

**LAPORAN AKHIR  
PENELITIAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI (U)**



**EKSPLORASI KARAKTER MOLEKUL PERIDININ CHLOROPHYL  
CELL PIGMEN (PCP) ALGA *Nannochloropsis oculata* DAN *Hallimeda* sp:  
UPAYA PENGEMBANGAN PENGENDALIAN PENYAKIT VIRUS PADA  
IKANI BERBASIS BAHAN HAYATI**

**Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun**

**Ketua/Anggota Tim**  
Ketua : Dr. Uun Yanuhar, SPl., MSi (NIDN: 0004047304)  
Anggota : Prof. Ir. Sukoso, MSc. Ph.D (NIDN: 0019096404)  
: Prof. Ir. Diana Arfiati, MS (NIDN: 0030125906)

Dibiayai oleh :  
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi,  
Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan, Melalui DIPA Universitas Brawijaya  
Nomor : DIPA-023.04.2.414989/2013, Tanggal 5 Desember 2012, dan berdasarkan  
SK Rektor Universitas Brawijaya Nomor : 295/SK/2013 tanggal 12 Juni 2013

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
NOPEMBER 2013**

## HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Eksplorasi Karakter Molekul Peridinin Chlorophyl Cell Pigmen (PCP) Alga *Nannochloropsis oculata* dan *Hallimeda sp.* Upaya Pengembangan Pengendalian Penyakit Virus Pada Ikani Berbasis Bahan Hayati

Peneliti/Pelaksana  
Nama Lengkap : Dr. Uun Yanuhar, SPI., MSI  
NIDN : 0004047304  
Jabatan Fungsional : Lektor Kepala  
Program Studi : Manajemen Sumberdaya Perairan  
Nomor HP : 081931962262  
Alamat surel (e-mail) : uunyanuhar@yahoo.com, doktoruun@ub.ac.id  
Anggota (1)  
Nama Lengkap : Prof. Ir. Diana Arfiati, MS  
NIDN : 0030125906  
Perguruan Tinggi : Universitas Brawijaya Malang  
Anggota (2)  
Nama Lengkap : Prof. Ir. Sukoso, MSc. Ph.D  
NIDN : 0019096404  
Perguruan Tinggi : Universitas Brawijaya Malang

Institusi Mitra (jika ada)  
Nama Institusi Mitra : -  
Alamat : -  
Penanggung Jawab : -

Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun  
Biaya Tahun Berjalan : Rp. 275.000.000,-  
Biaya Keseluruhan : Rp. 575.000.000,-

Malang, 9 Desember 2013

Ketua,

  
(Dr. Uun Yanuhar, SPI., MSI)  
NIP. 197304042002122001

  
Mengetahui,  
Dekan,  
  
(Prof. Dr. Ir. Diana Arfiati, MS)  
NIP. 195912301985032002

Menyetujui,  
Pjs. Ketua LPPM UB  
  
(Prof. Dr. Ir. Siti Chuzaemi, MS)  
NIP. 19530514 198002 2 001

## ABSTRAK

Komoditas ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) sebagai salah satu andalan komoditas ekspor di bidang perikanan dan kelautan sampai saat ini, yang mempunyai permasalahan pada industri budidaya karena serangan virus RNA Viral Nervous Necrotik (VNN). Penelitian ini juga mengeksplorasi protein yakni Peridinin Chlorophyl Protein (PCP) dari alga laut *N. oculata* dan *Halymeda* sp. untuk bahan anti viral. Tujuan jangka panjang penelitian ini adalah mendapatkan bahan peridinin chlorophyl (PCP) alga *Nannochloropsis oculata* (*N. oculata*) sebagai inducer P56 untuk inhibitor virus RNA VNN dalam meregulatory viabilitas imun melalui ekspresi MHC I dan Toll Like Receptor (TLR) pada ikan kerapu. Tujuan khusus penelitian ini yang sudah dicapai adalah dihasilkan metode isolasi dan produk PCP yang telah diujikan pada ikan kerapu uji secara imunisasi dan oral. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksplorasi laboratorium dan uji lapang. Materi uji adalah PCP pada ikan kerapu dan ikan kerapu tikus yang terinfeksi VNN masing-masing dengan PCP alga laut. Hasil pengujian PCP adalah mampu memberikan respon ketahanan imun ikan kerapu adalah dengan meningkatkan viabilitas tubuh dan kelulushidupan ikan kerapu terhadap serangan virus VNN. Hasil viabilitas imun ikan pada tahap awal yang terekspresi yakni adalah P56 sebagai protein yang berfungsi untuk menghambat proliferasi virus VNN, yang akan dibuktikan lebih lanjut. Viabilitas imun ikan kerapu tikus selain P56 yang terekspresi adalah Toll Like Receptor (TLR) 11 dan MHC I sebagai respon antiviral RNA VNN dengan teknik imunokimia. Pada penelitian terdahulu sudah dapat dilihat dari respon awal CD4, CD8, TNF alfa, Ifn gamma, yang berfungsi memberikan ketahanan seluler terhadap infeksi patogen. Kesimpulan penelitian adalah bahwa PCP yang diberikan pada ikan baik secara imunisasi maupun oral dapat menginduksi terekspresinya P56 yang berfungsi awal sebagai penghambat proliferasi virus, yang akan dibuktikan lebih lanjut pada ikan kerapu tikus secara molekuler. Penelitian selanjutnya direkomendasikan untuk membuat PCP secara masal dan menguji bahan tersebut pada ikan di lapang pada skala yang lebih besar dan jumlah ikan yang lebih banyak dari *Nannochloropsis oculata* sebagai bahan antiviral yang dapat dibuktikan secara proteomik dan genomik dalam mengeliminasi virus RNA VNN sebagai penyebab kematian utama ikan kerapu.

**Kata-kata kunci :** imun, kerapu tikus, PCP, RNA VNN, P56

## ABSTRACT

Humpback grouper (*Cromileptes altivelis*) is one of the main export commodities in the field of fisheries and marine to date. These commodities have a problem in the aquaculture industry because of RNA virus attack i.e VNN. Through this research has generated research information that is based on the results of initial exploration has produced isolation method PCP algae *Nannochloropsis oculata* (*N. oculata*) and *Halymeda* sp. for anti-viral. The long-term goal of this research is to obtain material peridinin chlorophyl (PCP) algae *N. oculata* as an inducer of P56 to inhibit RNA viruses viral nervous necrotic (VNN) in the regulator of the immune viability of the grouper. The specific aims of this study have been achieved is the method of isolation and the product of crude PCP that has been tested on grouper by immunization. The initial test results of PCP in the form of crude protein are able to provide immune defence responses of grouper by increasing the body's viability and survival of grouper VNN virus attacks. These results can be seen from the initial response of CD4, CD8, TNF alpha, IFN gamma and MHC with immunochemical examination. These results provide initial protection system in response to mouse grouper. Future studies will be recommended to make pure PCP from *N. oculata* and or *Halimeda* sp. As an antiviral substance as evidenced in proteomics and genomics in eliminating viral RNA VNN as the leading cause of death for grouper

**Keywords :** *Cromileptes altivelis*, immune, PCP, RNA VNN, P56

## RINGKASAN

Ikan kerapu tersebar luas di perairan pantai baik di daerah tropis maupun sub tropis, dan termasuk jenis ikan yang hidup di perairan berkarang sehingga sering dikenal sebagai ikan karang (*coral reef fish*). Ikan kerapu tikus termasuk satu diantara jenis kerapu yang paling banyak diminati konsumen baik sebagai ikan hias (pada ukuran juvenil 3-5 cm) yang dikenal dengan nama *Grace Kelly* atau *Polka dot Grouper*, maupun sebagai pasok restoran "sea food" (pada ukuran konsumsi 400-800 gram). Ikan Kerapu tikus *Cromileptes altivelis* hingga saat ini merupakan salah satu andalan komoditas ekspor di bidang perikanan dan kelautan, bahkan menurut program pengembangan riset kelautan dan perikanan komoditi ini terus dikembangkan hingga tahun 2020 pembenihannya. Masalah yang muncul dalam budidaya ikan kerapu tikus adalah kematian massal yakni mencapai 100% diakibatkan oleh infeksi virus yang disebut Viral Nervous Necrotic (VNN). Komoditi ikan ini yang disebut dengan *Cromileptes altivelis* (C. altivelis) banyak sekali terkendala oleh patogen. Infeksi patogen tersebut adalah virus Viral Nervous Necrotic (VNN) RNA yang paling hingga saat ini merupakan penyebab kematian masal pada benih ikan kerapu, dan merupakan masalah yang sangat serius dan umum menyerang ikan-ikan budidaya laut. Penularannya dapat melalui air atau kontak langsung antar ikan dan menyebar sangat cepat pada ikan-ikan yang dipelihara dengan kepadatan tinggi.

Salah satu upaya tubuh untuk mempertahankan diri terhadap masuknya antigen yakni virus VNN RNA adalah dengan cara meniadakan antigen tersebut, secara non spesifik yaitu dengan cara fagositosis. Dalam hal ini, tubuh memiliki sel-sel fagosit yang termasuk ke dalam 2 kelompok sel, yaitu kelompok sel agranulosit dan granulosit. Kelompok sel agranulosit adalah monosit dan makrofag, sedangkan yang termasuk kelompok sel granulosit adalah neutrofil, basofil, eosinofil yang tergolong ke dalam sel PMN (*polymorphonuclear*). Respon imun diklasifikasikan menjadi 2 kategori, yaitu respon imun spesifik dan non-spesifik. Respon imun spesifik bergantung pada adanya pemaparan benda asing dan pengenalan selanjutnya, kemudian reaksi terhadap antigen tersebut. Sel yang memegang peran penting dalam sistem imun spesifik adalah limfosit. Limfosit berfungsi mengatur dan bekerja sama dengan sel-sel lain dalam sistem fagosit makrofag untuk menimbulkan respon imunologik. Limfosit seperti halnya monosit, termasuk kelompok sel agranulosit tetapi terdapat perbedaan fungsi antara limfosit dan monosit. Monosit berperan dalam respon imun non spesifik, sedangkan limfosit berperan dalam respon imun spesifik. Selain itu, ada juga sel bernama *Macrophage* (makrofag), yang biasanya berasal dari monosit. Makrofag bersifat fagositosis, menghancurkan sel lain dengan cara memakannya dan mempresentasikan antigen (*Antigen Presenting Cell*), yang bagian permukaannya tertempel reseptor antigen yang hanya dapat mengenali satu antigen. Saat antigen memasuki sel tubuh, molekul tertentu mengikatkan diri pada antigen dan memunculkannya di hadapan limfosit dan molekul ini dikenal sebagai molekul MHC. MHC I menghadirkan antigen dihadapan limfosit T sitotoksik untuk mengeleminir virus kehadiran sel T

Penelitian ini telah membedah fungsi salah satu molekul yang berperan penting dalam mempresentasikan antigen adalah molekul MHC dan TCR melalui fungsi Toll Like Receptor (TLR) yang dalam fungsi imunnya dapat mengatur terekspresinya Protein (P56) sebagai penanda untuk menekan proliferasi virus. Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui ekspresi P56, MHC I dan TLR sebagai penanda terhambatnya proliferasi

virus yang sudah diberikan perlakuan PCP dari alga laut, sehingga PCP ini dapat digunakan untuk bahan fitofarmaka laut/antiviral yang ramah lingkungan.

Tujuan jangka panjang penelitian ini adalah mendapatkan bahan peridinin chlorophyll (PCP) mikroalga laut *Nanochloropsis oculata* (*N. oculata*) dan *Halimeda* sp untuk upaya pengembangan pengendalian penyakit virus pada ikan berbasis bahan hayati. Tujuan khusus penelitian yang sudah dicapai dalam penelitian tahap I adalah terisolasi dan terisolasinya PCP alga laut *N. oculata* dan *Halimeda* sp. Sebagai bahan crude protein untuk anti viral VNN. Penelitian ini akan dibuktikan secara proteomik dan genomik dengan melihat terbentuknya inducer didalam ikan yang berfungsi untuk mengeliminasi virus RNA VNN. Fungsinya inducer adalah untuk meregulasi viabilitas sistem imun pada ikan kerapu sehingga dapat meningkatkan sistem viabilitas atau ketahanan dan kelulushidupan ikan kerapu budidaya sebagai salah satu komoditi unggulan di sektor perikanan dan kelautan. Target khusus penelitian yakni diperolehnya indikator keberhasilan mengisolasi PCP. Metode penelitian untuk mencapai target penelitian adalah mengeksplorasi berbagai metode isolasi PCP, mengisolasi crude PCP, mengujinya secara in vitro dan in vivo, mempurifikasi PCP, modifikasi metode isolasi, menguji bahan isolat crude PCP secara in vitro dan in vivo pada ikan kerapu tikus, dan mengukur respon imun seluler ikan sebagai respon viabilitas imun dan anti virus RNA.

VNN yakni ekspresi molekul CD4, CD8, NK cell, MHC, IFN gamma. Penelitian Tahap I yakni telah dihasilkan eksplorasi dan eksperimen meliputi pengumpulan isolat alga laut, kultur mikroalga laut *N. oculata*, eksplorasi dan isolasi protein atau molekul protein PCP dari alga laut *N. oculata* dan *Halimeda* sp., isolasi virus (VNN) pada ikan kerapu tikus terinfeksi VNN, ekstraksi dan identifikasi crude PCP protein, pengujian crude PCP, purifikasi dan perbanyak isolat PCP, pelabelan PCP, pengujian protein PCP pada ikan kerapu. Pengukuran respon imun awal dengan pemberian PCP pada ikan kerapu menunjukkan terbentuknya respon antivirus yakni terbentuknya molekul MHC kelas I, sel CD4, CD8, IFN gamma, dan TNF alfa dalam fungsinya membentuk protein P56 dan telah dibuktikan ekspresinya secara kualitatif, dan secara molekuler penanda antiviral ini akan akan dibuktikan dalam penelitian tahap II pada tahun berikutnya. P56 sebagai protein yang terbentuk didalam sel inang berfungsi sebagai induktor dalam menghambat proliferasi virus RNA VNN yang mengakibatkan kematian ikan kerapu pada berbagai stadia hingga seratus persen. Ekspresi P56 ini dibarengi dengan terkespresinya sel imun yakni MHC I dan TLR (TLR11) pada ikan kerapu tikus. Pada Tahap II akan dilakukan pengujian produk PCP untuk kekebalan ikan kerapu tikus secara lapang dengan produk PCP yang lebih banyak dan jumlah ikan pada berbagai stadia. Pengujian ini akan dibuktikan secara proteomik dan genomik masing-masing respon antiviral pada ikan kerapu tikus melalui pemeriksaan seluler dengan flowcytometry, dan genomik dengan DNA/RNA tracker. Luaran penelitian keseluruhan adalah produk PCP sebagai bahan antiviral dan prototipe ikan kerapu yang sudah mempunyai kekebalan

## SUMMARY

Grouper are widespread in coastal waters both in the tropics and sub-tropics, and includes species of fish that live in coral waters so often known as reef fish (coral reef fish). The humpback grouper was included among the most demanding consumers both as ornamental fish (3-5 cm in size juvenile), known by the name of Grace Kelly or Polka Dot Grouper and as restaurant supplies "sea food" (the size of consumption 400 -800 grams). Humpback grouper *Cromileptes altivelis* today is one of mainstay export commodities in the field of fisheries and marine, even according to the development program of marine research and fisheries commodities continue to be developed till 2020. Problems that arise in grouper culture is mass mortality reaching 100 % caused by infection with a virus called Viral Nervous Necrotic (VNN). This fish commodity called *Cromileptes altivelis* (*C. altivelis*) once constrained by many pathogens. The pathogen is a virus infection Viral Nervous Necrotic (VNN) RNA most to this day is the cause of the mass mortality of grouper seed, and is a very serious problem and a general attack fish aquaculture. Transmission can be through direct contact between the water or the fish and spread very rapidly in fish reared at high density.

One of the body's attempt to defend itself against the entry of the viral antigen RNA VNN is to negate these antigens, a non-specific manner by way of phagocytosis. In this case, the body has phagocytic cells that belong to the second group of cells, groups of cells and granulocytes agranulosis. Agranulosis cell groups are monocytes and macrophages, whereas the group of cells including granulocytes are neutrophils, basophils, eosinophils cells belonging to the PMN (polymorphonuclear). The immune response is classified into two categories, namely the specific immune response and non-specific. Specific immune response depends on the presence of a foreign body exposure and subsequent recognition, then the reaction to the antigen. Cells that play an important role in the specific immune system are lymphocytes. Regulate lymphocyte function and cooperate with other cells in the macrophage phagocytic system to cause an immunologic response. Lymphocytes as well as monocytes, including cell group agranulosis but there is a difference between the lymphocyte and monocyte function. Monocytes play a role in non-specific immune response, whereas lymphocytes play a role in the specific immune response. In addition, there is also named Macrophage cells (macrophages), which are usually derived from monocytes. Macrophages are phagocytes, destroy other cells by means eat it and present antigens (Antigen Presenting Cell), which attaches to its surface antigen receptors that can recognize only one antigen. When an antigen enters the body's cells, specific molecules bind to the antigens and bring it up in the presence of lymphocytes and molecules known as MHC molecules. MHC I presenting antigen in front of cytotoxic T lymphocytes to eliminate viral presented to T cells

This research has been to explore the function of one molecule that plays an important role in antigen presentation and TCR is an MHC molecule through Toll-Like Receptor function (TLR) that the refugees can regulate expressed immune Protein (P56) as a marker to suppress viral proliferation. This study aimed to determine the expression of P56, MHC I and TLR as a marker of proliferation inhibition of virus that had been given the treatment of PCP sea alga, so the PCP can be used for marine phytopharmaca materials / antivirals that are environmentally friendly.

The long term goal of this research is to get the material peridinin chlorophyll (PCP) marine microalgae *Nanochloropsis oculata* (*N. oculata*) and *Halimeda* sp for viral disease control efforts on the development of fish bio-based materials. The specific objective of the research that has been achieved in the first phase of the study was the isolation of PCP from marine algae *N. oculata* and *Halimeda* sp. as crude materials for anti-viral proteins VNN. This study will be proved in proteomics and genomics to see the formation of an inducer in fish that serve to eliminate the VNN virus RNA. Its function is for regulatory inducer viability in the grouper immune system so as to improve system robustness and viability or survival of grouper

aquaculture as one of the leading commodities in fishery and marine sector. Specific target research gained success indicators isolate the PCP. Research methods to achieve the target of the research is to explore the various methods of isolation of PCP, PCP crude isolate, tested in vitro and in vivo, purifying PCP, a modified method of isolation, test materials PCP crude isolates in vitro and in vivo in grouper, and measure the response fish cellular immune response and antiviral immune viability RNA VNN the expression of molecules CD4, CD8, NK cells, MHC, IFN gamma. Phase I study that has generated exploration and experimentation involves collecting isolates of marine algae, marine microalgae culture *N. oculata*, exploration and isolation of proteins or protein molecules from PCP marine algae *N. oculata* and *Halimeda* sp., virus isolation (VNN) in infected grouper VNN, extraction and identification of PCP crude protein, crude PCP testing, purification and propagation isolates PCP, PCP labeling, testing the grouper PCP proteins. Measurement of the initial immune response by the administration of PCP on grouper showed the formation of the antiviral response of the formation of class I MHC molecules, CD4, CD8, IFN gamma and TNF alpha in forming protein P56 and its function has been demonstrated qualitatively expression, and molecular markers of antiviral will be demonstrated in a phase II study in the following year. P56 as a protein that builds up in the inductor serves as host cells to inhibit the proliferation of viral RNA that resulted in the death of VNN grouper at various stadia up to one hundred percent. P56 expression is accompanied by expressing immune cells such the MHC I and TLR (TLR11) on humpback grouper. Phase II will be conducted immunity testing products PCP for humpback grouper is roomy with product PCP more than the number of fish in the various stadia. This test will prove in proteomics and genomics each antiviral response in grouper through cellular examination with flowcytometry, and genomic DNA / RNA tracker. Outcomes research as a whole is product PCP as antiviral ingredients and grouper prototype that already have immunity to the virus VNN.



bahwa PCP bermanfaat untuk antioksidan, suplemen makanan, bahan imunomodulasi, dan antiviral.

Kesimpulan penelitian ini dibuktikan bahwa protein PCP *N. oculata* mikroalga laut dapat di ekstraksi dan di isolasi menggunakan glisin setelah melalui tahapan ekstraksi, hasil isolasi PCP dengan glisin tersebut akan dipurifikasi, dan dibuktikan fraksinasi PCP-nya menggunakan SDS-Page. Saran penelitian adalah melakukan uji isolasi dengan konsentrasi yang lebih tinggi dari 50 mM.

#### Ucapan terima kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Nasional melalui program penelitian unggulan Perguruan Tinggi BOPTN 2013, dengan surat perjanjian No. NO.528/UN 10.21/KU/2013 Tanggal 16 Mei 2013.

#### Daftar Pustaka

- Cohen, Zeis. 1999. *Chemical microalga*. Taynor and Fancis
- Dewoto H.R. 2007. *Pengembangan Obat Tradisional Indonesia Menjadi Fitofarmaka: untuk Pemanfaatan pada Pelayanan Kesehatan*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Fisher Tamar, johanna Minnaard, Zvy Dubinsky 1996. *Photoacclimation in the Marine Alga, Nannochloropsis sp (Eustigmatophyte): a kinetic study*. Volume 18 no 10
- Hidayati, N., Mohadi, R dan T. Ginting. 2010. *Karakterisasi Senyawa Kompleks Cu(II)-Glisin Dengan Menggunakan Spektroskopi Uv-Vis Dan Ft. Ir*. Jurusan Kimia Fmipa, Universitas Sriwijaya
- Hofmann *et.al* 2004. *Structural Basis Of Light Harvesting By Carotenoids: Peridinin-Chlorophyll Protein From Amphidinium carterae*. Science, New Series, Vol.272, No 5269 (1788-1791) USA
- Kilian O, Benemann CSE, Niyogi KK, Vick B. 2011. *High-efficiency homologous recombination in the oil-producing alga Nannochloropsis sp*. Proc Natl Acad Sci USA 108:21265–21269.

- Kingham, B., S.P. Riley And A. Robson. 1971. The Extraction of a Protein Fraction Rich in Glycine, Serine, Tyrosine and Phenylalanine. Department of Textile Industries. University of Leeds, Leeds LS2 9JT, U.K
- Pramono, L.A. 2009. Pengobatan Herbal: Menuju Era Fitofarmaka Nasional yang Berdaya Saing Internasional. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Putra, S.E. 2008. Alga Laut sebagai Biotarget Industri. [www.chem-is-try.org](http://www.chem-is-try.org) diakses pada 19 Juni 2013
- Ogata et. al. 1994. A novel peridinin-chlorophyll a protein (PCP) from the marine dinoflagellate *Alexandrium cohorticola*: a high pigment content and plural spectral forms of peridinin and chlorophyll a. Federation of European Biochemical Societies FEBS Letters 356 (1994) 367-371
- Sahbana, E., et al. 2008. Analisa Kandungan Nutrisi dan Pigmen Mikroalga Laut *Nannochloropsis* sp. Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Lampung Bandar Lampung
- Sukenik, A., Carmeli, Y. and Berner, T. 1989. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. J. Phycol. 25, 686-69
- Weis, Virginia M., E. Alan Verde, Wendy S Reynold. 2002. Characterization of A Short Form *Peridinin-Chlorophyll Protein* (PCP) cDNA and Protein From The Symbiotic Dinoflagellate *Symbiodinium muscatinei* (Dinophyceae) From The Sea Anemone *Anthopleura elegantissima* (Cnidaria). J. Phycol. 38: 157-163 (2002).