

**Full Paper****APLIKASI BAKTERIN SEBAGAI IMUNOSTIMULAN  
UNTUK PENCEGAHAN INFEKSI VIRAL NERVOUS NECROSIS (VNN)  
PADA BENIH IKAN KERAPU BEBEK, *Cromileptes altivelis*****APPLICATION OF IMMUNOSTIMULANT BACTERIN  
FOR PREVENTION OF VIRAL NERVOUS NECROSIS (VNN) INFECTION  
ON SEED HUMPBACK GROUPEL, *Cromileptes altivelis***Des Roza<sup>1)</sup> dan Fris Johnny<sup>2)</sup>**Abstract**

An experiment on application of immunostimulant bacterin in order to prevent Viral Nervous Necrosis (VNN) in seed production of humpback grouper, *Cromileptes altivelis* has been conducted in Gondol Research Institute for Mariculture hatchery. The experiment arranged in completely randomized design with two replicates. One thousand and five hundred fry with total length 4 cm were treated as followed ; 1 ml bacterin/L sea water by immersion (Treatment A), 1 ml bacterin/kg pellet by orally (Treatment B), and without bacterin as a control (C). Bacterin was immersion and orally every 10 days for 60 days rearing period. Challenge test with VNN was carry out at day 30 and 60. At the end of experiment the non-specific immune were examined. Result of challenge test performed at day 30 showed that treated fish gave positive response to bacterin treatment. The highest survival showed by treatment B (65.0%) followed by treatment A(50.0%) and C (22.5%). The same result also showed after challenge test at day 60. The highest survival was 72.5% (treatment B) followed by 67.5% (treatment A) and 35.0% (control). Phagocytic activity (PA) of treatment B was 15.5%, and 14.0% from treatment A compared to 8.0% in control. Lysozyme activity (LA) of treated groups were also higher than control namely 1.8 cm for treatment B followed by 1.6 cm for treatment A, and only 1.2 cm in control. Addition of bacterin immunostimulant in feed gives is survival rate higher compared to way of immersion and control. Statistically non-specific immune response of humpback grouper was significant different among treatment ( $P < 0,05$ ).

**Key words: Humpback grouper, immunostimulant, prevention, VNN****Pengantar**

Upaya produksi benih ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* telah semakin berkembang dengan intensif di hatchery. Namun masih ditemukan beberapa kendala dengan masih tingginya tingkat kematian, salah satu penyebab kematian tersebut akibat adanya infeksi penyakit terutama infeksi virus yaitu Viral Nervous Necrosis yang dikenal dengan VNN (Roza *et al.*, 2004).

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.*, 2004). 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

<sup>1)</sup> Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol. PO BOX 140, Singaraja 81101 Bali<sup>2)</sup> Penulis untuk korespondensi: E-mail : frisjravael@yahoo.com

nafsu makan menurun drastis biasanya 3-5 hari setelah adanya gejala klinis ikan akan mati (Roza *et al.*, 2004). Upaya efektif untuk pencegahan infeksi virus antara lain penggunaan imunostimulan (Secombes, 1996; Rukyani *et al.*, 1997; Johnny *et al.*, 2001; Johnny & Roza, 2004<sup>a</sup>; 2004<sup>b</sup>).

Imunostimulan merupakan sekelompok senyawa biologi dan sintesis yang dapat meningkatkan tanggapan kebal spesifik dan non-spesifik. Mekanisme kerja imunostimulan yaitu dengan cara meningkatkan aktivitas oksidatif netrofil (Anderson, 1996). Aplikasi imunostimulan sudah banyak diterapkan pada beberapa jenis ikan baik melalui perendaman, suntikan maupun secara oral melalui pakan. Imunostimulan yang telah banyak dikenal antara lain  $\beta$ -glukan, peptidoglikan, lipopolisakarida, bakterin dan sebagainya (Santarem *et al.* 1997; Vadstein, 1997; Midtlyng *et al.*, 1998; Thompson *et al.*, 1999; Johnny *et al.*, 2001; Johnny & Roza, 2004<sup>a</sup>; 2004<sup>b</sup>; Roza *et al.*, 2004).

Upaya peningkatan tanggapan kebal non-spesifik pada ikan budidaya laut sudah banyak dilaporkan. Percobaan penggunaan imunostimulan pada ikan kerapu telah dilakukan di Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut (BBRPBL) Gondol, Bali diantaranya pemberian imunostimulan peptidoglikan dalam pakan pelet (Johnny *et al.*, 2001), dengan perendaman (Johnny & Roza, 2004<sup>a</sup>), penyuntikan peptidoglikan secara intraperitoneal pada ikan kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus* (Johnny & Roza, 2004<sup>b</sup>).

Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan kekebalan benih ikan kerapu bebek yang diproduksi di hatchery terhadap infeksi Viral Nervous Necrosis (VNN) dengan menggunakan bakterin sebagai imunostimulan.

## Bahan dan Metode

### Benih uji

Benih uji yang digunakan adalah ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* dengan panjang total 4 cm berasal dari produksi benih di hatchery sekitar BBRPBL Gondol, Bali. Benih dipelihara di hatchery dengan menggunakan bak polikarbonat volume 2 m<sup>3</sup> sebanyak 6 buah, masing-masing bak berisikan 250 ekor ikan uji. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 perlakuan dan 2 ulangan serta pengujian statistik dengan ANOVA, sedangkan perlakuan sebagai berikut :

(A). 1 mL bakterin/L air laut melalui perendaman selama 3 jam  
 (B). 1 mL bakterin/kg pakan pelet melalui oral  
 (C). Tanpa perlakuan bakterin sebagai kontrol

Bakterin diberikan setiap 10 hari selama 60 hari pemeliharaan. Setelah 30 dan 60 hari perlakuan dilakukan uji tantangan dengan VNN, dan pada akhir percobaan dilakukan pengambilan darah untuk pengujian respon imun non-spesifik dari masing-masing perlakuan.

### Pembuatan bakterin

Bakterin yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari bakteri *Vibrio harveyi* yang dimatikan dengan 0,5% formalin selama 24 jam pada suhu 25°C. Setelah itu bakteri disentrifugasi pada 3.200 rpm selama 20 menit, kemudian dicuci sebanyak 3 kali dengan larutan garam fisiologis (0,85% NaCl). Kepadatan suspensi bakterin adalah 10<sup>10</sup> cfu/ml dan diestimasi sebelum bakteri dimatikan dengan metode taburan. Sebelum bakterin diberikan 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 lemari 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 2 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 sebesar 0,45 µm (Arimoto *et al.*, 1993).

### *Deteksi VNN*

Metode yang digunakan untuk deteksi VNN berpedoman pada Yuasa *et al.* (2001). Ekstraksi RNA menggunakan trizol, 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 menggunakan alat Progene (Techne) dengan Nested amplikasi, kit yang digunakan adalah IQ 2000 (Intelligence). Selanjutnya produk PCR ini dielektroforesis pada 1,5% agarose gel (Sigma) selama 25 menit dalam 1 x 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 30 dan 60 hari setelah pemberian bakterin. Wadah yang digunakan untuk uji tantang adalah bak polikarbonat volume 100 L yang diisi 80 L air laut. Air laut disaring dengan saringan 0,45 µm, dan kepadatan ikan 20 ekor/bak. VNN diinfeksi dengan penyuntikkan secara intramuskular, selanjutnya ikan dipelihara dengan pergantian air setiap hari. Pengamatan terhadap gejala klinis

dan sintasan dilakukan selama 7 hari.

### *Koleksi leukosit dan pemisahan plasma*

Darah ikan uji diambil dari vena anterior setelah terlebih dahulu ikan uji dipingsankan dengan 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 1 cc dan didalamnya telah berisikan Heparin (Sigma) sebagai antikoagulan. 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 1.200 rpm selama 10 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 koleksi darah pada tabung mikro disentrifusi dengan minisentrifusi kecepatan 500 rpm selama 5 menit, kemudian dipisahkan plasma darah 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 dibutuhkan bahan enzim Zymosan A (produksi Sigma) yang berasal dari *Saccharomyces cerevisiae*. Zymosan A diambil sebanyak 50 µl yang telah dilarutkan dengan larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS), dimasukkan kedalam tabung mikro Selanjutnya diambil leukosit yang telah disiapkan sebanyak 50 µl dan dicampurkan dengan Zymosan A, diaduk rata dengan mikro pipet, disimpan pada suhu 25 °C selama 1 jam. Kemudian diteteskan pada kaca slide, dibuatkan preparat ulas tipis, dilakukan pewarnaan darah dengan *May-Gruenwald's Solution Modified* dan *Giemsa Solution 3%*. Uji PA dan PI

menggunakan modifikasi dari metoda Siwicki & Anderson (1993) dan Ellis (1993). Aktivitas fagositik (PA) dan indeks fagositik (PI) dihitung berdasarkan rumus berikut ;

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

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

**Uji aktivitas lisosim (LA)**

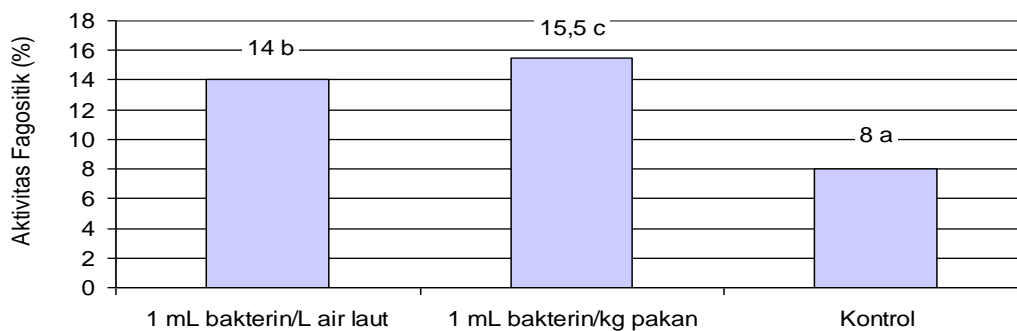
Mula-mula disiapkan media agar yang mengandung *Micrococcus lysodeikticus* (produksi Sigma) pada cawan petri. Cawan petri yang berisikan media agar, dibuatkan lobang kecil sebanyak tiga lobang pada permukaan agar dengan menggunakan straw, dimasukkan sebanyak 10 µl plasma darah, dan pada lobang satunya dimasukkan Chicken egg white lysozyme (produksi Sigma) sebagai kontrol. Didiamkan dulu selama 10 menit pada suhu kamar, kemudian disimpan pada inkubator dengan suhu 25 °C, dicek setiap hari dan diukur cakram zona aktivitas lisosim (LA), pengamatan dilakukan selama 3 hari. Pengujian LA menggunakan modifikasi dari metoda Rowley (1993) dan Klontz (1997). Nilai LA dihitung dengan berdasarkan rumus berikut

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

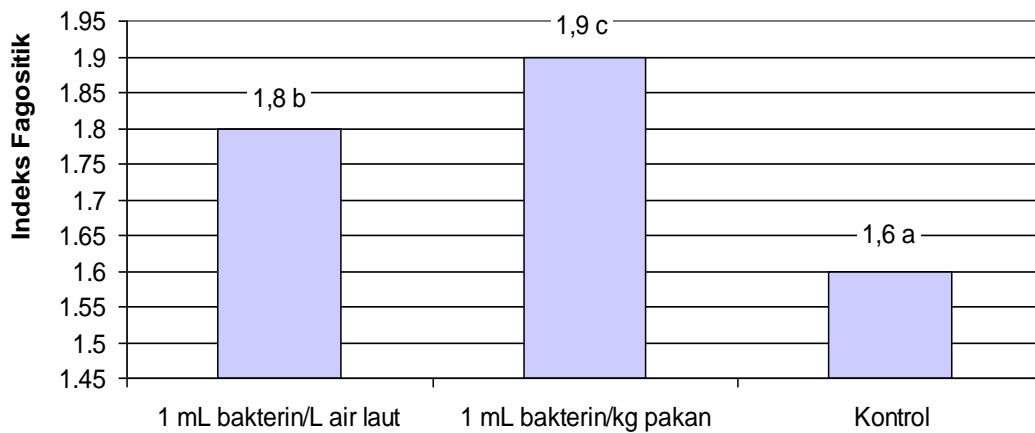
Data dari nilai persentase aktivitas fagositik, indeks fagositik dan diameter cakram aktivitas lisosim yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisis dengan ANOVA. Untuk mengetahui perlakuan yang berbeda dilakukan uji LSD (Least Sidnificant Difference by Student's T) dengan level signifikan 95%.

**Hasil dan Pembahasan**

Hasil percobaan pengaruh aplikasi bakterin sebagai imunostimulan melalui perendaman dan pakan (oral) terhadap keragaan aktivitas fagositik (PA) benih ikan kerapu bebek disajikan pada Gambar 1 dan nilai indeks fagositik (PI) disajikan pada Gambar 2. Hasil pengamatan terhadap aktivitas fagositik pada Gambar 1 dapat dilihat bahwa pemberian bakterin pada benih ikan kerapu bebek melalui pakan (oral) dan perendaman memberikan nilai aktivitas fagositik (PA) lebih baik dibandingkan dengan kontrol. Nilai PA pada pemberian imunostimulan melalui oral sebesar 15,5% diikuti dengan perendaman sebesar 14% dan kontrol sebesar 8%. Analisis sidik ragam menunjukkan berbeda nyata (P<0,05) dengan kontrol.



Gambar 1. Aktivitas fagositik (PA) leukosit benih ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* dengan pemberian bakterin setelah 60 hari pemeliharaan. Setiap nilai yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak beda nyata (P>0,05).

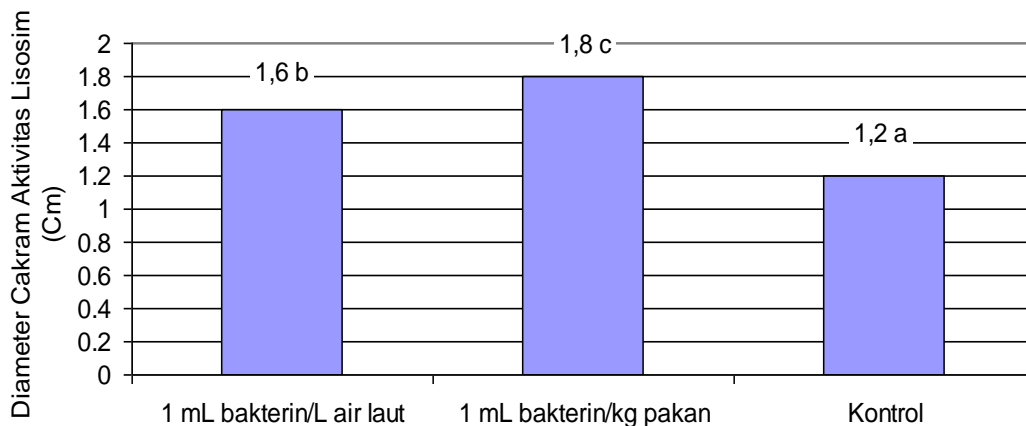


Gambar 2. Indeks fagositik (PI) leukosit benih ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* dengan pemberian bakterin setelah 60 hari pemeliharaan. Setiap nilai yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak beda nyata ( $P>0,05$ ).

Dari Gambar 2 terlihat bahwa nilai PI tertinggi diperoleh pada perlakuan pemberian imunostimulan melalui oral sebesar 1,9 diikuti oleh pemberian imunostimulan melalui perendaman sebesar 1,8 dan kontrol sebesar 1,6. Hasil analisis sidik ragam menunjukkan berbeda nyata ( $P<0,05$ ) dengan kontrol.

Hasil pengujian diameter cakram aktivitas lisosim dengan menggunakan imunostimulan pada benih ikan kerapu

bebek disajikan pada Gambar 3. Hasil pengamatan terhadap aktivitas lisosim (LA) menunjukkan diameter cakram terbesar pada pemberian imunostimulan melalui oral, diikuti pemberian imunostimulan melalui perendaman dan kontrol. Nilai diameter cakram LA tertinggi sebesar 1,8 cm (oral), sebesar 1,6 cm (perendaman) dan sebesar 1,2 cm (kontrol) dan uji statistik menunjukkan berbeda nyata ( $P<0,05$ ).



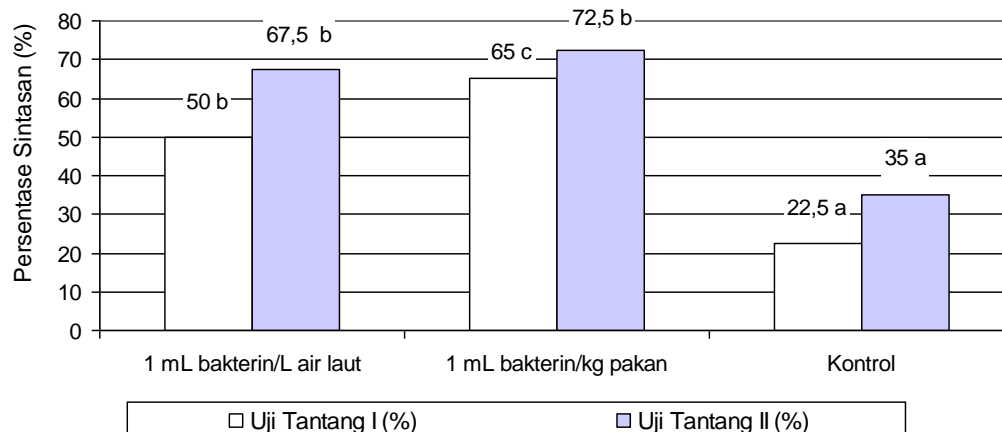
Gambar 3. Diameter cakram (cm) aktivitas lisosim (LA) plasma benih ikan kerapu bebek dengan pemberian bakterin setelah 60 hari pemeliharaan. Setiap nilai yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak beda nyata ( $P>0,05$ )

Dalam percobaan ini terlihat bahwa pemberian bakterin sebagai imunostimulan melalui oral memberikan nilai PA, PI dan LA yang lebih baik dari pada pemberian bakterin melalui perendaman dan kontrol. Diduga pemberian bakterin melalui oral lebih efektif dibandingkan dengan cara perendaman. Setelah pakan dicampur dengan imunostimulan, kemudian diberikan pada ikan melalui oral, di dalam tubuh ikan langsung diserap melalui organ pencernaan. Bakterin sebagai imunostimulator langsung memacu sel-sel fagosit untuk aktif bekerja. Sedangkan pemberian bakterin melalui perendaman melalui proses yang lebih panjang untuk mencapai sel fagosit, penyerapan bakterin melalui tubuh ikan tidak secepat penyerapan dalam saluran pencernaan.

Pada percobaan sebelumnya, Johnny *et al.*, (2001) melaporkan bahwa pemberian imunostimulan peptidoglikan dalam pakan dengan dosis 0,2 g/kg pakan pada benih ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* dapat meningkatkan nilai PA sebesar 8,8% dibanding kontrol sebesar 2,8%. Penyuntikan imunostimulan peptidoglikan pada benih ikan kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus* dosis 50 mg/kg ikan meningkatkan nilai PA sebesar 11,7% dibanding kontrol sebesar 6,7% (Johnny *et al.*, 2002). Penyuntikan imunostimulan bakterin dengan kepadatan  $10^7$  cfu/ml dosis 0,1 ml/ekor pada benih ikan kerapu lumpur, *Epinephelus coioides* memberikan nilai PA sebesar 17,33% (Johnny & Roza, 2004<sup>b</sup>). Penambahan vitamin B6 dalam pakan pelet dengan dosis 6 mg/100 g pakan pada benih ikan kerapu bebek memberikan nilai PA sebesar 10,08% dibanding kontrol sebesar 7,25% (Johnny *et al.*, 2005), dan pada jenis ikan yang sama penyuntikan peptidoglikan secara intraperitoneal dengan dosis 200 mg/kg bobot memberikan nilai PA sebesar 20% dan kontrol sebesar 10% (Johnny & Roza, 2004<sup>b</sup>). Pemberian

bakterin sebagai imunostimulan melalui perendaman lebih efektif pada ikan stadia larva sampai umur 14 hari, karena organ pencernaan ikan belum terbentuk sempurna (Johnny & Roza, 2004<sup>a</sup>). Pada laporan lainnya, aplikasi imunostimulan melalui penyuntikan paling efektif dibandingkan melalui oral dan perendaman (Dalmo *et al.*, 1998; Kawakami *et al.*, 1998; Johnny & Roza, 2004<sup>a</sup>; 2004<sup>b</sup>), namun aplikasi dilapangan akan mengalami kendala apabila jumlah ikan sangat banyak dan berukuran kecil.

Aktivitas fagositik adalah suatu kegiatan sel-sel fagosit untuk melakukan fagositosis dalam suatu sistem kekebalan non-spesifik, dengan melibatkan sel mononuklier (monosit dan makrofag), granulosit (neutrofil), dan limfosit. Fagosit mempunyai kemampuan intrisik untuk mengikat mikroorganisme secara langsung. Fagositosis yang efektif pada invasi kuman dini akan dapat mencegah timbulnya infeksi. Dalam kerjanya, sel fagosit juga berinteraksi dengan komplemen dan sistem kekebalan spesifik. Monosit ditemukan dalam sirkulasi, tetapi dalam jumlah yang lebih kurang dibanding neutrofil. Sel-sel tersebut bermigrasi ke jaringan dan disana berdiferensiasi menjadi makrofag yang seterusnya hidup dalam jaringan. Makrofag dapat hidup lama, mempunyai beberapa granula dan melepas berbagai bahan, antara lain lisosim, komplemen, interferon dan sitokin yang semuanya memberikan kontribusi dalam sistem kekebalan non-spesifik dan spesifik (Secombes, 1996). Lisosim adalah enzim hidrolitik yang ada di dalam lendir, serum dan sel-sel fagositik dari pelbagai spesies ikan. Kemungkinan zat ini memberikan daya kekebalan yang penting terhadap patogen mikrobik. Neutrofil dan monosit dari ikan-ikan mengandung lisosim dalam sitoplasmanya dan lisosim serum mungkin berasal dari leukosit-leukosit tersebut (Ellis, 1993).

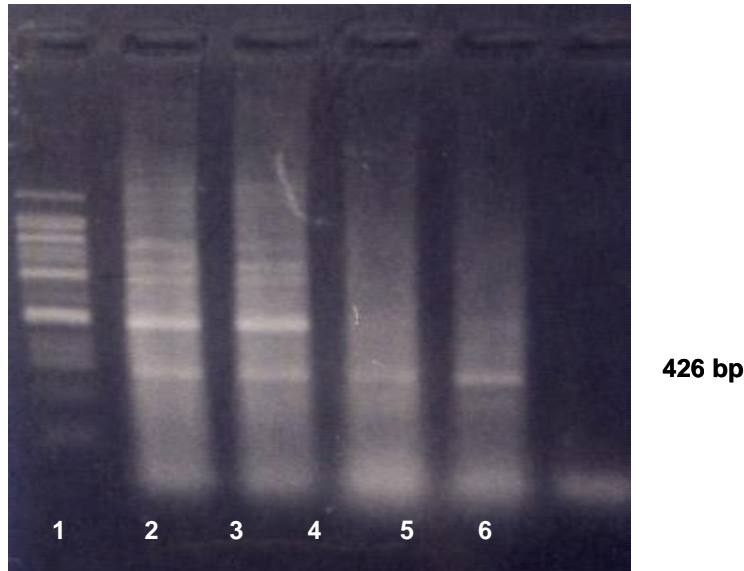


Gambar 4. Sintasan (%) benih ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* dengan pemberian bakterin setelah uji tantang pada hari ke 30 dan 60 dengan VNN selama 7 hari pengamatan. Setiap nilai yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak beda nyata ( $P>0,05$ ).

Sintasan benih ikan kerapu bebek dengan pemberian imunostimulan setelah dilakukan uji tantang dengan VNN disajikan pada Gambar 4. Hasil uji tantang pertama setelah 30 hari perlakuan dengan menginfeksi inokulum VNN secara intramuskular memberikan hasil sintasan tertinggi pada perlakuan pakan (65%), diikuti melalui perendaman (50%) dan kontrol (22,5%). Hasil uji tantang kedua setelah 60 hari perlakuan, sintasan tertinggi diperoleh pada pemberian imunostimulan melalui oral sebesar 72,5%, diikuti melalui perendaman sebesar 67,5% dan kontrol sebesar 35%. Dari hasil uji tantang ini juga terlihat bahwa hasil uji tantang kedua memberikan persentase sintasan lebih tinggi dari uji tantang pertama. Hal ini juga mungkin disebabkan karena pada uji tantang kedua benih ikan telah mengalami pemberian imunostimulan berulang kali dan diduga ini merupakan booster yang dapat memicu peningkatan respon imun non-spesifik ikan. Analisis sidik ragam menunjukkan sintasan lebih tinggi pada benih ikan kerapu bebek dengan pemberian bakterin dan berbeda nyata ( $P<0,05$ )

dengan kontrol. Setelah benih ikan kerapu bebek diinfeksi dengan VNN, gejala klinis yang terlihat dimulai dengan penurunan nafsu makan ikan, pada hari ke-3 terlihat ikan mulai berenang tidak normal dengan posisi tubuh terbalik dan diikuti adanya kematian terutama pada kontrol, pada hari ke-4 kematian mulai terjadi dan berlanjut pada hari berikutnya. Itami *et al.* (1996) melaporkan bahwa pemberian peptidoglikan dalam pakan selama 21 hari pada ikan ekor kuning, *Seriola quinqueradiata* dapat meningkatkan tanggap kebal non-spesifik dan setelah uji tantang memberikan sintasan yang lebih tinggi. Selanjutnya pada benih ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* penyuntikan imunostimulan secara intraperitoneal menghasilkan sintasan lebih baik (Roza *et al.*, 2004). Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa pemberian bakterin melalui pakan efektif untuk meningkatkan tanggap kebal non-spesifik benih ikan kerapu bebek terhadap infeksi VNN.

Deteksi VNN dengan PCR terhadap benih ikan kerapu bebek setelah uji tantang menunjukkan semua perlakuan positif VNN (Gambar 5).



Gambar 5. Hasil deteksi VNN dengan PCR setelah uji tantang dengan VNN pada benih ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* yang ditingkatkan respon imun non-spesifiknya dengan pemberian bakterin (1 = marker; 2 = perlakuan A; 3 = perlakuan B; 4 = perlakuan C (kontrol); 5 = positif kontrol; 6 = negatif kontrol).

Dalam uji tantang, semua ikan uji diinfeksi VNN secara intramuskular, terhadap ikan yang hampir mati (moribund) dilakukan pengambilan sampel untuk deteksi virus dengan PCR. VNN menimbulkan tingkat kematian yang tinggi pada ikan kontrol, akan tetapi kematian lebih rendah pada ikan yang diberi bakterin. Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan bakterin pada benih ikan kerapu bebek mampu meningkatkan kekebalan ikan terhadap infeksi VNN.

### Kesimpulan

Pemberian bakterin pada benih ikan kerapu bebek dapat sebagai imunostimulan yang mampu meningkatkan kekebalan ikan terhadap infeksi Viral Nervous Necrosis (VNN). Aplikasi bakterin melalui oral lebih efektif untuk meningkatkan respon imun non-spesifik yang meliputi aktivitas fagositik (PA) dan aktivitas lisosim (LA) serta sintasan dibandingkan dengan cara perendaman.

### Ucapan Terimakasih

Terimakasih diucapkan kepada Saudara Putu Suarjana 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. San Diego, California. p. 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). *Journal of Fish Disease*. 16:461 – 469.

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.
- Ellis, A.E. 1993. Lysozyme assays. 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. p.101-103
- Itami, T., M. Kando, M. Uozu, A. Suganuma, T. Abe, A. Nakagawa, N. Suzuki and Y. Takahashi. 1996. Enhancement of resistance against *Enterococcus seriolicida* infection in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* (Temminck & Schlegel), by oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Journal of Fish Disease*. 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. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. Vol. VII. (4):52-56.
- Johnny, F., Zafran, D. Roza dan I. N. A. Giri. 2002. Pengaruh vitamin C dalam pakan terhadap perubahan hemositologi ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis*. *Jurnal Aquaculture Indonesia*. 3(1):27-34.
- Johnny, F., D. Roza, K. Mahardika, Zafran dan A. Prijono. 2005. Penggunaan imunostimulan untuk meningkatkan kekebalan non-spesifik benih ikan kerapu lumpur, *Epinephelus coioides* terhadap infeksi virus irido. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. Vol. 11(5):75 - 84.
- Johnny, F. dan D. Roza. 2004<sup>a</sup>. Penggunaan imunostimulan pada larva ikan kerapu lumpur, *Epinephelus coioides* untuk meningkatkan kekebalan terhadap infeksi virus irido. *Prosiding Seminar Nasional Penyakit Ikan dan Udang IV*, di Purwokerto, 18-19 Mei 2004. Hal. 80-85.
- Johnny, F. dan D. Roza. 2004<sup>b</sup>. Pengaruh penyuntikan imunostimulan peptidoglikan terhadap peningkatan tanggap kebal non-spesifik ikan kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus*. *Jurnal Aquaculture Indonesia*. Volume 5(2): 109-115.
- 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. *Journal of Fish Pathology*, 33(4):287-292.
- Klontz, G.W. 1997. *Fish Hematology*. In : *Techniques in fish immunology-3* (2<sup>nd</sup> 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. p.121-131
- Midtlyng, P.J., Reitan, L.J. and Speilberg, L. 1996. Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Journal of Fish & Shellfish Immunology* 6:335-350.
- Mori, K., K. Mushiake and M. Arimoto. 1998. Control measures for viral

- nervous necrosis in striped jack. *Journal of 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). *Journal of 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*. *Journal of 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). *Journal of Dis. Aquat. Org.* 18. 103 – 107.
- 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. p.114-136.
- Roza, D., F. Johnny dan Tridjoko. 2004. Peningkatan imunitas yuwana ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* terhadap infeksi viral nervous necrosis (VNN) dengan cara vaksinasi melalui perendaman. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia* Vol. 10 No.1 Tahun 2004. Hal. 61-70.
- Rukyani, A., E. Silvia, A. Sunarto dan Tauhid. 1997. Peningkatan respon kebal non-spesifik pada ikan lele dumbo (*Clarias* sp) dengan pemberian imunostimulan ( $\beta$ -glucan). *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia* II(1):1-10.
- Santarem, M., B. Novoa and A. Figueras. 1997. Effect of  $\beta$ -Glucan on the non-specific immune responses of turbot (*Schophthalmus maximus* L.). *Journal of Fish & 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. p. 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*. *Journal of Fish&Shellfish Immunology*. 9;195-210.
- Vadstein, O. 1997. The use of immunostimulatin in marine larviculture: possibilities and challenges. *Journal of Aquaculture*. 155:401-417.
- 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 pp.