

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ikan ekor kuning (*Seriola quinqueradiata*) merupakan salah satu jenis ikan yang sangat populer dijadikan sebagai bahan baku menu sushi dan sashimi khususnya di Jepang. Hidangan sushi dan sashimi yang menggunakan ikan ekor kuning sebagai bahan baku juga dikenal dengan nama 'Buri'. Hidangan ini secara tradisional sangat populer untuk dikonsumsi (Thakur et al., 2002). Tren mengonsumsi ikan mentah sangat populer bahkan di seluruh dunia. Seiring meningkatnya permintaan mengenai pasokan daging ikan mentah yang segar, budidaya ikan dilakukan untuk memenuhi permintaan tersebut secara terus-menerus. Sementara itu, kualitas daging ikan budidaya diyakini tidak lebih baik dibandingkan dengan ikan yang ditangkap langsung di alam liar, sehingga penelitian terus dilakukan untuk meningkatkan kualitas daging ikan yang dihasilkan dari kegiatan budidaya tersebut.

Kualitas daging ikan sangat mempengaruhi preferensi konsumen sehingga sangat penting untuk dipertahankan semaksimal mungkin (Cheng et al., 2014). Daging ikan memiliki nilai gizi yang tinggi karena mengandung makronutrien yang penting bagi tubuh manusia seperti protein. Namun, secara keseluruhan komposisi makronutrien dalam daging ikan dapat berubah disebabkan oleh berbagai faktor, salah satunya adalah pemberian pakan dan metode budidaya yang diterapkan.

Penelitian terus dilakukan untuk meningkatkan formulasi pakan dan praktik akuakultur yang inovatif. Salah satu pendekatan yang banyak dipelajari belakangan ini adalah aplikasi senyawa atau komponen bioaktif dari berbagai spesies termasuk serangga. Serangga merupakan salah satu sumber protein yang menjanjikan untuk digunakan dalam formulasi pakan ikan dan memiliki berbagai zat bermanfaat yang diyakini mampu mengoptimalkan kesehatan, pertumbuhan dan perkembangan hewan dalam praktik budidaya..

Bombyx mori merupakan salah satu spesies ulat sutera yang dibudidayakan karena memiliki peran penting terutama dalam mendukung industri benang sutera. Pupa merupakan salah satu hasil samping dari industri pembuatan sutera, yang tidak dimanfaatkan sehingga umumnya terbuang menjadi limbah. Pupa ulat sutera yang diekstrak mengandung berbagai senyawa aktif, termasuk polisakarida yang dikenal dengan nama dagang silkrose (Reg. No. 5621497). Menurut Ali et al. (2021a), polisakarida tersebut dapat digunakan secara praktis dalam akuakultur, khususnya



memiliki industri benang sutera, sehingga menunjukkan antara industri akuakultur dan serikultur di masa depan.

Untuk pertama kali dilaporkan oleh kelompok peneliti yang berasal dari Jepang (Ohta et al., 2016), berdasarkan temuannya didapatkan bahwa ekstrak polisakarida dapat menstimulasi imunitas tubuh organisme yang diujikan pada ikan mas (C. auratus) dengan menggunakan ekstrak polisakarida RAW264 yang berasal dari murin. Kajian untuk menguji zat aktif polisakarida tersebut sebelumnya diisolasi dari beberapa jenis serangga termasuk yang

berasal dari pupa *B. mori* (Silkrose-BM) dalam pakan budidaya pada beberapa spesies organisme telah dilakukan, seperti pada *white trevally* (*Pseudocaranx dentex*) yang terbukti efektif dalam mencegah infeksi ektoparasit (Miura et al., 2022), pada spesies udang *Litopenaeus vannamei* dan *Marsupenaeus japonicus*, silkrose terbukti mampu melawan vibriosis (Ali et al., 2018), serta pada ikan medaka jepang (*Oryzias latipes*) terbukti mampu meningkatkan kelangsungan hidup dan mengurangi konsentrasi bakteri dalam ginjal medaka jepang yang terinfeksi *Edwardsiella tarda* (Ali et al., 2021b). Namun, analisis selanjutnya menunjukkan bahwa efeknya tidak berhenti pada stimulasi kekebalan tubuh organisme dan pertumbuhannya, tetapi juga mencakup toleransi terhadap suhu air yang tinggi sehingga menurunkan tingkat stres pada ikan yang diduga berpengaruh terhadap struktur serat otot yang berdampak pada kualitas daging ikan (Miura et al., 2023).

Penelitian mengenai kualitas daging ikan yang dihasilkan dengan pemberian pakan diet silkrose pada organisme budidaya masih sangat terbatas sehingga penelitian ini sangat penting untuk dilakukan. Melalui pendekatan ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan yang lebih mendalam tentang perubahan kualitas yang terjadi pada daging ikan ekor kuning sebagai respon terhadap zat fungsional yang terkandung dalam silkrose-BM yang berasal dari pupa ulat sutera.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana pengaruh pemberian pakan komersial EP dan silkrose-BM terhadap komposisi proksimat, pH, perubahan warna, dan kandungan kolagen total daging ikan ekor kuning?
2. Bagaimana pengaruh pemberian pakan komersial EP dan silkrose-BM terhadap struktur histologi dan ekspresi gen daging ikan ekor kuning?

1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini yaitu:

1. Menganalisis pengaruh pemberian pakan komersial EP dan silkrose-BM terhadap komposisi proksimat, pH, perubahan warna, dan kandungan kolagen total daging ikan ekor kuning
2. Menganalisis pengaruh pemberian pakan komersial EP dan silkrose-BM terhadap struktur histologi dan ekspresi gen daging ikan ekor kuning

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan informasi tentang perbandingan kualitas daging ikan yang dihasilkan dari pemberian pakan yang mengandung satu pakan yang mengandung limbah pupa *B. mori* sebagai pakan buatan yang dapat meningkatkan kualitas daging ikan



1.4 Hipotesis

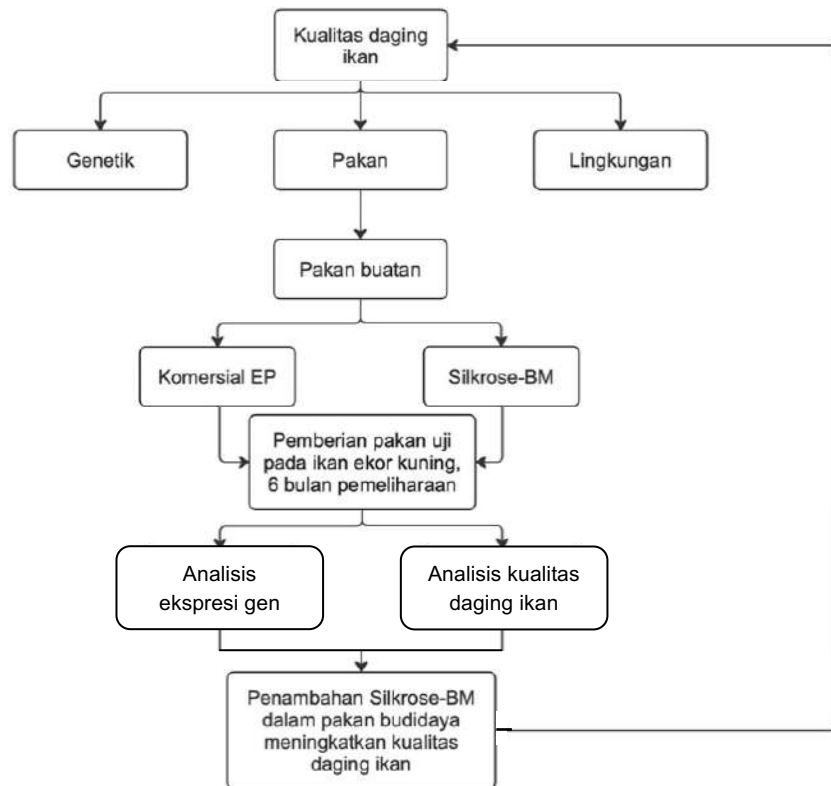
Berdasarkan tujuan penelitian, maka hipotesis yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Kualitas daging ikan yang diberi pakan diet silkrose-BM lebih baik, ditinjau dari komposisi proksimat, pH, perubahan warna, dan kandungan kolagen total daging ikan ekor kuning
2. Kualitas daging ikan yang diberi pakan diet silkrose-BM lebih baik, ditinjau dari struktur histologi dan ekspresi gen daging ikan ekor kuning

1.5 Kerangka Pikir

Kualitas daging ikan dipengaruhi oleh berbagai macam faktor dalam praktik budidaya antara lain yaitu genetik, pakan, dan lingkungan perairan. Dalam tubuh ikan terdapat faktor ekspresi gen yang mengatur tumbuh kembang dan kesehatan organisme yang akhirnya berdampak pada kualitas dagingnya setelah dipelihara menggunakan metode budidaya tertentu. Beberapa gen yang diketahui berperan dalam menunjang kualitas daging ikan diantaranya yaitu *ampd1*, *hao1*, *mecr*, *acadm*, *mstn*, dan *fbxo32* (Lampiran 4). Selain itu metode budidaya yang umumnya dilakukan untuk mendapatkan hasil panen yang menjanjikan yaitu dengan memfortifikasi pakan dengan bahan-bahan atau zat-zat tertentu guna mencapai kualitas daging ikan yang diinginkan. Dalam penelitian ini, berfokus pada kualitas daging ikan yang dihasilkan dari penambahan silkrose-BM dalam pakan ikan komersial (komersial EP), yang diharapkan dapat meningkatkan kualitas sehingga mendukung nilai jual ikan yang lebih tinggi.





Gambar 1. Kerangka Pikir Penelitian

1.6 Landasan Teori

1.6.1 Ulat Sutera (*Bombyx mori*)

Ulat sutera (*B. mori*) merupakan salah satu spesies ulat yang banyak dibudidayakan sebagai bahan penghasil benang sutera yang bernilai ekonomis tinggi. Berdasarkan taksonominya, *B. mori* diklasifikasikan dalam kingdom Animalia, kelas Insekta, ordo Lepidoptera, family Bombycidae, genus *Bombyx*, species *Bombyx mori* (Gambar 2).



Sumber: Ohtsu, Yuki.

a (*B. mori*)



Optimized using
trial version
www.balesio.com

Pupa ulat sutera menjadi hasil samping (*by product*) dalam industri benang sutera yang tidak dimanfaatkan, sehingga hanya menjadi limbah. Dalam penelitian Miura et al. (2022), merangkum temuan beberapa tahun terakhir tentang serangga yang telah menarik perhatian besar di seluruh dunia, tidak hanya sebagai sumber protein yang menjanjikan untuk produksi pakan ternak tetapi juga mampu menghasilkan berbagai zat bermanfaat yang dapat mengoptimalkan kesehatan hewan budidaya. Bubuk serangga seperti lalat rumah (*Musca domestica*), ulat kuning (*Tenebrio molitor*), dan lalat hitam (*Hermetia illucens*), telah banyak digunakan dalam berbagai pakan ikan dan kekerangan komersial untuk memodifikasi dan memodulasi respon kekebalan tubuh dan meningkatkan resistensi terhadap infeksi bakteri dengan tingkat keberhasilan yang signifikan.

Penelitian mengenai serangga seperti larva lalat buah (*Bactrocera cucurbitae*), lalat hitam (*Hermetia illucens*), kepompong ngengat sutera (*Antheraea yamamai*), dan ulat sutera (*Bombyx mori*) ditemukan mengandung polisakarida yang secara berturut-turut diberi nama dipterose-BC (Ohta et al., 2014), dipterose-BSF (Ali et al., 2019), silkrose-AY (Ohta et al., 2016), dan silkrose-BM (Ali et al., 2018). Polisakarida bioaktif yang berasal dari serangga *B. cucurbitae*, *H. illucens*, *A. yamamai* dapat secara efektif menginduksi produksi oksida nitrit dan ekspresi sitokin pro-inflamasi dan interferon β pada makrofag mencit RAW264.7 melalui jalur reseptor *Toll-like receptor* (TLR) atau *nuclear factor κ B* (NF- κ B), dan penambahan polisakarida bioaktif yang berasal dari *B. mori* kedalam pakan terbukti efektif melawan vibriosis pada udang dan edwardsiellosis pada ikan yang secara khusus telah dianalisis ketahannya terhadap infeksi penyakit tersebut dalam tingkat molekuler (Ali et al., 2018 & 2021b).

Hasil analisis ontologi gen terhadap pakan diet dipterose-BSF pada sistem imun teleost ikan zebra (*Danio rerio*) setelah 14 hari, mengungkapkan beberapa parameter yang secara signifikan lebih tinggi pada kelompok eksperimen dibandingkan dengan kelompok kontrol. Uji tantang menunjukkan bahwa diet dipterose-BSF memiliki beberapa efek positif terhadap ketahanan ikan melawan penyakit, tetapi efek ini tidak signifikan (Nishiguchi et al., 2024).

Manajemen pakan dengan menggunakan imunostimulan untuk melindungi kesehatan ikan dan mencegah infeksi bakteri sudah banyak dilakukan. Banyak spesies serangga yang telah dijelaskan memiliki berbagai zat bioaktif yang dapat meningkatkan kesehatan hewan namun belum dilakukan penelitian mengenai kualitas daging ikan yang dihasilkan dari pemberian pakan tersebut. Silkrose-BM memiliki fungsi yang beragam, memiliki dampak lingkungan yang rendah, dianggap sebagai petunjuk untuk memecahkan masalah yang dihadapi dalam industri

tribusi terhadap nilai tambah yang tinggi pada Belut Jepang dan dari industri budidaya ikan.



ng (*Seriola quinqueradiata*)

i yang dikenal dengan nama 'Buri' di Jepang merupakan salah banyak dibudidayakan dan bernilai ekonomis tinggi. Daging ikan ngkan dalam menu sashimi dan sushi secara tradisional di

jepang. Berdasarkan taksonominya, pertama kali diklasifikasikan oleh Temminck & Schlegel (1845) yang tercatat dalam *World Register Marine Species* (2008), Ikan ekor kuning termasuk ke dalam kingdom Animalia, filum Chordata, subfilum Vertebrata, kelas Teleostei, ordo Carangiformes, family Carangidae, genus *Seriola*, species *Seriola quinqueradiata* (Gambar 3).



Gambar 3. Ikan ekor kuning (*S. quinqueradiata*) Temminck & Schlegel, 1845 (kiri), dan dokumentasi pribadi (kanan)

Budidaya Ikan ekor kuning merupakan praktik yang berkembang dengan baik di Jepang oleh karena itu, negara ini dikenal sebagai produsen ikan ekor kuning terbesar di dunia. Sejak tahun 2014, volume produksi keseluruhan spesies *Seriola* di Jepang telah dipertahankan pada kisaran 130.000 metrik ton (MT), mencapai sekitar 100.000 MT untuk *S. quinqueradiata* (“buri/hamachi” dalam bahasa Jepang, atau “yellowtail” dalam bahasa Inggris), 30.000 MT untuk *S. dumerili* (“kampachi”), dan 30.000 MT untuk *S. dumerili* (“kampachi” dalam bahasa Jepang, atau “amberjack” yang lebih besar), dan sejumlah kecil *S. lalandi* (“hiramasa” dalam bahasa Jepang, atau “yellowtail amberjack / yellowtail kingfish”), dan mengalami peningkatan jumlah produksi sebesar 70% pada tahun 2018. (Loew, 2023).

Ikan ekor kuning dalam praktik budidaya yang dilakukan di Jepang, seringkali rentan terhadap berbagai ancaman penyakit dan parasit seperti ektoparasit yang banyak dijumpai pada spesies ini (Miura et al., 2022). Selain itu, pakan yang digunakan dalam praktik budidaya dapat mempengaruhi kelangsungan hidup dan kesehatan ikan yang diduga berdampak pada kualitas daging ikan yang dihasilkan. Hal ini juga diungkapkan oleh Thakur et al. (2003), yang menyatakan bahwa penggunaan pakan khususnya pakan tinggi energi (*high-energy diet*), dalam praktik budidaya telah meningkatkan kinerja pertumbuhan, namun pada saat yang sama terdapat kekhawatiran mengenai kualitas produk yang dihasilkan. Untuk sashimi, tekstur daging ikan karakteristik sensorik dominan yang mempengaruhi penerimaan konsumen. Tekstur daging ikan ekor kuning tetap menjadi tantangan untuk selalu ditingkatkan menyesuaikan dengan preferensi konsumen termasuk juga warna, rasa dan lain sebagainya.



Daging Ikan

teristik daging ikan seperti warna, kenampakan keseluruhan, tekstur, rasa dan cita rasa yang menjadi aspek penting dalam daging ikan segar yang umumnya digunakan dalam menu sushi. Menurut SNI (2021), daging ikan segar adalah ikan yang belum mengalami pengolahan kecuali pendinginan (*chilling*). Bahan baku ikan

yang masih segar secara sensori memiliki karakteristik kesegaran seperti mata cembung, insang berwarna merah, cemerlang spesifik jenis, warna cerah spesifik jenis, beraroma segar, tekstur kompak, padat dan elastis.

Kualitas sushi dan sashimi yang dibuat dari ikan yang telah dibekukan dan yang tidak dibekukan didapati adanya perbedaan yang signifikan dimana ikan yang tidak dibekukan kualitasnya lebih baik dari segi sensori (Watanabe et al., 2020). Namun menurut penelitian terdahulu, lamanya pembekuan juga mempengaruhi kualitas daging ikan yang dikonsumsi setelah dicairkan kembali karena kerusakan bahan sel eksternal yang terdiri dari kolagen. Peningkatan lama waktu pembekuan ikan menyebabkan ukuran kristal es yang terbentuk dalam struktur sel meningkat secara signifikan (Kominami et al., 2014). Penanganan berupa pembekuan ataupun pendinginan biasa secara umum mempengaruhi kualitas daging ikan khususnya warna dan rasanya, sehingga studi lebih lanjut dengan menggunakan pendekatan-pendekatan lainnya perlu dicoba.

Nutrisi yang terkandung dalam daging ikan merupakan hal yang sangat penting untuk dipertahankan, begitu pula dengan teksturnya. Terkhusus ketika daging ikan dimakan mentah seperti pada hidangan sushi dan sashimi. Shioya et al. (2011 & 2012), merangkum beberapa hasil penelitian yang melaporkan bahwa hilangnya kekenyalan berlawanan dengan perkembangan *rigor mortis* setelah kematian ikan dan bahwa tekstur otot ikan ekor kuning bervariasi namun berkorelasi terhadap komposisi proksimat. Hubungan antara komposisi proksimat dan tekstur telah dikaji sebelumnya untuk memahami kualitas otot ikan ekor kuning. Oleh karena itu, penting untuk mengontrol tekstur, tingkat penurunan kekencangan otot rangka untuk mempertahankan nilai komersial irisan sashimi. Selain itu, otot merah pada ikan ekor kuning mengalami perubahan warna setelah ikan mati yang secara signifikan mengurangi nilai jual ikan ekor kuning. Dapat dikatakan bahwa nilai komersial ikan ekor kuning meningkat ketika tekstur otot kompak dan perubahan warna otot merahnya sedikit.

1.6.4 Silkrose *Bombyx mori* (Silkrose-BM)

Polisakarida bioaktif dalam silkrose-BM belum lama ini ditemukan, sehingga penelitian mengenai pengaruh senyawa ini khususnya pada daging ikan masih sangat terbatas. Polisakarida dalam silkrose-BM terdiri dari sembilan monosakarida yaitu 1-*rhamnose*, 1-*fucose*, 1-*arabinosa*, *d-glucuronic acid*, *d-mannose*, *d-glucose*, *d-galaktosa*, *N-acetyl-d-glucosamine*, dan *N-acetyl-d-galactosamine* (Ohta et al., 2014 & 2016), dengan rasio molar senyawa bioaktif dalam silkrose-BM dapat dilihat pada Lampiran 2 (Ali et al., 2018). Polisakarida bioaktif dari pupa *B. mori* ini dapat



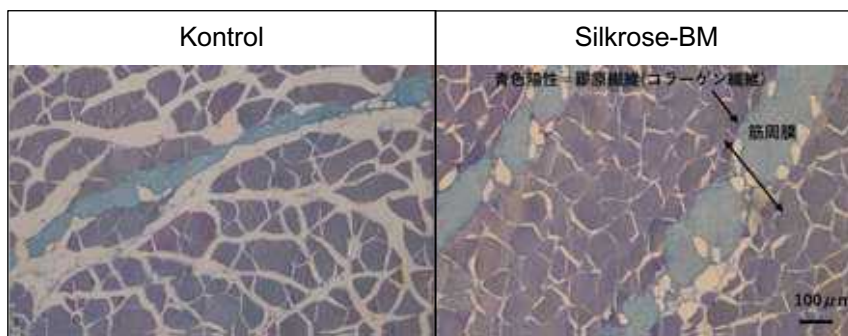
in karena memiliki efek yang menguntungkan pada organisme seperti resistensi penyakit, dan telah diidentifikasi dapat alan bawaan pada organisme budidaya, serta meningkatkan organisme.

osamin, dan *N-asetil-d-galaktosamin* adalah kedua senyawa am pupa *B. mori* (Ohta et al., 2014 & 2016). Senyawa ini sebagai glikosaminoglikan (GAGs). Glikosaminoglikan (GAGs)

adalah polisakarida kompleks yang memainkan peran penting dalam pertumbuhan, diferensiasi, morfogenesis, migrasi sel, dan infeksi bakteri / virus. GAG utama pada vertebrata termasuk heparin (Hep) / Heparan sulfat (HS), kondroitin sulfat (CS), dermatan sulfat (DS), dan asam hialuronat (HA). Rantai GAG ini terdiri dari rantai unit gula amino, baik *N*-asetil-*D*-glukosamin (GalNAc) atau *N*-asetil-*D*-galaktosamin dan asam hexuronic (HexA), baik asam glukoronat (GlcA), atau asam iduronic (IdoA) (Yamada et al., 2011). GAG merupakan komponen penting dalam struktur jaringan ikat, termasuk dalam kolagen yang membentuk struktur jaringan otot yang berdampak pada tekstur dan kandungan kolagen daging ikan yang dihasilkan.

Penelitian terdahulu mengenai silkrose-BM lebih banyak mengkaji tentang efektivitas senyawa bioaktif yang terkandung di dalamnya, yang terbukti mampu meningkatkan pertumbuhan dan sistem kekebalan tubuh hewan dalam melawan penyakit yang terdapat pada organisme budidaya baik ikan maupun kekerangan. Baru-baru ini penelitian mengenai pengaruh pemberian pakan Silkrose-BM terhadap kualitas hewan budidaya khususnya daging belut jepang (*Anguila japonica*) dilakukan di Ehime University, namun tidak ada artikel yang dipublikasikan.

Penelitian mengenai efek silkrose-BM pada kualitas daging belut jepang meliputi analisis proksimat meskipun tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada analisis ini namun belut yang diberi pakan silkrose-BM memiliki kecenderungan yang lebih tinggi untuk memiliki rasio kadar air yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol, rasio kadar lemak dan kandungan protein yang meningkat. Penelitian ini juga meliputi analisis histologi dengan pengamatan jaringan epidermis, hasilnya menunjukkan bahwa ketebalan epidermis meningkat per berat badan ikan, ketebalan serat kolagen cenderung meningkat, kepadatan otot ikan yang diberi pakan silkrose-BM meningkat dibandingkan dengan kelompok kontrol (Gambar 4) (Nishiguchi, 2024).



atan histologi daging Belut Jepang (*Anguila japonica*) yang dengan gomori trichrome.

ebut berfokus pada pengaruh Silkrose-BM 0,1% terhadap pertumbuhan, HSI, VSI, Panjang bobot, Komposisi Proksimat, serum, pengamatan parasit insang, observasi epidermis, analisis RNA-seq. Bagian area yang berwarna biru merupakan

serat kolagen, bagian abu-abu adalah serat otot. Kelompok kontrol yang diberi pakan komersial dibandingkan dengan kelompok uji yang diberi pakan Silkrose-BM 0,1%, dipelihara selama enam bulan di karamba jaring apung, berdasarkan hasil analisis *RNA-sequencing* yang didapatkan menunjukkan bahwa kelompok yang diberi pakan silkrose-BM mengalami peningkatan signifikan dalam ekspresi gen yang terkait dengan sistem komplemen dan sistem koagulasi, gen yang terkait dengan adhesi sel, presentasi antigen, dan antibodi jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Mengenai analisis histologi jika dibandingkan dengan kelompok kontrol, ketebalan serat kolagen di perimisium meningkat pada belut Jepang yang diberi pakan tambahan silkrose-BM, dan dipastikan bahwa area melintang serat otot menurun dan kepadatan otot meningkat.

Mengacu pada hasil penelitian Nishiguchi (2024) terhadap kualitas daging belut jepang, dapat diasumsikan bahwa pemberian pakan yang mengandung silkrose-BM dapat diaplikasikan demi meningkatkan efisiensi produksi, meningkatkan ketahanan terhadap stres dalam kondisi air suhu tinggi, dan meningkatkan ketahanan terhadap penyakit. Secara keseluruhan, hasil dari pengujian parameter-parameter yang didapatkan dari penelitian tersebut diduga secara tidak langsung berdampak pada indikator kualitas lainnya. Temuan sebelumnya dianggap berkontribusi untuk memecahkan masalah yang dihadapi dalam budidaya.

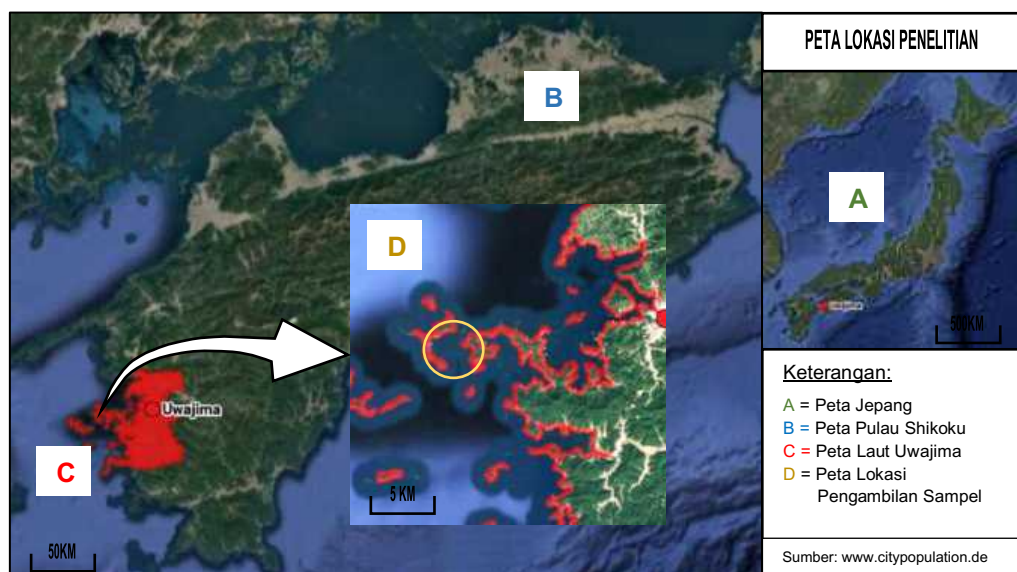


BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret - Desember 2024. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan ekor kuning (*S. quinquerediata*) yang dibudidayakan di kawasan Hayashi Fisheries Co., Ltd., di perairan Uwajima, Ehime, Jepang. Pengambilan sampel dilakukan setelah satu dan enam bulan masa pemeliharaan ikan. Analisis parameter yang diuji dalam penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fisiologi Reproduksi Ikan, Ehime University. Peta lokasi pengambilan sampel dalam penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Peta lokasi pengambilan sampel ikan ekor kuning

2.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *cooler box*, pisau, pengasah pisau, gunting, scalpel, pinset, *tag gun*, talenan, timbangan analitik (HT224 RCE 220g x 0.0001g, Vibra Shinko Denshi, Japan), timbangan meja (CJ series 220g x 0,01g, Vibra Shinko Denshi, Japan), penggaris, pipettor (Eppendorf), gelas ukur, gelas desikator, tanur, cawan petri, kertas saring, alat ekstraksi kksi, labu kjeldahl, pemanas kjeldahl, alat destilasi, buret, OML-2, Lab Mill, Osaka Chemical), papan plastik, kromameter olta INC., Japan), pH meter (pH-201Z, Chemical Ins. Co., LTD), ate 96-wells, rak tabung (PP, Falcon), *microplate shaker* iviera Glass Pvt., Ltd., India), mikrotom (RM2125 RTS, Leica), *slides*, *cover slippers*, mikroskop binokuler (BX41, Olympus),



Optimized using
trial version
www.balesio.com

oven (UN110, Memmert-Germany), *rotary homogenizer* (Precellys Evolution Touch, Bertin Technologies), *digital dry bath* (D1302, Labnet International), *thermal cycler* (96G, 230 V, Biometra Tadvanced), *vortex* (Mixmate PCR 96, Eppendorf), *micro centrifuge* (D1008, DLAB Scientific, Co., Ltd.), pendeteksi real time PCR/*thermal cycler* (CFX96™, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA), *Ice flaker* (BIFL-209, BioLab Scientific).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pakan silkrose-BM konsentrasi 0,1% yang disediakan oleh Shintoa Co., Ltd., pakan komersial *extruded pellets* (komersial EP) disediakan oleh Sakamoto Feed Co., Ltd., ikan ekor kuning (*S. quinquerediata*), formalin 12%, plastik cetik, *microtube* (Eppendorf) ukuran 1,5 ml, pipet tip, tabung sentrifus, botol fiksasi ukuran 100 ml, histol 70%, 90%, 100%, air destilasi, 4M, 6M, 12M HCl, *total collagen assay kit* (QuickZymes Biosciences), larutan *RNA-later* (Nippon Gene, Japan), *DEPC treated water* (Nippon Gene, Japan), *microplate 96-wells*, *RNase spray*, primer gen spesifik (*18srrna*, *ampd1*, *hao1*, *mecr*, *acadm*, *mstn*, *fbxo32*), pH buffer 4 dan 7, aluminium foil, plastik *wrap*, botol vial, parafin, xylene, 10% potassium dichromate, 10% *trichloroacetic acid*, *mayers hematoxylin*, *trichrome dyeing liquid*, 0,2% asam asetat, lem histologi, blok histologi.

2.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan *pre-posttest design* dengan membandingkan dua kelompok yang diberi pakan berbeda (komersial EP, silkrose-BM) setelah satu dan enam bulan pemeliharaan. Analisis dilakukan untuk melihat perbedaan kualitas daging ikan antar kelompok komersial EP dan silkrose-BM pada satu dan enam bulan pemberian pakan yang berbeda dan perubahannya setelah enam bulan pemeliharaan.

2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Pemeliharaan Ikan

Ikan ekor kuning diperoleh dari pemeliharaan sebelumnya yang diberi pakan komersial *extruded pellets* (komersial EP), berusia kurang lebih satu tahun. Mula-mula ikan dipelihara dalam karamba jaring apung yang sama sebelum dipisahkan berdasarkan kelompok pakan yang diujikan. Ikan dipisahkan ke dalam 2 karamba yang berbeda berukuran 10 x 10 x 6 m, masing-masing berisi ± 3.100 ekor dalam tiap-tiap kelompok pakan uji dengan rerata bobot masing-masing 1,73 dan 1,36kg untuk ikan pada kelompok komersial EP dan silkrose-BM. Ikan ekor kuning dipelihara selama enam bulan (Maret – September), ikan yang ada dalam karamba A diberi

lan karamba B diberi pakan diet Silkrose-BM konsentrasi 0,1%.
banyak 2x sehari saat pagi dan sore hari dengan metode *ad*
pakan masing-masing perlakuan dapat dilihat pada tabel



Tabel 1. Komposisi dan kandungan proksimat pakan yang diberikan pada ikan ekor kuning selama periode makan

Bahan-Bahan (%)	Pakan	
	Komersial EP	Silkrose-BM
Tepung hewani (tepung ikan, tepung krill)	50.0	50.0
Biji-bijian (tepung, pati)	15.0	14.9
Tepung nabati (tepung kedelai, tepung gluten jagung)	9.0	9.0
Minyak nabati	1.0	1.0
Lainnya (minyak ikan, kalsium fosfat, ekstrak kelopak bunga marigold, ekstrak licorice, ekstrak lembaga beras)	25.0	25.0
Silkrose-BM		0.1
Komposisi Proksimat (%)		
Protein kasar	Minimal 40.0	
Lemak kasar	Minimal 28.0	
Serat kasar	Maksimal 3.0	
Abu	Maksimal 13.0	
Kalsium	Minimal 1.0	
Fosfat	Minimal 1.0	
Total asupan pakan (kg)	11,726	12,709

*Sumber: Sakamoto Feed Co., Ltd.

2.4.2 Pengambilan Sampel Ikan

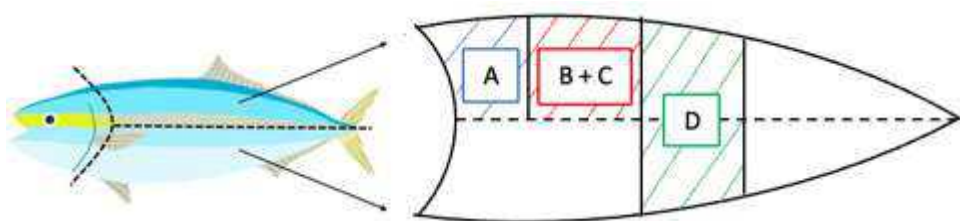
Pengambilan sampel dilakukan 2x selama masa pemeliharaan, pertama dilakukan di awal bulan april setelah dipelihara satu bulan dan pengambilan sampel kedua dilakukan diawal bulan september setelah dipelihara selama enam bulan. Pengambilan sampel dilakukan langsung di kawasan budidaya yang dijangkau menggunakan kapal dengan waktu perjalanan kurang lebih 15 menit dari dermaga. ikan diambil menggunakan jaring tangkap, dimatikan, diletakkan pada plastik yang berbeda dan disimpan dalam *cooler box* berisi es curai. Ikan yang diuji dalam penelitian ini berfokus pada ikan betina. Hal ini dilakukan karena jantan dan betina memiliki ekspresi gen yang berbeda, sehingga penentuan jenis kelamin ikan sangat penting dalam penelitian ini. Mencampur sampel dari kedua jenis kelamin ikan yang berbeda dapat menimbulkan bias dalam interpretasi hasil, terutama untuk analisis molekuler seperti qRT-PCR.

2.4.3 Preparasi Sampel Uji



kan dengan membuat preparasi sampel dari ikan yang dalam *cooler box*, untuk parameter-parameter pengujian yang laboratorium Ainan Liberacio, Co., Ltd., Uwajima. Preparasi ngan cara memisahkan daging ikan dari kepala dan tulangnya, jadi beberapa bagian berdasarkan penelitian Ando et al. (2022), yang dimodifikasi.

Beberapa penelitian terdahulu mengambil sampel daging ikan dengan membaginya dari bagian dorsal, ventral, dan ekor ikan, lalu menggabungkannya (Date et al., 1988; Saeki et al., 1979; Shimizu et al., 1973). Namun Shioya et al. (2012), mengemukakan bahwa meski kandungan nutrisi ikan ekor kuning bervariasi berdasarkan bagian tubuh tertentu, mengambil sampel dari tulang internal (*Musculus latero-dorsalis*) ke-7 hingga ke-10 dapat memberikan gambaran yang komprehensif tentang kandungan nutrisi ikan ekor kuning secara keseluruhan. Teknik preparasi sampel ini diadaptasi untuk memastikan hasil yang didapatkan lebih akurat dan meminimalisir bias yang terjadi akibat pengambilan sampel yang tidak konsisten dari bagian-bagian tubuh ikan yang berbeda. Berikut pembagian tubuh ikan ekor kuning berdasarkan parameter yang diujikan dapat dilihat pada Gambar 6.



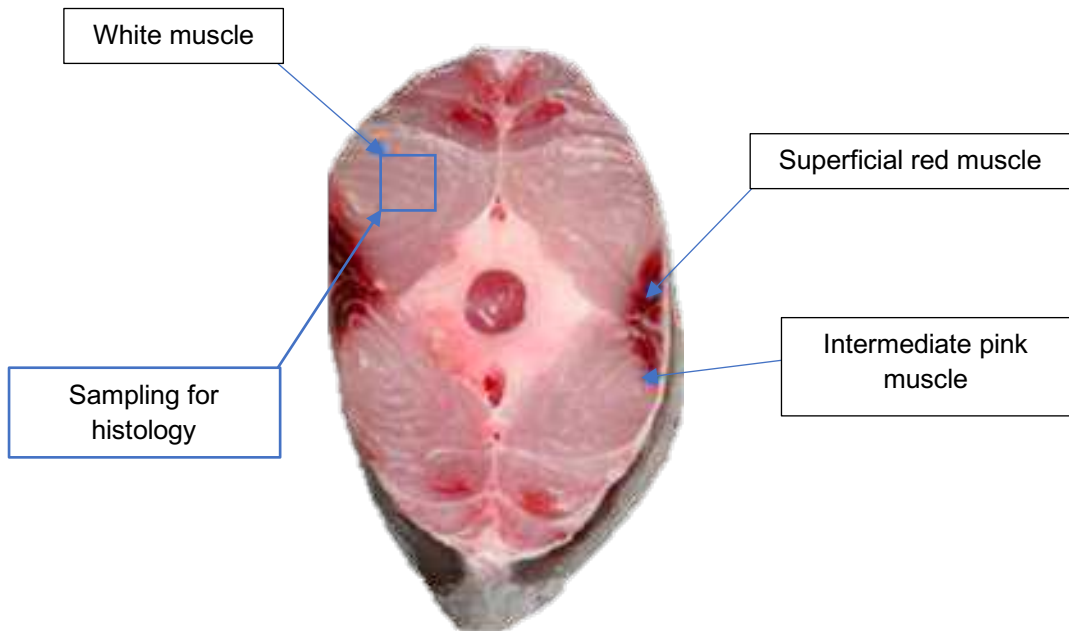
Gambar 6. Pembagian tubuh ikan ekor kuning

- | | |
|----------|--|
| A | : Sampel proksimat (dikumpulkan dalam plastik cetik) |
| B | : Sampel Histologi, RNA (dikumpulkan dalam botol fiksasi, RNA later) |
| C | : Sampel kolagen total (dikumpulkan dalam plastik cetik) |
| D | : Sampel perubahan warna dan pH (dikumpulkan dalam plastik cetik) |

Sampel untuk analisis ekspresi gen (ekstraksi RNA, cDNA, qRT-PCR), daging ikan diambil langsung dan dimasukkan ke dalam *tube* berukuran 1,5 ml yang berisi larutan *RNA-Later* sebanyak 0,5 ml lalu diberi kode masing-masing kelompok pakan uji. Setelah preparasi sampel uji dilakukan, semua sampel disimpan di dalam *cooler box* dan ditransportasikan menuju Laboratorium Fisiologi Reproduksi Ikan di Ehime University untuk diuji lanjut. Sesampainya di Ehime University, sampel untuk pengujian qRT-PCR disimpan pada suhu -30°C hingga analisis dilakukan. Sampel untuk pengujian proksimat dan kolagen total dikumpulkan dalam wadah terpisah, kemudian disimpan dalam *cold storage* suhu -60°C, hingga waktu pengujian. Sampel untuk pengujian perubahan warna dan pH dilakukan pada hari yang sama saat pengambilan sampel, kemudian diamati tiap 0, 24, dan 48 jam selama waktu penyimpanan 4°C.



analisis histologi dilanjutkan dengan mengambil bagian daging ikan ekor kuning. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Ryu et al. (2021), yang ditunjukkan pada Gambar 7.



Gambar 7. Sampel histologi daging ikan

Sampel tersebut dimasukkan ke dalam botol fiksasi berukuran 100 ml yang berisi larutan formalin 12%. Pada 2-4 hari berikutnya larutan formalin dalam botol sampel diganti secara terus-menerus hingga hari ke 5, setelah itu larutan formalin digantikan dengan histol 70%. Dalam kondisi ini, sampel dapat disimpan dalam waktu yang lama hingga pembuatan preparat dan pewarnaan histologi daging ikan dilakukan. Pembuatan preparat histologi mengacu pada '*Histological Method for CNS*' (<https://pathologycenter.jp/method/trichrome.html>) yang dimodifikasi dengan metode pewarnaan '*Gomori's One Step Trichrome*' (Lampiran 2).

2.5 Parameter Uji

2.5.1 Uji Proksimat

Komposisi proksimat dalam daging ikan dipengaruhi oleh berbagai macam faktor seperti pakan tertentu, masa pemijahan, dan kondisi lingkungan perairan. Beberapa penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa Komposisi Proksimat, kandungan lemak dalam daging ikan ekor kuning berhubungan dengan tingkat kematangan gonad (Ochi et al., 1980). Hal ini tidak hanya dipengaruhi oleh tingkat kematangan gonad, tetapi juga dipengaruhi suhu air dan jenis pakan yang diberikan (Shioya et al., 2005). Hal ini dapat dilihat dari data hasil analisis proksimat pada ikan ekor kuning yang disajikan pada Tabel 2.



Tabel 2. Pengukuran kualitas air secara keseluruhan selama periode pemberian pakan perlakuan pada ikan ekor kuning.

Waktu	Parameter				
	Salinitas (%)	Suhu (°C)	DO ¹ (%)	DOM ² (mg/L C)	Turbidity (ntu ³)
April	34.47 ± 0.02	16.74 ± 0.02	108.55 ± 2.05	8.68 ± 0.09	0.36 ± 0.03
Mei	34.48 ± 0.04	16.69 ± 0.01	113.68 ± 0.17	8.96 ± 0.01	0.32 ± 0.01
Juni	34.21 ± 0.04	18.20 ± 0.01	104.63 ± 0.49	8.02 ± 0.04	0.45 ± 0.03
Juli	33.87 ± 0.02	20.28 ± 0.11	104.11 ± 0.89	7.70 ± 0.06	0.32 ± 0.02

¹DO = oksigen terlarut; ²DOM = bahan organik terlarut; ³ntu = *nephelometric turbidity units*.

Pengujian proksimat daging ikan ekor kuning dilakukan setelah pemeliharaan satu dan enam bulan berdasarkan metode AOAC (2005) untuk menentukan kadar air dengan menggunakan metode *atmospheric drying*, kadar lemak menggunakan metode soxhlet, kadar protein menggunakan metode khjeldal, dan kadar abu menggunakan metode *direct ashing*. Pengujian proksimat daging ikan dimulai dengan menimbang daging ikan mentah yang telah disiangi dan wadah kosong yang akan digunakan, daging ikan diletakkan pada wadah tahan panas, dan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 70°C selama 48 jam. Daging ikan yang sudah mengering ditimbang kemudian dilanjutkan dengan pengujian lainnya. Perhitungan secara keseluruhan menggunakan rumus dibawah ini:

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \times 100$$

keterangan:

W₀ = berat awal sampel (g)

W₁ = berat akhir sampel (g)

$$\text{Kadar lemak (\%)} = \frac{W_1 - W_2}{W_s} \times 100$$

keterangan:

W_s = berat sampel (g)

W₁ = berat labu + lemak (g)

W₂ = berat labu (g)

$$\text{Kadar protein (\%)} = \frac{V_{HCl} \times N_{HCl} \times 14.007 \times fp}{\text{berat sampel (mg)}} \times 100 \times fk$$



asi HCl (ml)

enceran

ersi (6.25)

$$\text{Kadar abu (\%)} = \frac{W_2 - W_1}{W_0} \times 100$$

keterangan:

W_0 = berat sampel sebelum diabukan (g)

W_1 = berat cawan kosong (g)

W_2 = berat akhir (g)

2.5.2 Uji pH Daging Ikan

Pengujian pH dilakukan bersamaan dengan pengujian perubahan warna selama 48 jam penyimpanan dalam suhu 4°C, pada 0, 24, dan 48 jam waktu pengamatan dengan menggunakan pH meter (pH-201Z) dari Chemical Ins. Co., LTD. Pengujian pH daging ikan dilakukan dengan mengecek pH daging putih dan merah ikan, kemudian diambil nilai rata-ratanya.

2.5.3 Uji Perubahan Warna Daging Ikan

Perubahan warna diamati selama 0, 24, 48 jam setelah melalui masa penyimpanan pada suhu 4°C, diikuti dengan pengukuran pH pada tiap-tiap pengamatan. Analisis perubahan warna daging merah pada ikan menggunakan alat kromameter (CR-400, Konica Minolta) berdasarkan CIELAB *color space* ($L^*a^*b^*$), yaitu ruang warna yang didefinisikan oleh *International Commission on Illumination* (disingkat CIE) pada tahun 1976. CIELAB mengekspresikan warna sebagai tiga nilai: L^* untuk kecerahan perseptual, a^* dan b^* untuk warna-warna unik dari penglihatan manusia: merah, hijau, biru dan kuning. CIELAB dimaksudkan sebagai ruang yang seragam secara perseptual, di mana perubahan numerik yang diberikan sesuai dengan perubahan warna yang diamati.

Pengambilan gambar tiap-tiap sampel dilakukan menggunakan kamera telepon genggam (tipe iPhone 6 Plus) saat pengukuran menggunakan instrumen kromameter sebagai data pendukung untuk analisis statistik perubahan warna daging ikan. Pencitraan gambar dilakukan dengan menggunakan fitur *remove background* pada perangkat keras (Macbook Air 13). Data yang diperoleh dari instrumen kromameter selanjutnya dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{((L_1 - L_0)^2 + (a_1 - a_0)^2 + (b_1 - b_0)^2)}$$

Keterangan:

ΔE^*_{ab} = total perbedaan warna (dihitung terpisah tiap pengamatan 0, 24, dan 48 jam)

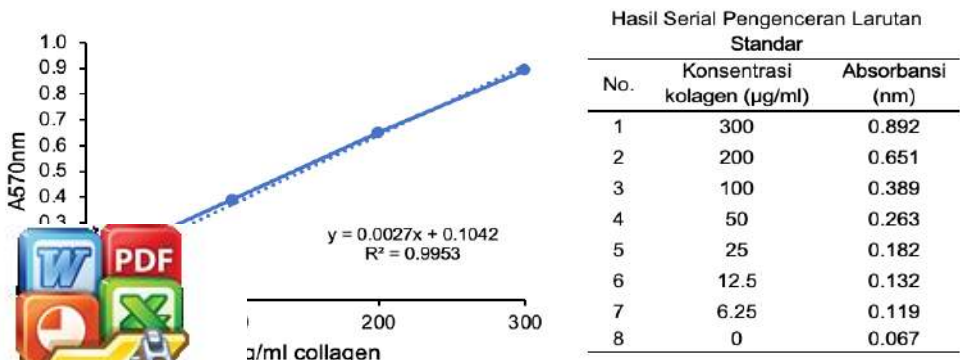


L^* silkrose-BM
 L^* komersial EP
 a^* silkrose-BM
 a^* komersial EP
 b^* silkrose-BM
 b^* komersial EP

2.5.4 Uji Kandungan Kolagen Total

Kolagen merupakan protein yang paling melimpah pada vertebrata dan sekitar 25% komposisinya dari total protein. Kolagen terdiri dari kumpulan tiga asam amino utama yaitu glisin, prolin dan hidroksiprolin, yang komposisinya 57% dari total asam amino dalam kolagen (Huang et al., 2016; Li dan Wu, 2017). Dalam penelitian Wiriduge et al. (2020), ikan yang diberi diet khusus taurin menunjukkan adanya peningkatan kandungan glisin dan prolin. Tekstur otot daging ikan yang dihasilkan dari pemberian pakan diet tersebut menghasilkan kepadatan serat otot yang lebih tinggi dan tingkat kandungan kolagen yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Umumnya kandungan kolagen dalam daging ikan berkisar antara 0,2-1,4% bervariasi tergantung dari jenis ikan. Kandungan dan jumlah kolagen dalam daging ikan yang biasanya terkandung dalam satu porsi hidangan di Jepang bervariasi dari 0,3 hingga 8,5 g/100 g daging ikan segar. Kandungan kolagen pada daging ikan *Trachurus japonicas* yang merupakan kerabat terdekat spesies *S. quinquerediata* dalam penelitian Asai et al. (2019), yaitu sebanyak 1,67g/100g.

Pengujian kandungan kolagen total dilakukan menggunakan *Total Collagen Assay kit* (QuickZyme Biosciences), dengan prinsip pengujian didasarkan pada deteksi hidroksiprolin. Hidroksiprolin adalah asam amino non-proteinogenik, pada mamalia membentuk elastin dan kolagen. Hidroksiprolin terbatas terutama pada *triple helix* kolagen (rangkap 3). Hidroksiprolin dibentuk setelah penerjemahan dari residu prolin spesifik melalui aksi enzim prolylhydroxylase. Hidroksiprolin dalam hidrolisat jaringan dapat digunakan untuk menetapkan jumlah kandungan kolagen yang ada. Assay kit ini mengukur total jumlah hidroksiprolin yang terbentuk mencakup semua tipe kolagen yang terdapat dalam sampel termasuk *pro-collagen*, *moisture collagen* dan hasil degradasi kolagen. Absorbansi assay dibaca menggunakan *microplate reader* pada gelombang 570 nm. Hasil pembacaan assay *kit plate* kemudian dianalisis/kalkulasi menggunakan R studio, berdasarkan protokol produsen (www.quickzyme.com). Perhitungan kandungan kolagen total dilakukan dengan memasukkan data absorbansi ke dalam kurva standar yang didapatkan seperti yang ditunjukkan pada Gambar 8.



absorbansi larutan standar kolagen menggunakan *total collagen*

Determinasi hasil kandungan kolagen total (x) berdasarkan nilai absorbansi yang didapatkan dari tiap-tiap sampel (y) menggunakan rumus:

$$y = 0.0027x + 0.1042$$

Keterangan:

y = nilai absorbansi

x = kandungan kolagen dalam daging ikan ($n = 5$)

2.5.5 Uji Histologi Daging Ikan

Ditinjau dari segi ekonomi, struktur otot ikan yang mempengaruhi tekstur daging merupakan hal yang penting untuk dipertahankan atau ditingkatkan khususnya untuk beberapa jenis ikan yang umumnya dikonsumsi mentah seperti ikan ekor kuning (Listrat et al., 2016; Shoiya et al., 2012). Analisis mikrostruktur tidak hanya memungkinkan penilaian kualitas tetapi juga memungkinkan penentuan rasio kuantitatif komponen dalam produk daging. Metode pemeriksaan histologis memungkinkan untuk mengontrol kualitas produk daging secara efektif. Dengan menggunakan metode ini memungkinkan kita untuk menentukan jenis dan kondisi bahan baku daging serta keberadaan berbagai aditif teknologi yang berasal dari sumber lainnya karena kekhasan struktur susunan inti pada serat otot (Mkrtychyan et al., 2020).

Analisis histologi dilakukan dengan mengambil daging putih ikan sebagai sampel, difiksasi dalam larutan formaldehide 12% selama 5 hari, larutan formaldehide diganti setiap hari hingga hari ke-5 kemudian diganti dengan larutan histol 70%. Sampel yang telah difiksasi dipotong 5-8 mm berbentuk persegi dari area luas penampang melintang (*cross-sectional area*), dibiarkan dalam larutan 90% histol selama satu jam, lalu dimasukkan ke dalam larutan 100% histol selama satu jam sebanyak 3x pengulangan. Sampel kemudian dipindahkan ke dalam wadah berjaring dan direndam dalam lemosol tahap 1 selama tiga jam, dan lemosol tahap 2 selama dua jam hingga sampel terlihat bening seperti kaca. Tahap selanjutnya yaitu sampel direndam dalam larutan parafin-lemosol selama 20 menit pada suhu 60°C, kemudian dilanjutkan dengan perendaman dalam larutan parafin tahap 1, 2, dan 3 selama 30 menit pada tiap-tiap tahapannya. Dua besi potongan L (*Leuckhart*) kemudian diatur berbentuk ruang kubus dengan plat besi sebagai pengalasnya untuk mencetak blok parafin sampel dari tiap-tiap kelompok pakan uji, kemudian sampel ditiriskan diatas *hot plate* bersuhu 70°C, lalu parafin cair dituangkan secukupnya agar menutupi ruang yang kosong diatas plat besi, lalu sampel diletakkan di dalam ruang yang berisi parafin cair, diberi label, dan didinginkan semalaman dalam air. Tahapan selanjutnya



rgan ketebalan 0,3 mm menggunakan mikrotom, lalu diletakkan e, dan dibiarkan diatas *hot plate* bersuhu 37°C, hingga akhirnya metode pewarnaan dan tahapannya dapat dilihat pada Lampiran stologi diwarnai, *slide* kemudian ditutup dengan *cover slipper* sebagai perekatnya. *Microscope slide* yang berisi jaringan otot udian diamati menggunakan mikroskop.

2.5.6 Uji Perubahan Ekspresi Gen

Analisis ekspresi gen dilakukan untuk melihat perubahan ekspresi gen yang terjadi dalam daging melalui hipotesis gen-gen apa saja yang kemungkinan terlibat dalam proses perubahan kualitas daging ikan yang berbeda dari kedua kelompok pakan uji. Analisis ini dilakukan dalam 3 tahap yaitu mengekstraksi Total RNA, sintesis cDNA, dan deteksi qRT-PCR. Total RNA diekstraksi dari daging ikan ekor kuning menggunakan ISOGEN II (Nippon Gene, Toyama, Jepang), sesuai dengan protokol produsen. Hasil total RNA dikuantifikasi secara spektrofotometrik menggunakan Nanophotometer P330 (Implen, Munich, Jerman).

Total RNA dari 5 individu yang diambil pada masing-masing kelompok digunakan untuk analisis qRT-PCR setelah sintesis cDNA. cDNA untai pertama yang disintesis dari total RNA dihasilkan menggunakan *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, USA), sesuai dengan protokol produsen. Primer spesifik gen yang digunakan untuk qRT-PCR adalah *Ampd1*, *hao1*, *mecr*, *acadm*, *mstn*, dan *fbxo32* (Lampiran 4). Analisis kurva leleh dilakukan setelah amplifikasi setiap gen untuk memastikan bahwa hanya satu produk yang telah diamplifikasi. Proses termokulasi dilakukan dalam pelat PCR *Multiplate white 96-well* (Bio-Rad Laboratories) menggunakan sistem deteksi RT-PCR kuantitatif (Bio-Rad Laboratories) dengan kondisi siklus sebagai berikut: 95°C selama 30 detik, diikuti oleh 40 siklus 95°C selama 5 detik dan 55°C selama 5 detik. Ekspresi gen relatif dihitung menggunakan metode siklus ambang batas komparatif (CT) yang dijelaskan oleh Livak dan Schmittgen (2001), dengan 18s rRNA sebagai *housekeeping gene*.

2.6 Analisis Data

Analisis data untuk menentukan normalitas dan varian dalam penelitian ini menggunakan uji statistik *Shapiro-Wilk* dan *Levene's*. Data yang terdistribusi normal dan memiliki varian yang sama, pengujian dilakukan menggunakan analisis *Student T-Test*, data yang terdistribusi normal namun varian berbeda, pengujian dilakukan dengan menggunakan analisis *Welch T-Test*. Data yang tidak memenuhi kedua syarat normalitas dan varian, dianalisis menggunakan *nonparametric Mann-Whitney U Test*. Khusus parameter pH dan perubahan warna daging ikan yang memiliki dua faktor (perlakuan pakan uji dan waktu penyimpanan), analisis data menggunakan *Two-Way ANOVA*, dan dilanjutkan dengan *Duncan post hoc test* ($p < 0,05$).

Analisis gambar histologi daging mula-mula dilakukan menggunakan aplikasi ImageJ (Fiji) untuk mengamati struktur otot dan menghitung luas area serta jumlah serat otot dalam area perimysium untuk menentukan densitas/kepadatan serat otot,

dan dilanjutkan dengan menggunakan *Student T-Test*. Analisis data kandungan kolagen total, histologi ekspresi gen, dianalisis menggunakan *Student T-Test*. Analisis data ini dilakukan melalui software R studio (versi 2024.04.2+764).

