

<p>Full Paper</p>

PENINGKATAN RESPON IMUN NON-SPEKIFIK BENIH KERAPU BEBEK, *Cromileptes altivelis* DENGAN IMUNOSTIMULAN DAN BAKTERIN TERHADAP INFEKSI VIRAL NERVOUS NECROSIS (VNN)

STIMULATION OF NON-SPECIFIC IMMUNE RESPONSE OF HUMPBACK GROUPEL, *Cromileptes altivelis* JUVENILE BY IMMUNOSTIMULANT AND BACTERIN AGAINST VIRAL NERVOUS NECROSIS (VNN) INFECTION

Des Roza^{*)}, Fris Johnny^{*)} dan Tridjoko^{*)}

Abstract

An experiment to evaluate the effectiveness immunostimulant and bacterin on humpback grouper have been conducted at the Disease Laboratory of Research Institute for Mariculture, Gondol, Bali. The experiment was designed in completely randomized design with four treatments in duplicates. Two hundred of humpback grouper juveniles (15-18 cm of total length, 55-65 g of body weight) were injected intraperitoneally with (A) bacterine at 10⁷ cfu/kg body weight (BW), (B) peptidoglycan at 100 mg/kg BW, and (C) immuno star at 100 ml/kg BW, (D) control. The fish were then challenged with VNN by intramuscular injection at 10 days post treatment. Results showed that survival rates of juvenile after challenged with VNN were 60.00% (B & C), 53.34% (A), and 1.67% (control). Parameters of non-specific immune response showed that phagocytic activities were 17.56% (B), 17.55% (C), 13.11% (A), and 9.33% (control). In addition, lysozyme activities were 1.64 cm (B), 1.58 cm (C), 1.55 cm (A), and 1.46 cm (control). Immunostimulant and bacterin stimulated non-specific immune response, and increased survival rate of humpback grouper juvenile.

Key words: humpback grouper, immunostimulant, non-specific immune response, VNN

Pengantar

Teknologi pembenihan kerapu hasil penelitian Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut (BBRPBL) Gondol, Bali sudah diadopsi dan diaplikasikan secara komersial oleh masyarakat, baik pengusaha maupun petani nelayan sebagai substitusi usaha pembenihan bandeng. Sejalan dengan itu budidaya kerapu khususnya kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* pun berkembang pesat. Tetapi tingkat mortalitas yang tinggi pada stadia larva maupun benih merupakan kendala utama dalam perluasan usaha ini. Penyebab kematian tersebut diduga akibat serangan penyakit yaitu infeksi Virus *Viral Nervous Necrosis* (VNN), yang termasuk famili nodaviridae (Zafran *et al.*, 1998; Roza *et al.*, 2002a, 2002b, 2002c; Roza *et al.*,

2003) dan bakteri *Vibrio* terutama *Vibrio harveyi* dan *V. alginolyticus* (Koesharyani *et al.*, 2001; Roza *et al.*, 2002a).

VNN merupakan salah satu penyakit infeksi yang sangat merugikan usaha budidaya laut, terutama pada pembenihan dan pembesaran kerapu bebek (Nakai *et al.*, 1994; Mori *et al.*, 1998; Roza *et al.*, 2002a, 2002b, 2002c). Gejala ikan yang terserang virus ini berbeda menurut umurnya, pada umur 45 hari sampai 4 bulan akan terlihat ikan berdiam di dasar, berenang terbalik, gerakannya lemah dan kadang-kadang menyentak seperti tanpa kontrol serta nafsu makan menurun drastis (Roza *et al.*, 2003) biasanya 3-5 hari setelah adanya gejala klinis ikan akan mati (Roza *et al.*, 2002a, 2002b, 2002c; Roza *et al.*, 2003). Upaya yang efektif

^{*)} Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol, PO BOX 140-Singaraja 81101-Bali. Telp: 0362 92278 Fax: 0362 92272.

^{*)} Penulis untuk korespondensi, E-mail: frisjravel@yahoo.com

pencegahan infeksi virus antara lain dengan cara vaksinasi baik menggunakan rekombinan vaksin (Watanabe *et al.*, 1998) maupun inaktif vaksin (Roza *et al.*, 2002^a, 2002^b), dan penggunaan imunostimulan (Secombes, 1996; Rukyani *et al.*, 1997; Zafran *et al.*, 1999; Johnny *et al.*, 2001; Johnny *et al.*, 2002).

Beberapa penelitian membuktikan bahwa penggunaan imunostimulan dapat meningkatkan respon imun non-spesifik ikan terhadap penyakit karena imunostimulan dapat meningkatkan aktivitas fagositik. Imunostimulan merupakan sekelompok senyawa biologi dan sintesis yang dapat meningkatkan respon imun non-spesifik. Imunostimulan yang telah banyak dikenal antara lain β -glukan, peptidoglikan, lipopolisakarida, bakterin, dan sebagainya. Aplikasi imunostimulan sudah banyak diterapkan pada beberapa jenis ikan baik melalui pakan, perendaman maupun melalui suntikan (Anderson, 1996; Elder *et al.*, 1997; Rukyani *et al.*, 1997; Santarem *et al.*, 1997; Vadstein, 1997; Figueras *et al.*, 1998; Koesharyani, *et al.*, 1999; Thompson *et al.*, 1999; Zafran *et al.*, 1998; Johnny *et al.*, 2001; Johnny & Roza, 2002).

Percobaan penggunaan imunostimulan pada kerapu telah dilakukan di BBRPBL Gondol, diantaranya penggunaan imunostimulan ditambahkan vitamin campuran (Zafran *et al.*, 1999), penyuntikan imunostimulan (Koesharyani *et al.*, 1999), pemberian imunostimulan peptidoglikan dalam pakan pelet (Johnny *et al.*, 2001), dengan perendaman (Roza *et al.*, 2002a; 2002b; 2002c; 2003), penyuntikan peptidoglikan secara intraperitoneal pada kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus* (Johnny & Roza, 2002).

Dari penelitian-penelitian yang sudah dilakukan sebelumnya, masih belum diperoleh jenis imunostimulan yang efektif untuk pencegahan infeksi VNN pada kerapu bebek, maka perlu dilakukan penelitian tentang penggunaan imunostimulan dan bakterin pada pemeliharaan benih kerapu bebek. Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan respon imun

non-spesifik benih kerapu bebek dengan menggunakan imunostimulan dan bakterin terhadap infeksi VNN.

Bahan dan Metode

Benih uji

Benih uji (55-79 g; 15-18 cm) berasal dari usaha pembesaran di Keramba Jaring Apung (KJA) milik BBRPBL Gondol. Sebelum digunakan untuk penelitian benih tersebut diaklimatisasi selama 7 hari dengan diberi pakan pelet yang sama dengan yang diberikan di KJA. Setelah penyuntikan imunostimulan dan bakterin, benih uji dipelihara dalam bak poli-karbonat dengan volume 2 ton yang disekat menjadi 4 dengan kepadatan 50 ekor/400 l, dilengkapi dengan aerasi dan sistem air mengalir. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 2 ulangan.

Perlakuan terdiri atas:

- A. Bakterin (*V. harveyi*, koleksi Laboratorium Patologi BBRPBL Gondol) dosis 10^7 cfu/kg bobot badan dengan penyuntikan secara intraperitoneal
- B. Peptidoglikan (*Bifidobacterium*, Kyowa Ltd. Japan) dosis 100 mg/kg bobot badan dengan penyuntikan secara intraperitoneal
- C. Immuno Star (Gluporide yaitu kombinasi Lipopolysaccharide β 1,3 dan β 1,6 glucan, Microfos International dan PT. Surindah Aquatik Farm) dosis 100 ml/kg bobot badan dengan penyuntikan secara intraperitoneal
- D. Kontrol

Pembuatan bakterin

Bakterin yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari bakteri *V. harveyi* yang dimatikan dengan 0,5% formalin selama 24 jam pada suhu 25°C. Setelah itu bakteri disentrifugasi pada 3.200 rpm dengan suhu 4°C selama 20 menit, kemudian dicuci sebanyak 3 kali dengan larutan garam fisiologis (0,85% NaCl). Kepadatan suspensi bakterin diestimasi sebelum bakteri dimatikan dengan metode taburan (*pour plate*). Sebelum

bakterin disuntikkan ke ikan uji dilakukan uji viabilitas pada medium *Tryptic Soy Agar* (Difco) selama 48 jam pada suhu 26°C. Apabila terjadi pertumbuhan, inaktivasi diulang kembali. Sebelum digunakan bakterin tersebut disimpan dalam almari pendingin.

Inokulum virus

Inokulum virus diekstrak dari benih kerapu bebek yang terinfeksi VNN secara alami dan terdeteksi positif dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Organ mata dan otak ikan tersebut diambil sebanyak 20 g kemudian digerus dan tambahkan 200 ml 10 mM phosphate buffer saline (PBS), pH 7,2. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 2.000 rpm selama 20 menit pada 4°C, supernatan disaring dengan membran filter ukuran pori 0,45 µm (Arimoto *et al.*, 1993). Sebelum digunakan inokulum virus disimpan pada -85°C.

Deteksi VNN

Metode yang digunakan untuk deteksi VNN berpedoman pada Yuasa *et al.* (2001). Ekstraksi RNA menggunakan isogen, dilanjutkan amplifikasi menggunakan sepasang primer yaitu R2 (CgTgTCAGTCATgTgTCgCT) dan R3 (CgAgTCAACACgggTgAAgA). Primer ini adalah hasil sekuensing terhadap *Striped Jack Nervous Necrosis Virus* (SJNNV) pada T4 dengan target 426 bp (Mushiake *et al.*, 1994; Nishizawa *et al.*, 1994). Dalam proses amplifikasi RNA diubah menjadi cDNA dengan reverse enzim pada suhu 48°C selama 45 menit dan 94°C selama 2 menit. Amplifikasi cDNA ini dilakukan sebanyak 25 kali dengan suhu denaturasi 95°C selama 40 detik, annealing 55°C selama 40 detik, polimerisasi pada 72°C dan 4°C selama 5 menit. Selanjutnya produk PCR ini dielektroforesis pada 1,5% agarose gel (Sigma) selama 25 menit dalam 10 mM TAE buffer pada 100 V. Untuk pewarnaan digunakan etidium bromida selama 15 menit. Pembacaan hasil menggunakan UV transilluminator dan dilakukan pengambilan foto untuk dokumentasi.

Uji tantang

Uji tantang dengan VNN dilakukan 10 hari setelah penyuntikan imunostimulan dan bakterin. Wadah yang digunakan untuk uji tantang adalah bak polikarbonat volume 200 l yang diisi 180 l air laut dengan kepadatan ikan 10 ekor/bak. Air laut yang digunakan disaring dengan saringan 0,45 µm. Infeksikan VNN dilakukan dengan penyuntikkan intraperitoneal menggunakan dosis hasil uji LD-80 sebesar 125×10^5 sel/ml. Ikan dipelihara dengan pergantian air setiap hari. Pengamatan terhadap gejala klinis dan sintasan dilakukan selama 7 hari. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 2 ulangan. Pengambilan sampel darah ikan dilakukan sebelum dan setelah uji tantang.

Koleksi leukosit dan pemisahan plasma

Darah ikan uji diambil dari vena jugularis setelah terlebih dahulu ikan uji dipingsankan menggunakan bahan pembius FA-100 (Tanabe Seiyaku, Jepang) dengan kandungan minyak cengkeh dosis 0,2 ml/l. Sampel darah disedot dengan spuit plastik steril volume 2,5 cc dengan jarum nomor 18 yang didalamnya telah berisikan Heparin (Sigma) sebagai anti-koagulan. Selanjutnya darah disimpan dalam tabung mikro (*microtube*). Koleksi darah pada tabung mikro disedot dengan tabung kapiler plastik, ditutup dengan lilin lebah dan disentrifusi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Tabung kapiler dipotong dengan gunting pada batas leukosit dengan eritrosit, leukosit dikoleksi dan disimpan pada tabung mikro baru, dan siap digunakan untuk uji fagositosis.

Sisa darah pada tabung mikro disentrifusi dengan minisentrifus kecepatan 6.000 rpm selama 5 menit, kemudian plasma darah dipisahkan ke tabung mikro baru dengan mikropipet, plasma ini siap digunakan untuk uji aktivitas lisosim.

Uji aktivitas fagositik (PA) dan indeks fagositik (PI)

Untuk uji PA dan PI menggunakan modifikasi dari metode Siwicki & Anderson (1993) dan Ellis (1993).

Untuk uji dibutuhkan bahan enzim zymosan A (Sigma) yang berasal dari *Saccharomyces cerevisiae*. Zymosan A sebanyak 50 µl dilarutkan dalam larutan 10 ml PBS, dimasukkan kedalam tabung mikro. Lima puluh µl leukosit dicampur dengan zymosan A, diaduk rata dengan mikro pipet dan diinkubasi pada suhu 25°C selama 1 jam. Selanjutnya diteteskan pada kaca slide, dibuatkan preparat ulas tipis, diwarnai dengan *May-Gruenwald's Solution Modified* dan *Giemsa Solution 3%*. Pengamatan aktivitas fagositik (PA) dan indeks fagositik (PI) dilakukan dibawah mikroskop, dan dihitung menggunakan rumus:

$$PA (\%) = \frac{\text{Fagositosis}}{\text{Total Leukosit}} \times 100\%$$

$$PI = \frac{\text{Jumlah zymosan A}}{\text{Jumlah Fagosit}}$$

Jumlah fagositosis yang dihitung adalah sebanyak 100 sel fagosit, sedangkan untuk zymosan A adalah sejumlah zymosan A yang berada dalam sel fagosit.

Uji aktivitas lisosim (LA)

Metode yang digunakan adalah modifikasi dari metode Rowley (1993) dan Klontz (1997). Sebelumnya disiapkan media agar yang mengandung *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) pada cawan petri. Pada cawan petri yang berisi agar dibuat sumuran berdiameter 4,0 mm sebanyak 3 sumuran menggunakan pipet. Plasma darah sebanyak 10 µl dimasukkan ke dalam dua sumuran, sedangkan satu sumuran sisa dimasukkan 10 µl *chicken egg white lysozyme* (Sigma) sebagai kontrol. Cawan petri tersebut didiamkan

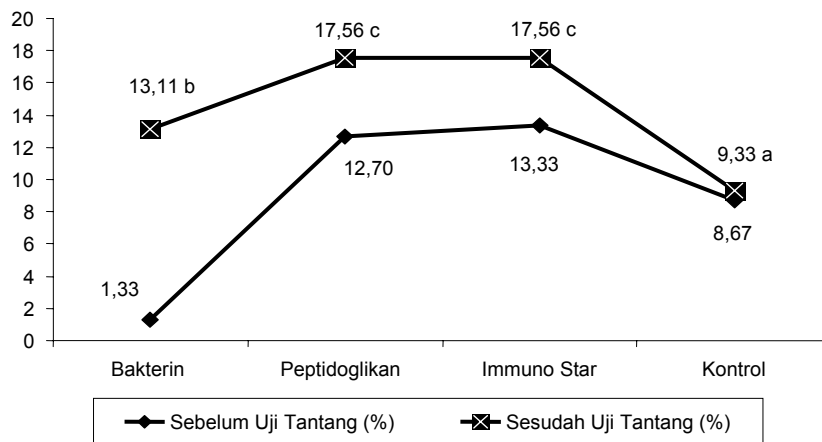
selama 10 menit pada suhu kamar, kemudian diinkubasi pada suhu 25°C. Aktivitas lisosim (LA) diamati dengan mengukur diameter zona yang terbentuk. Pengamatan dilakukan selama 3 hari, dan dilakukan penghitungan dengan rumus :

$$LA (\text{cm}) = \frac{\text{Diameter zona plasma darah uji}}{\text{Diameter zona kontrol}}$$

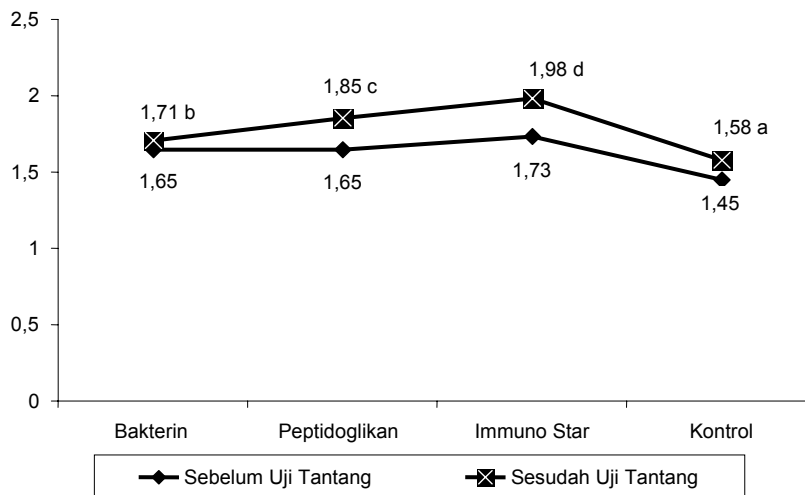
Hasil dan Pembahasan

Sebelum uji tantang dengan VNN, nilai PA berturut-turut (C) 13,33%, (B) 12,67%, (A) 11,33%, dan (D) 8,67% (Gambar 1). Setelah diuji tantang dengan VNN terjadi peningkatan nilai PA, terutama pada penggunaan imunostimulan. Nilai PA tertinggi setelah uji tantang diperoleh pada penggunaan peptidoglikan dan Immuno Star sebesar 17,56%, diikuti penggunaan bakterin sebesar 13,11% dan kontrol sebesar 9,33%. Analisis sidik ragam menunjukkan nilai PA pada penggunaan peptidoglikan dan Immuno Star tidak berbeda nyata ($P > 0,05$), namun berbeda nyata dengan penggunaan bakterin dan kontrol ($P < 0,05$).

Besarnya nilai PI masing-masing perlakuan sebelum uji tantang dengan VNN berturut-turut (C) 1,73, (B) 1,65, (A) 1,65, dan (D) 1,45 (Gambar 2). Setelah uji tantang dengan VNN terjadi peningkatan nilai PI. Nilai PI tertinggi diperoleh pada penggunaan imunostimulan Immuno Star sebesar 1,98 diikuti dengan penggunaan peptidoglikan sebesar 1,85, bakterin sebesar 1,71, dan kontrol sebesar 1,58. Analisis sidik ragam menunjukkan bahwa PI untuk semua perlakuan berbeda nyata ($P < 0,05$).



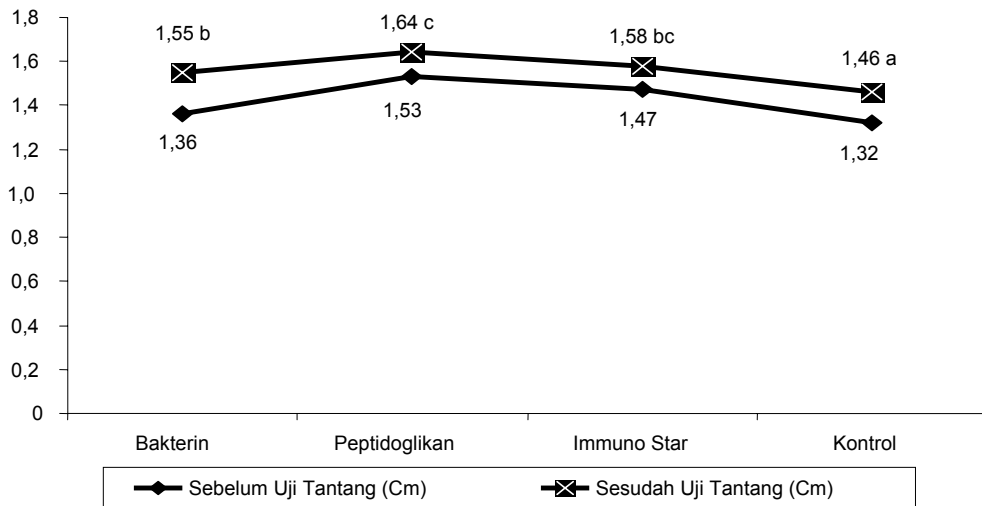
Gambar 1. Aktivitas fagositik (PA) leukosit benih kerapu bebek dengan perlakuan imunostimulan dan bakterin sebelum dan sesudah uji tantang dengan VNN. Setiap nilai yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak beda nyata ($P>0,05$).



Gambar 2. Indeks fagositik (PI) leukosit benih kerapu bebek dengan perlakuan imunostimulan dan bakterin sebelum dan sesudah uji tantang dengan VNN. Setiap nilai yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak beda nyata ($P>0,05$)

Sebelum uji tantang dengan VNN nilai LA sebesar 1,53; 1,47; 1,36; dan 1,32 cm berturut-turut untuk perlakuan B, C, A, dan D (kontrol) (Gambar 3). Setelah uji tantang dengan VNN terjadi peningkatan nilai LA, nilai LA tertinggi diperoleh pada perlakuan peptidoglikan sebesar 1,64 cm, diikuti Immuno Star sebesar 1,58 cm,

bakterin sebesar 1,55 cm, dan kontrol sebesar 1,46 cm. Analisis sidik ragam menunjukkan nilai LA tidak berbeda nyata ($P>0,05$) antara perlakuan jenis imunostimulan dan bakterin, namun berbeda nyata dengan kontrol ($P<0,05$).



Gambar 3. Aktivitas lisosim (LA) plasma benih kerapu bebek dengan perlakuan imunostimulan dan bakterin sebelum dan sesudah uji tantang dengan VNN. Setiap nilai yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak beda nyata ($P > 0,05$)

Penyuntikan peptidoglikan dengan dosis 5 mg/kg meningkatkan LA menjadi 2,2 cm dibanding kontrol yang hanya 1,8 cm (Koesharyani *et al.*, 1999). Pemberian peptidoglikan dalam pakan pelet dengan konsentrasi 0,2 g/kg pakan pada kerapu bebek juga dapat meningkatkan PA hingga mencapai 8,8% dibanding kontrol 2,8%, PI hingga mencapai 2,2 dibanding kontrol 1,66 dan LA hingga mencapai 1,92 cm dibanding kontrol 1,72 cm (Johnny *et al.*, 2001). Pada kerapu macan, penyuntikan peptidoglikan secara intraperitoneal dengan dosis 50 μ g diperoleh nilai PA sebesar 11,70% dan kontrol 6,70%; PI sebesar 2,06 dan kontrol 1,19; sedangkan pada dosis 100 μ g nilai LA mencapai 1,81 cm dan kontrol 1,46 cm (Johnny & Roza, 2002).

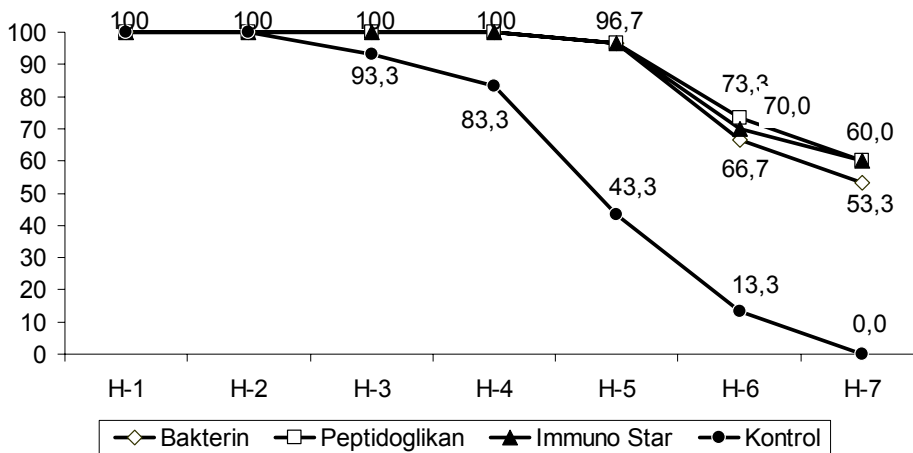
Upaya peningkatan tanggap kebal non-spesifik pada ikan budidaya laut sudah banyak dilaporkan. Matsumaya *et al.* (1992) melaporkan bahwa penyuntikan imunostimulan schizophyllan dari *Schizophyllum commune* dan β -glucan derivat dari *Sclerotium gluanicum* secara intraperitoneal dengan dosis 2-10 mg/kg

dapat meningkatkan daya tahan ikan *yellowtail*, *Seriola quinqueradiata* terhadap infeksi bakteri *Streptococcus* sp. Pada hewan air, pemberian imunostimulan β -1,3/1.6-glucans dapat meningkatkan daya tahan ikan terhadap infeksi mikroba (Raa *et al.*, 1992). Penyuntikan glucan dari yeast pada ikan *atlantic salmon*, *Salmo salar* L. dapat meningkatkan daya tahan ikan terhadap infeksi bakteri patogen (Jorgensen *et al.*, 1993). Pemberian peptidoglikan dari *Bifidobacterium thermophilum* dengan dosis 60 μ g peptidoglikan/kg bobot badan per hari, dapat meningkatkan daya tahan ikan *rainbow trout* terhadap infeksi bakteri *Vibrio anguillarum* (Matsuo & Miyazono, 1993). Selanjutnya pemberian lipopolisakarida, laminaran, dan sulphated laminaran { β (1,3)-D-glucan} dapat meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag ikan *atlantic salmon* (Dalmo & Seljelid, 1995). Aktivitas lisosim pada ikan turbot, *Scophthalmus maximus* L., meningkat pesat setelah penyuntikan β -glucan (Santarem *et al.*, 1997). Pada ikan *atlantic cod*, *Gadus morhua* L., penyuntikan imunostimulan β (1,3)-D-glucan (laminaran)

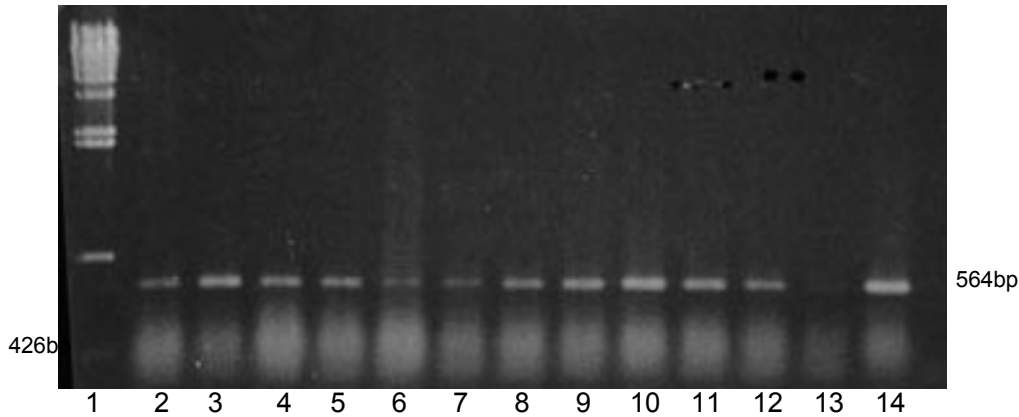
dapat meningkatkan tanggap kebal non spesifik ikan tersebut terhadap infeksi bakteri *Aeromonas salmonicida* dan *V. salmonicida* (Dalmo *et al.*, 1998). Penyuntikan M-glukan secara intraperitoneal dengan dosis 640 µg/ml pada *yellowtail*, *Seriola quinqueradiata* dapat meningkatkan daya tahan ikan terhadap infeksi bakteri *V. anguillarum* (Kawakami *et al.*, 1998). Pada ikan turbot, *Scophthalmus maximus* L. β-glucan dapat meningkatkan parameter tanggap kebal non-spesifik (Figueras *et al.*, 1998).

Sintasan benih kerapu bebek dengan perlakuan imunostimulan dan bakterin setelah uji tantang dengan penyuntikan VNN dan dipelihara selama 7 hari adalah sebagai berikut; pada hari ke-3 setelah uji tantang, pada ikan kontrol sudah terjadi kematian, meningkat pada hari berikutnya dan terjadi kematian total sampai hari ke-7. Untuk perlakuan imunostimulan, sampai hari ke-4 belum terjadi kematian, kematian mulai terjadi pada hari ke-5. Pada hari ke-6, kematian tertinggi terjadi pada perlakuan peptidoglikan, diikuti Immuno Star, dan bakterin. Pada hari ke-7, sintasan perlakuan peptidoglikan dan Immuno Star sama yaitu 60,00%, sedangkan bakterin 53,34% (Gambar 4).

Hasil penelitian memperlihatkan bahwa perlakuan imunostimulan dan bakterin dengan penyuntikan secara intraperitoneal (IP) efektif meningkatkan tanggap kebal non-spesifik benih kerapu bebek terhadap infeksi VNN. Nafsu makan ikan uji pada hari ke-2 setelah uji tantang menurun, pada hari ke-3 terlihat ikan mulai berenang tidak normal dengan posisi tubuh terbalik dan diikuti kematian terutama pada kontrol. Gejala klinis pada ikan yang diberi imunostimulan terlihat pada hari ke-4 dan kematian mulai terjadi pada hari berikutnya. Itami *et al.* (1996) melaporkan bahwa pemberian peptidoglikan dalam pakan dengan dosis 0,2 mg/kg/hari selama 21 hari pada ikan ekor kuning, *Seriola quinqueradiata* meningkatkan tanggap kebal non-spesifik dan setelah uji tantang memberikan sintasan (86%) lebih tinggi daripada kontrol (43%). Sebelumnya di BBRPBL Gondol, percobaan penggunaan imuno-stimulan pada kerapu bebek telah dilakukan, diantaranya penggunaan imuno-stimulan peptidoglikan dosis 1% dalam pakan segar ikan lemuru yang dicacah halus dan ditambahkan vitamin campuran memberikan sintasan hingga 72% dibandingkan kontrol sebesar 60% (Zafran *et al.*, 1999).



Gambar 4. Sintasan (%) benih kerapu bebek, *C. altivelis* dengan perlakuan imunostimulan dan bakterin setelah uji tantang dengan VNN selama 7 hari pengamatan.



Gambar 5. Hasil deteksi VNN dengan PCR setelah uji tantang dengan VNN pada benih kerapu bebek yang ditingkatkan respon imun spesifiknya dengan menggunakan imunostimulan (1 = marker; 2-4 = bakterin; 5-7 = peptidoglikan; 8-10 = immuno star; 11-12 = kontrol; 13 = negatif kontrol; 14 = positif kontrol).

Deteksi VNN dengan PCR terhadap benih kerapu bebek setelah uji tantang menunjukkan positif VNN (Gambar 5). VNN menimbulkan tingkat kematian yang tinggi pada ikan kontrol. Akan tetapi kematian lebih rendah pada ikan yang diberi imunostimulan dan bakterin menunjukkan bahwa imunostimulan dan bakterin mampu meningkatkan kekebalan ikan terhadap infeksi VNN.

Kesimpulan

1. Penggunaan imunostimulan pada benih kerapu bebek mampu meningkatkan kekebalan ikan terhadap infeksi VNN, terutama peningkatan respon imun non-spesifik yang meliputi aktivitas fagositik dan aktivitas lisosim.
2. Uji tantang dengan VNN menunjukkan bahwa ikan dengan perlakuan imunostimulan dan bakterin mampu memberikan hasil sintasan lebih tinggi dibanding kontrol.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih diucapkan kepada saudara Putu Suarjana, Sri Suratmi dan Slamet Haryanto selaku Teknisi Laboratorium Patologi yang telah banyak membantu penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Anderson, D.P. 1996. Environmental factors in fish health: immunological aspects. *In: The fish immune system: organism, pathogen and environment.* G. Iwama and T. Nakanishi (Eds.). Academic Press. California: 289-310.
- Arimoto, M., K. Mori, T. Nakai, K. Muroga, and I. Furusawa. 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.
- Dalmo, R.A. and R. Seljelid. 1995. The immunomodulatory effect of LPS, laminaran and sulphated laminaran { $\beta(1,3)$ -D-glucan} on Atlantic salmon, *Salmo salar* L., macrophages *in vitro*. *J. Fish Diseases.* 18: 175-185.
- Dalmo, R.A., B. Martinsen, T.E. Horsberg, A. Ramstad, C. Syvertsen, R. Seljelid, and K. Ingebrigtsen. 1998. Prophylactic effect of $\beta(1,3)$ -D-glucan (laminaran) against experimental *Aeromonas salmonicida* and *Vibrio salmonicida* infection. *Journal of Fish Disease.* 21: 459-462.

- Elder, A., A. Horovitz, and H. Bercovier. 1997. Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 56: 175-183.
- Ellis, A.E. 1993. Lysozyme assays. *In: Techniques in Fish Immunology-1*. J.S. Stolen, T.C. Fletcher, D.P. Anderson, B.S. Roberson, and W.B. van Mulswinkel (Eds.). SOS Publications, Fair Haven, NJ 07704-3303. USA: 101-103.
- Figueras, A., M.M. Santarem, and B. Novoa. 1998. Influence of the sequence of administration of β -glucans and *Vibrio damsela* vaccine on the immune response of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 64: 59-68.
- Itami, T., M. Kando, M. Uozu, A. Suganuma, T. Abe, A. Nakagawa, N. Suzuki, and Y. Takahashi. 1996. Enhancement of resistance against *Enterococcus seriolocida* infection in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* (Temminck and Schlegel), by oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *J. Fish Diseases*. 19: 185-187.
- Johnny, F., I. Koesharyani, D. Roza, Tridjoko, N.A. Giri, dan K. Suwiryana. 2001. Respon ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* terhadap imunostimulan peptidoglycan melalui pakan pelet. *J. Penel. Perikanan Indonesia*. VII (4): 52-56.
- Johnny, F. dan D. Roza. 2002. Pengaruh penyuntikan imunostimulan peptidoglikan terhadap peningkatan tanggap kebal non-spesifik ikan kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus*. Laporan Penelitian Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut. Gondol. 12 p.
- Jorgensen, J.B., H. Lunde, and B. Robertsen. 1993. Peritoneal and head kidney cell response to intra-peritoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Disease*. 16: 313-325.
- Kawakami, H., N. Shinohara, and M. Sakai. 1998. The non-specific immunostimulation and adjuvant effects of *Vibrio anguillarum* bacterin, M-glucan, chitin and Freud's complete adjuvant against *Pasteurella piscicida* infection in yellowtail. *Fish Pathology*. 33 (4): 287-292.
- Klontz, G.W. 1997. Fish Hematology. *In: Techniques in Fish Immunology-3* (2nd Ed). Stolen, J.S., T.C. Fletcher, A.F. Rowley, J.T. Zelikoff, S.L. Kaattari, S.A. Smith. (Eds.). SOS Publications, Fair Haven, NJ 07704-3303. USA: 121-131.
- Koesharyani, I., Zafran, dan K. Yuasa. 1999. Deteksi viral nervous necrosis (VNN) menggunakan polymerase chain reaction (PCR) pada ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis*. Prosiding Seminar Nasional Penelitian dan Desiminasi Teknologi Budidaya Laut dan Pantai. Jakarta. 12 p.
- Koesharyani, I., D. Roza, K. Mahardika, F. Johnny, Zafran, and K. Yuasa. 2001. Marine fish and crustaceans diseases in Indonesia *In: Manual for fish diseases diagnosis II*. K. Sugama, K. Hatai and T. Nakai. (Eds.). Gondol Research Station for Coastal Fisheries, CRIFI and Japan International Cooperation Agency. 49 p.
- Matsuo, K. and I. Miyazono. 1993. The influence of long-term administration of peptidoglycan on disease resistance and growth of juvenile rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 59 (8): 1377-1379.
- Matsuyama, H., R.E.P. Mangindaan, and T. Yano. 1992. Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. infection in

- yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture*. 101: 197-203.
- Mori, K., K. Mushiake, and M. Arimoto. 1998. Control measures for viral nervous necrosis in striped jack. *Fish Pathology*. 33 (4): 443-444.
- Mushiake, K., T. Nishizawa, T. Nakai, I. Furusawa, and K. Muroga. 1994. Control of VNN in striped jack; Selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR). *Fish Pathology*. 29 (3): 93-98.
- Nakai, T., H.D. Nguyen, T. Nishizawa, K. Muroga, M. Arimoto, and Otsuki. 1994. Outbreaks of viral nervous necrosis in *Epinephelus moara* and tiger puffer *Takifugu rubripes*. *Fish Pathology*. 29: 211-212.
- Nishizawa, T., K. Mori, T. Nakai, I. Furusawa, and K. Muroga. 1994. Polymerase chain reaction (PCR) amplication of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis. Aquat. Org.* 18: 103-107.
- Raa, J., G. Roerstad, R. Engstad, and B. Robertsen. 1992. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. *In: Diseases in Asian aquaculture*. I.M. Shariff, R.P. Subasinghe, and J.R. Arthur (Eds.). Fish Health Section. Asian Fisheries Society. Manila. Philippines: 39-50.
- Rowley, A.F. 1993. Collection, separation and identification of fish leucocytes. *In: Techniques in fish immunology-1*. Stolen, J.S., T.C. Fletcher, D.P. Anderson, B.S. Roberson, W.B. van Mulswinkel. (Eds.). SOS Publications. Fair Haven. NJ 07704-3303. USA: 114-136.
- Roza, D., F. Johnny, S. Kawahara, dan A. Hanafi. 2002a. Penyakit pada budidaya ikan kerapu dan upaya penanggulangannya. Kumpulan Makalah Seminar Pengembangan Teknologi Budidaya Kerapu. Balai Budidaya Laut Lampung-JICA: 75-86.
- Roza, D., K. Mahardika, F. Johnny, Zafran, dan Tridjoko. 2002b. Pengaruh perbedaan dosis vaksin melalui perendaman terhadap ketahanan juvenil kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* oleh infeksi Viral Nervous Necrosis (VNN). Laporan Hasil Penelitian DIP 2002. Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol: 91-101.
- Roza, D., K. Mahardika, F. Johnny, Zafran, dan Tridjoko. 2002c. Pengaruh lama perendaman dalam vaksin terhadap ketahanan juvenil kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* oleh infeksi Viral Nervous Necrosis (VNN). Laporan Hasil Penelitian DIP 2002. Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol. 102-111.
- Roza, D., F. Johnny, and K. Mahardika. 2003. Viral diseases of grouper in Indonesia. Makalah pada Training on Grouper Hatchery Seed Production. Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol.- NACA Bangkok. Gondol 1-21 Mei 2003. 12 p.
- Rukyani, A., E. Silvia, A. Sunarto, dan Taukhid. 1997. Peningkatan respon kebal non-spesifik pada ikan lele dumbo (*Clarias* sp) dengan pemberian imunostimulan (β -glucan). *JPPPI II* (1): 1-10.
- Santarem, M., B. Novoa, and A. Figueras. 1997. Effect of β -Glucan on the non-specific immune responses of turbot (*Schophthalmus maximus* L.). *Fish and Shellfish Immunology*. 7: 429-437.
- Secombes, C.J. 1996. The nonspecific immune system; cellular defences. *In: The fish immune system: organism, pathogen and environment*. G. Iwama and T. Nakanishi (Eds.). Academic Press. San Diego. California: 63-95.
- Siwicki, A.K. and D.P. Anderson. 1993. Immunostimulation in fish; measures

- the effects of stimulants by serological and immunological methods, International Workshop and Training Course in Poland. 15 p.
- Thompson, K.D., J.H. Lilley, S.C. Chen, A. Adams, and R.H. Richards. 1999. The immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Aphanomyces invadans*. *Fish and Shellfish Immunology*. 9: 195-210.
- Vadstein, O. 1997. The use of immunostimulan in marine larviculture: possibilities and challenges. *Aquaculture*. 155: 401-417.
- Watanabe, K., S. Suzuki, T. Nishizawa, K. Suzuki, M. Yoshimizu, and Y. Ezura. 1998. Control strategy for viral nervous necrosis of barfin flounder. *Fish Pathology*. 33 (4): 445-446.
- Yuasa, K., I. Koesharyani, D. Roza, F. Johnny, and Zafran. 2001. Manual for PCR procedure; Rapid diagnosis on Viral Nervous Necrosis (VNN) in grouper. Lolitkanta-JICA Booklet No. 13. 35 p.
- Zafran, I. Koesharyani, D. Roza, F. Johnny, dan K. Yuasa. 1998. Peningkatan sintasan ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) dengan penambahan vitamin dan imunostimulan ke dalam pakan segar. Sudrajat, A., E.S. Heruwati, K. Sugama, A. Purnomo, Z.I. Azwar, dan I.N.A. Giri. (Eds.) Seminar Teknologi Perikanan Pantai. Denpasar 6-7 Agustus 1998. 164-168.
- Zafran, I. Koesharyani, F. Johnny, dan Wardoyo. 1999. Pengaruh imunostimulan peptidoglycan terhadap keragaan juvenil ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis*. Loka Penelitian Perikanan Pantai Gondol-Bali. Laporan Penelitian. 6 p.