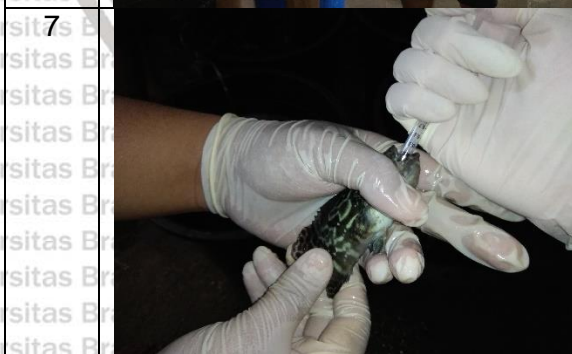
Proses evaporasi



Hewan uji ikan kerapu cantang (Epinephelus sp)



Proses pemberian ekstrak kasar *Spirulina* sp pada hewan uji



Proses uji in vivo pada ikan

8



Proses pengukuran kualitas air pada media pemeliharaan ikan kerapu cantang

9



Proses isolasi organ target

10



Proses pengamatan hasil penelitian