

PENGUNAAN IMMUNOSTIMULAN UNTUK MENINGKATKAN KEKEBALAN NON-SPEKIFIK BENIH IKAN KERAPU LUMPUR, *Epinephelus coioides* TERHADAP INFEKSI VIRUS IRIDO

Fris Johnny, Des Roza, Ketut Mahardika, Zafran, dan Agus Priyono

ABSTRAK

Suatu percobaan dengan tujuan meningkatkan kekebalan non spesifik benih ikan kerapu lumpur terhadap infeksi virus irido dengan imunostimulan telah dilakukan di Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol-Bali. Benih ikan kerapu lumpur dengan bobot antara 36—82 g disuntik secara intraperitoneal dengan bakterin pada kepadatan 10^7 cfu/mL dosis 0,1 mL/ekor (A). Setelah 14 hari dilakukan penyuntikan ulang bakterin (B), sebagai kontrol (C) adalah benih yang disuntik dengan larutan garam fisiologis. Pengamatan dilakukan terhadap parameter respon imun non-spesifik yaitu: aktivitas fagositik (PA), indeks fagositik (PI), dan aktivitas lisosim (LA). Respon imun non-spesifik benih dengan perlakuan bakterin setelah diuji tantang dengan virus irido pada hari ke-10 adalah: PA pada perlakuan bakterin sebesar 12,67% (A) dan kontrol 8,67% (C), LA pada perlakuan bakterin sebesar 1,83 cm (A); dan kontrol 1,38 cm (C). Setelah hari ke-20; PA pada perlakuan bakterin dengan booster sebesar 15,33% (B), non booster sebesar 14,00% (A), dan kontrol 10,67% (C). LA pada perlakuan bakterin dengan booster sebesar 1,87 cm (B), non booster sebesar 1,82 cm (A), dan kontrol 1,43 cm (C). Setelah hari ke-30; PA pada perlakuan bakterin dengan booster sebesar 17,33% (B), non booster sebesar 14,67% (A), dan kontrol 11,33% (C). LA pada perlakuan bakterin dengan booster sebesar 1,97 cm (B), non booster sebesar 1,75 cm (A), dan kontrol 1,47 cm (C). Perlakuan imunostimulan bakterin dapat meningkatkan sintasan dan memacu timbulnya kekebalan non spesifik benih ikan kerapu lumpur terhadap infeksi virus irido.

ABSTRACT: *Application of the immunostimulant to increase of the non-specific immune response on the orange spotted grouper juvenile, Epinephelus coioides against iridovirus infection. By: Fris Johnny, Des Roza, Ketut Mahardika, Zafran, and Agus Priyono*

An experiment on the evaluation of the effectiveness of immunostimulant was conducted at the Disease Laboratory of Research Institute for Mariculture, Gondol-Bali. The objective is to stimulate immune response of orange spotted grouper juvenile using immunostimulant. The orange spotted grouper juvenile about 36—82 g in bodyweight were injected by immunostimulant with the treatment design as follow; immunostimulant with non booster (A), immunostimulant bacterine with booster (B), and control (C). Challenge test with iridovirus was done on 10, 20, and 30 days after treatment. The non specific immune response parameters changes in the fish observed were phagocytic activity (PA), phagocytic index (PI), and lysozyme activity (LA). Result showed values of PA on 10 days post treatment as 12.67% (A). LA values was 1.87 cm (A), and 1.38 cm (C). On 20 days post treatment as values PA 15.33% (B), 14.00% (A), and 10.67% (C). Values of LA 1.87 cm (B), 1.82 cm (A), and 1.43 cm (C). And on 30 days post treatment values of PA as 17.33% (B), 14.67% (A), and 11.33% (C). Values of LA 1.97 cm (B), 1.75 cm (A), and 1.47 cm (C). Immunostimulant was able to increase survival rate of orange spotted grouper juvenile and stimulated non specific immune response.

KEYWORDS: *immunostimulant, non-specific immune response, orange spotted grouper juvenile, iridovirus*

PENDAHULUAN

Ikan kerapu lumpur, *Epinephelus coioides* telah berhasil dipijahkan secara terkontrol di Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol-Bali. Namun masih ditemukan beberapa kendala dengan masih tingginya tingkat kematian pada stadia larva dan benih.

Pemeliharaan ikan secara intensif di panti benih berpeluang untuk terserang lebih dari satu jenis penyakit pada waktu bersamaan. Karena itu suatu upaya yang dianggap tepat untuk menekan angka kematian ikan di panti benih adalah dengan cara meningkatkan ketahanan ikan tersebut baik terhadap stres maupun terhadap penyakit.

Kasus kematian massal pada kerapu lumpur yang disebabkan oleh penyakit virus pernah terjadi di Sumatera Utara (Rukyani *et al.*, 1993; Owen, 1993; Koesharyani *et al.*, 2001) dan di Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol-Bali (Mahardika *et al.*, 2001) dikenal sebagai penyakit *Sleepy Grouper Disease* yang disebabkan oleh iridovirus dari famili Iridoviridae. Ikan yang terinfeksi menunjukkan gejala klinis berenang lemah atau diam di dasar bak. Setelah dilakukan pembedahan terlihat limpa membesar dua sampai tiga kali ukuran normal (Splenomegaly), insang pucat, pembesaran pada ginjal depan, dan hati berwarna pucat atau membesar (Chua *et al.*, 1994; Danayadol *et al.*, 1997; Inouye *et al.*, 1992; Chou *et al.*, 1998). Secara histopatologi ditemukan sel-sel yang membesar yang merupakan ciri khas dari infeksi iridovirus pada jaringan haematopoietik dan saluran pencernaan (Danayadol *et al.*, 1997; Mahardika *et al.*, 2001). Selain itu, keberadaan virus ini di dalam tubuh ikan dapat dideteksi dengan *polymerase chain reaction* (PCR) (Kurita *et al.*, 1998; Koesharyani *et al.*, 2001).

Iridovirus selain dapat menginfeksi dan menimbulkan kematian massal pada kerapu lumpur, juga dilaporkan telah menginfeksi dan menimbulkan kematian massal pada *red sea bream*, *Pagrus major* di Jepang (Inouye *et al.*, 1992; Nakajima & Sorimachi, 1994; Nakajima *et al.*, 1995), kerapu malabar, *Epinephelus malabaricus* di Thailand (Danayadol *et al.*, 1997; Kasornchandra & Khongpradit, 1997), kerapu, *Epinephelus* sp. di Taiwan (Chou *et al.*, 1998), brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina* di Singapura (Chua *et al.*, 1994).

Salah satu upaya untuk meningkatkan ketahanan tubuh ikan adalah dengan penggunaan imunostimulan. Imunostimulan merupakan sekelompok senyawa biologi sintesis yang dapat meningkatkan respon imun non spesifik. Imunostimulan yang dikenal antara lain α -glukan, peptidoglikan, lipopolisakarida, bakterin, dan sebagainya. Aplikasi imunostimulan sudah banyak diterapkan pada beberapa jenis ikan baik melalui pakan, perendaman maupun melalui suntikan (Espelid *et al.*, 1991; Chen & Ainsworth, 1992; Raa *et al.*, 1992; Matsuo & Miyazono, 1993; Stoskopf, 1993; Dalmo & Seljelid, 1995; Dalmo *et al.*, 1996; Dalmo *et al.*, 1998; Wong & Leong, 1995; Noga, 1996; Secombes, 1996; Yano, 1996; Elder *et al.*, 1997; Rukyani *et al.*, 1997; Santarem *et al.*, 1997; Vadstein, 1997; Figueras *et al.*, 1998; Koesharyani *et al.*, 1999; Tizard, 1998; Thompson *et al.*, 1999; Zafran *et al.*, 1998; Johnny *et al.*, 2001; Johnny & Roza, 2002).

Percobaan penggunaan imunostimulan pada ikan kerapu bebek telah dilakukan di Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut (BBRPBL), Gondol, di antaranya penggunaan imunostimulan peptidoglikan

dengan dosis 1% dalam pakan segar ikan lemuru yang dicacah halus dan ditambahkan vitamin campuran memberikan sintasan sebesar 72% dibanding kontrol sebesar 60% (Zafran *et al.*, 1999) dan penyuntikan imunostimulan peptidoglikan dengan dosis 5 mg/kg meningkatkan aktivitas lisosim (LA) sebesar 2,2 cm dibanding kontrol sebesar 1,8 cm (Koesharyani *et al.*, 1999). Pemberian imunostimulan peptidoglikan dalam pakan pelet dengan konsentrasi 0,2 g/kg pakan pada ikan kerapu bebek dapat meningkatkan aktivitas fagositik (PA) sampai 8,8% dibanding kontrol 2,8%, indeks fagositik (PI) sebesar 2,2 dibanding kontrol 1,66 dan LA sebesar 1,92 cm dibanding kontrol 1,72 cm (Johnny *et al.*, 2001). Pada ikan kerapu macan, penyuntikan peptidoglikan secara intraperitoneal dengan dosis 50 mg diperoleh nilai PA sebesar 11,70% dan kontrol 6,70%; PI sebesar 2,06 dan kontrol 1,19; dan pada perlakuan sebesar 100 mg nilai LA sebesar 1,81 cm dan kontrol 1,46 cm (Johnny & Roza, 2002).

Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan respon imun non spesifik benih ikan kerapu lumpur dengan pemberian imunostimulan bakterin terhadap infeksi virus irido.

BAHAN DAN METODE

Benih Uji

Benih ikan kerapu lumpur yang digunakan adalah benih hasil budi daya dari panti benih sekitar BBRPBL, Gondol, dan sebelum digunakan diaklimatisasi selama dua minggu. Benih dengan bobot antara 36—82 g disuntik secara intraperitoneal dengan bakterin pada kepadatan 10^7 cfu/mL dengan dosis 0,1 mL/ekor (A). Sebagai kontrol adalah benih yang hanya disuntik dengan larutan garam fisiologis (C). Setelah 14 hari dilakukan penyuntikan ulang bakterin sebagai booster (B). Benih dipelihara dalam bak fiber volume 1 ton dengan kepadatan 50 ekor/bak, menggunakan sistem air mengalir dan aerasi. Pemberian pakan dilakukan pada pagi dan sore hari berupa pakan pelet dengan kisaran 3%—5% dari total bobot. Bak pemeliharaan dibersihkan dari kotoran dan sisa pakan pada dasar bak satu kali pada pagi hari.

Imunostimulan

Imunostimulan yang digunakan adalah bakterin dari *Vibrio harveyi*. Bakterin dibuat dengan cara mematikan *Vibrio harveyi* dengan formalin 0,5% selama 1 hari dan dicuci sebanyak tiga kali dengan 0,85% NaCl setelah disentrifugasi dengan kecepatan 3.600 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Kepadatan sel bakteri diatur 10^7 cfu/mL. Sebelum bakterin digunakan dilakukan uji viabilitas dengan cara

pada media TSA selama 48 jam. Apabila terjadi pertumbuhan, inaktivasi diulang kembali. Sebelum digunakan bakterin tersebut disimpan dalam almari pendingin. Perlakuan imunostimulan bakterin pada larva baru menetas yaitu dengan cara perendaman selama 3 jam pada konsentrasi 10^7 cfu/mL. Setelah 14 hari pemeliharaan dilakukan penambahan ulang bakterin ke dalam bak pemeliharaan larva sebagai booster.

Uji Tantang

Percobaan pendahuluan dilakukan terlebih dahulu untuk mengetahui LD₅₀ iridovirus terhadap benih ikan kerapu lumpur. Uji penetapan dosis LD₅₀ dilakukan untuk memperoleh dosis inokulum iridovirus untuk ujiantang. Dosis yang diuji adalah untuk memperoleh dosis yang menimbulkan kematian sampai 80% dari ikan uji. Masing-masing ikan uji yang digunakan sebanyak 10 ekor per perlakuan, inokulum iridovirus diinjeksikan secara intraperitoneal dengan dosis 0,1 mL/ekor. Pengamatan dilakukan selama 7 hari, dan dipilih dosis mana yang menimbulkan kematian sampai 80% untuk dosis ujiantang. Inokulum berasal dari benih kerapu lumpur yang terserang iridovirus (deteksi dengan PCR dan positif iridovirus), limpa dan ginjalnya diambil, kemudian digerus dan ditambahkan 10 mL *phosphate buffered saline* (pbs, pH 7,2) dengan perbandingan 1:9, selanjutnya disentrifugasi 3.000 rpm selama 30 menit, supernatannya disaring dengan membran filter (0,45 mm) dan disimpan pada suhu -85°C sampai digunakan (Arimoto *et al.*, 1993). Ujiantang dilakukan pada 10, 20, dan 30 hari setelah perlakuan dengan iridovirus melalui penyuntikan secara intraperitoneal. Pengamatan dilakukan terhadap sintasan, gejala klinis, dan keragaan respon imun non spesifik benih setiap hari selama 10 hari pengamatan.

Koleksi Leukosit dan Pemisahan Plasma

Darah ikan uji diambil dari vena jugularis setelah terlebih dahulu ikan uji dipingsankan dengan menggunakan bahan pembius *FA-100* produksi Tanabe Seiyaku, Jepang dengan dosis 1 cc/5 L. Setelah ikan uji pingsan, sampel darah disedot dengan spuit plastik steril volume 2,5 cc dengan jarum No. 18 yang di dalamnya telah berisikan antikoagulan *Heparin* produksi Sigma. Selanjutnya disimpan dalam tabung evendoff.

Darah pada tabung evendoff disedot dengan tabung kapiler plastik, ditutup dengan lilin lebah dan disentrifusa pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Selanjutnya tabung kapiler dipotong dengan gunting pada batas leukosit dengan eritrosit, leukosit dikoleksi, dan disimpan pada tabung evendoff baru,

kemudian leukosit ini siap digunakan untuk uji fagositosis (PA).

Sisa koleksi darah pada tabung evendoff disentrifusa dengan minisentrifusa pada kecepatan 6.000 rpm selama 5 menit, setelah disentrifusa dipisahkan plasma darah ke tabung evendoff baru dengan mikropipet, kemudian plasma ini siap digunakan untuk uji aktivitas lisosim (LA). Metode yang digunakan adalah modifikasi dari metode Rowley (1993) dan Klontz (1994).

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 mL yang telah dilarutkan dengan larutan PBS, dimasukkan ke dalam tabung evendoff. Selanjutnya diambil leukosit yang telah disiapkan sebanyak 50 mL dan dicampurkan dengan *Zymosan A*, diaduk rata dengan mikro pipet, disimpan pada suhu 25°C selama 1 jam. Kemudian ditetaskan pada kaca slide, dibuatkan preparat ulas tipis, dilakukan pewarnaan darah dengan *May-Gruenwald's Solution Modified* dan *Giemsa Solution 3%*, kemudian dihitung aktivitas fagositik (PA) dan indeks fagositik (PI) dilakukan berdasarkan rumus yang disajikan di bawah ini.

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

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

Uji Aktivitas Lisosim (LA)

Sebelumnya disiapkan media agar yang mengandung *Micrococcus lysodeikticus* (produksi Sigma) pada cawan petri. Cawan petri yang berisikan media agar, dibuatkan lobang agar dengan menggunakan *straw*, masukkan sebanyak 10 mL 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 zona aktivitas lisosim (LA), pengamatan dilakukan selama 3 hari. Nilai LA dihitung dengan berdasarkan rumus disajikan di bawah ini:

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

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

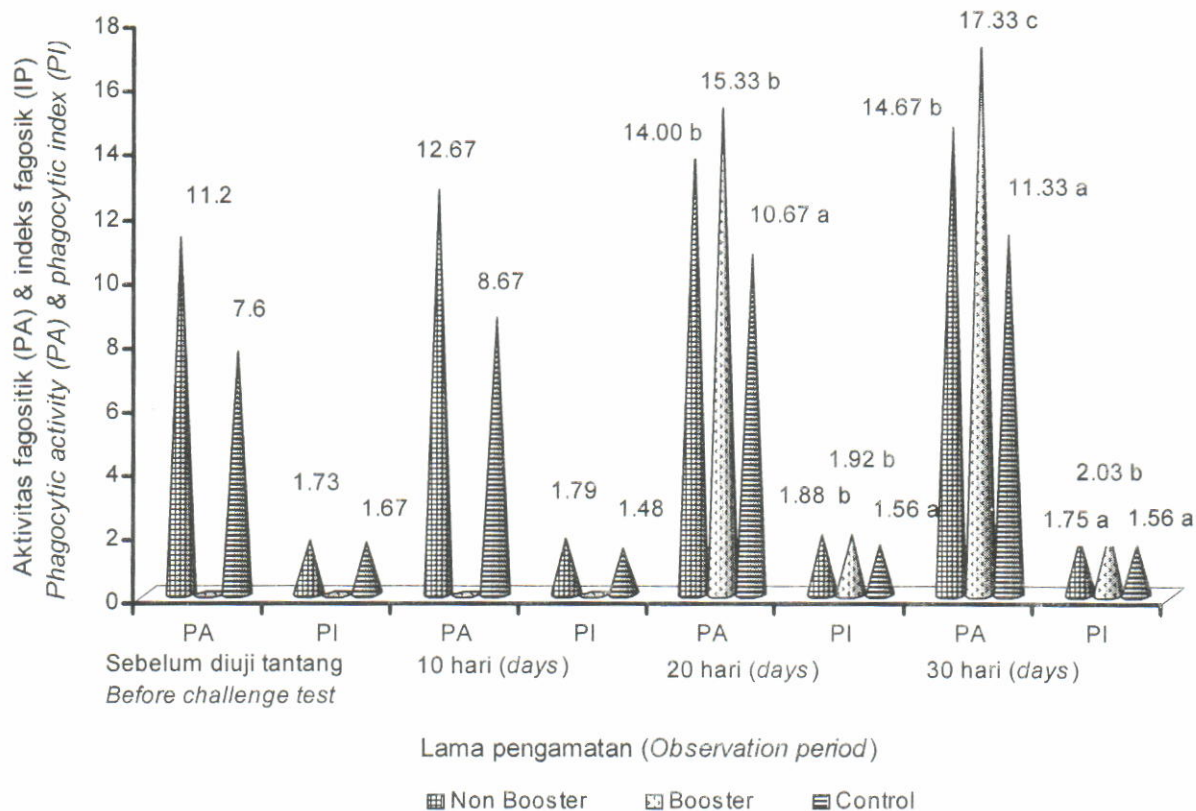
HASIL DAN BAHASAN

Hasil keragaan aktivitas fagositik (PA) dan indeks fagositik (IP) dari benih ikan kerapu lumpur dengan perlakuan imunostimulan bakterin, terlihat bahwa besarnya nilai PA semakin meningkat setelah perlakuan bakterin (Gambar 1). Pada perlakuan bakterin sebelum diuji tantang dengan inokulum virus irido, pada perlakuan imunostimulan memberikan hasil PA yang lebih tinggi (11,20%) dibanding kontrol sebesar 7,60%, demikian juga dengan nilai PI untuk perlakuan bakterin (1,73) lebih tinggi dibanding kontrol (1,67). Setelah 10 hari perlakuan nilai PA sebesar 12,67% (A) pada perlakuan bakterin dan sebesar 8,67% untuk kontrol (C), sedangkan PI sebesar 1,79 pada perlakuan bakterin (A) dan sebesar 1,48 pada kontrol (C).

Pada hari ke-14 dilakukan booster dengan bakterin, sehingga selanjutnya terdapat tiga perlakuan, yaitu perlakuan bakterin non booster, perlakuan bakterin dengan booster, dan tanpa perlakuan bakterin sebagai kontrol.

Setelah 20 hari perlakuan pada benih ikan kerapu lumpur, perlakuan bakterin dengan booster memberikan nilai PA tertinggi sebesar 15,33% (B), disusul perlakuan bakterin non booster sebesar 14,00% (A) dan kontrol sebesar 10,67% (C). Sedangkan untuk nilai PI, nilai tertinggi juga pada perlakuan bakterin dengan booster sebesar 1,92 (B) dan perlakuan bakterin non booster sebesar 1,88 (A). Sedangkan pada kontrol nilai PI diperoleh sebesar 1,56 (C).

Pada hari ke-30 nilai PA tertinggi diperoleh pada perlakuan bakterin dengan booster sebesar 17,33% (B); perlakuan bakterin non booster sebesar 14,67% (A); dan pada kontrol sebesar 10,67% (C). Nilai PI berturut-turut adalah pada perlakuan bakterin dengan booster



- Setiap nilai yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak beda nyata ($P>0,05$)
- Values in column followed by the same superscripts are not significantly different ($P>0,05$)

Gambar 1. Keragaan aktivitas fagositik (PA) dan indeks fagositik (IP) benih ikan kerapu lumpur, *Epinephelus coioides* dengan perlakuan imunostimulan bakterin sebelum dan sesudah diuji tantang dengan inokulum virus irido setelah 10, 20, dan 30 hari perlakuan

Figure 1. Values of phagocytic activity (PA) and phagocytic index (PI) on orange spotted grouper juvenile, *Epinephelus coioides* treated with immunostimulant bacterine before and after challenge test with iridovirus on 10, 20, and 30 days after treatment.

sebesar 2,03 (B); pada perlakuan bakterin non boster sebesar 1,75 (A); dan pada kontrol sebesar 1,56 (C). Percobaan ini, menunjukkan bahwa pemberian imunostimulan bisa merangsang aktivitas fagositosis lebih tinggi lagi, demikian juga dengan indeks fagositiknya. Namun pemberian boster disini kurang mempunyai arti yang signifikan.

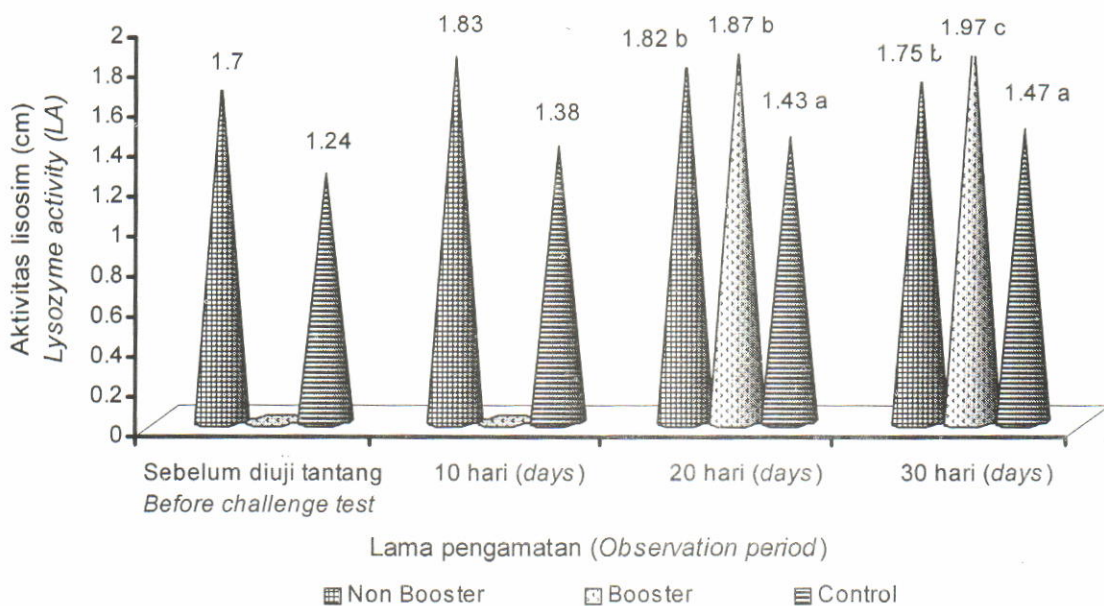
Aktivitas fagositik adalah suatu kemampuan dari sel respon imun nonspesifik untuk fagositosis agen penyakit yang masuk ke tubuh. Peningkatan aktivitas fagositik ini dapat ditingkatkan antara lain dengan imunostimulan. Dari percobaan ini, terlihat PA sebelum diuji tantang semakin meningkat dengan pemberian boster. Pada hari ke-20 setelah boster, nilai PA pada perlakuan bakterin boster dan non boster tidak berbeda, tetapi berbeda nyata dengan kontrol ($P < 0,05$). Nampaknya, 4 hari setelah boster imunostimulan belum secara maksimal meningkatkan aktivitas fagositik. Pada hari ke-30 setelah perlakuan, terlihat nilai PA antar perlakuan berbeda, dan secara statistik berbeda nyata ($P < 0,05$). Dari percobaan ini terlihat bahwa imunostimulan dapat meningkatkan aktivitas fagositik dan indeks fagositik.

Pada percobaan sebelumnya juga telah dilaporkan bahwa pemberian imunostimulan peptidoglikan dalam pakan pelet dengan konsentrasi 0,2 g/kg pakan pada

ikan kerapu bebek dapat meningkatkan PA sampai 8,8% dibanding kontrol 2,8%, PI sebesar 2,2 dibanding kontrol 1,66 dan LA sebesar 1,92 cm dibanding kontrol 1,72 cm (Johnny *et al.*, 2001). Pada ikan kerapu macan, penyuntikan peptidoglikan secara intraperitoneal dengan dosis 50 mg diperoleh nilai PA sebesar 11,70% dan kontrol 6,70%; PI sebesar 2,06 dan kontrol 1,19; dan pada perlakuan sebesar 100 mg nilai LA sebesar 1,81 cm dan kontrol 1,46 cm (Johnny & Roza, 2002).

Dari Gambar 2 terlihat bahwa besarnya nilai LA semakin meningkat setelah perlakuan bakterin. Sebelum diuji tantang dengan inokulum virus irido, perlakuan bakterin memberikan hasil LA yang lebih tinggi (1,70 cm) dibanding kontrol sebesar 1,24 cm, setelah 10 hari perlakuan nilai LA sebesar 1,83 cm (A) pada perlakuan bakterin dan sebesar 1,38 cm untuk kontrol (C).

Setelah 20 hari perlakuan bakterin dengan boster memberikan nilai LA tertinggi sebesar 1,87 cm (B), disusul perlakuan bakterin non boster sebesar 1,82 cm (A), dan kontrol sebesar 1,43 cm (C). Pada hari ke-30 nilai LA tertinggi diperoleh pada perlakuan bakterin dengan boster sebesar 1,97 cm (B), perlakuan bakterin non-boster sebesar 1,75 cm (A), dan pada kontrol sebesar 1,47 cm (C).



- Setiap nilai yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak beda nyata ($P > 0,05$)
- Values in column followed by the same superscripts are not significantly different ($P > 0,05$)

Gambar 2. Keragaan aktivitas lisosim (LA) dari benih ikan kerapu lumpur, *Epinephelus coioides* dengan perlakuan imunostimulan bakterin sebelum dan sesudah diuji tantang dengan inokulum virus irido setelah 10, 20, dan 30 hari perlakuan

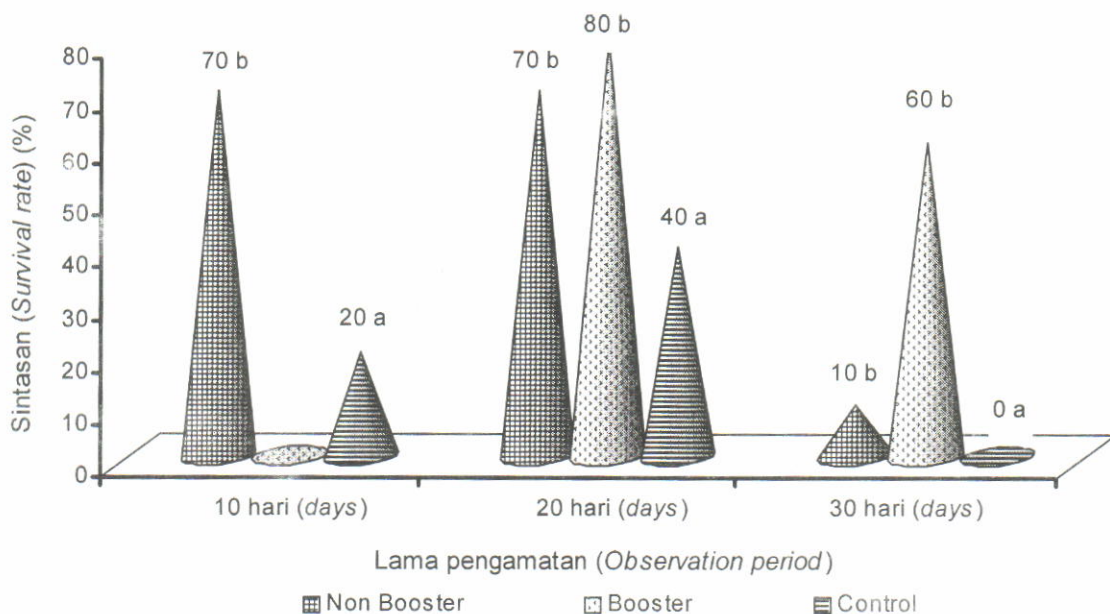
Figure 2. Values of lysozyme activity (LA) on orangespotted grouper juvenile, *Epinephelus coioides* treated with immunostimulant bacterine before and after challenge test with iridovirus on 10, 20, and 30 days after treatment

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). Peningkatan aktivitas lisosim ini dapat dipacu antara lain dengan pemberian imunostimulan, terlihat dari LA sebelum diuji tantang semakin meningkat dengan pemberian boster. Pada hari ke-30 setelah perlakuan, nilai LA antar perlakuan berbeda nyata ($P < 0,05$). Hal ini mengindikasikan bahwa imunostimulan dapat meningkatkan aktivitas lisosim, penyuntikan imunostimulan dengan dosis 5 mg/kg meningkatkan LA sebesar 2,2 cm dibanding kontrol sebesar 1,8 cm (Koesharyani *et al.*, 1999).

Upaya peningkatan kekebalan pada ikan budi daya laut sudah banyak dilaporkan. Matsumaya *et al.* (1992) melaporkan bahwa penyuntikan imunostimulan Schizophyllan derivat dari *Schizophyllum commune* dan b-glucan derivat dari *Sclerotium glucanicum* 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 b-1,3/1,6-glucans dapat meningkatkan daya tahan ikan terhadap infeksi mikroba (Raa *et al.*, 1992). Penyuntikan yeast glucan pada ikan *Atlantic*

salmon, *Salmo salar* L. dapat meningkatkan daya tahan ikan terhadap infeksi bakteri patogen. Pemberian peptidoglikan derivat *bifidobacterium thermophilum* dengan dosis 60 mg PG/kg bobot badan per hari, dapat meningkatkan daya tahan ikan rainbow trout terhadap infeksi bakteri *Vibrio anguillarum* (Matsuo & Miyazono, 1993). Selanjutnya pemberian LPS, laminaran dan *sulphated* laminaran {b(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 b-glucan (Santarem *et al.*, 1997). Pada ikan *Atlantic cod*, *Gadus morhua* L., penyuntikan imunostimulan b(1,3)-D-glucan (laminaran) dapat meningkatkan kekebalan ikan tersebut terhadap infeksi bakteri *Aeromonas salmonicida* dan *Vibrio salmonicida* (Dalmo *et al.*, 1998). Penyuntikan M-glukan secara *intraperitoneal* dengan dosis 640 mg/mL pada ikan *yellowtail*, *Seriola quinqueradiata* dapat meningkatkan daya tahan ikan terhadap infeksi bakteri *Vibrio anguillarum* (Kawakami *et al.*, 1998). Pada ikan *turbot*, *Scophthalmus maximus* L. b-glucan dapat meningkatkan kekebalan (Figueras *et al.*, 1998).

Hasil sintasan benih ikan kerapu lumpur dengan perlakuan imunostimulan bakterin setelah diuji tantang dengan inokulum virus irido setelah perlakuan pada hari ke-10, 20, dan 30 dengan pengamatan selama 10 hari disajikan secara lengkap pada Gambar 3.



Gambar 3. Sintasan (%) benih ikan kerapu lumpur, *Epinephelus coioides* dengan perlakuan imunostimulan bakterin setelah diuji tantang dengan inokulum virus irido pada hari ke-10, 20, dan 30 setelah perlakuan selama 10 hari pengamatan

Figure 3. Survival rate (%) of orangespotted grouper, *Epinephelus coioides* larvae treated with immunostimulant bacterine after challenge test with iridovirus on D-10, D-20, and D-30 after treatment during 10 days observation

Sintasan pada hari ke-10 setelah perlakuan dengan bakterin memberikan hasil lebih tinggi (70%) dibanding kontrol sebesar 20%. Sintasan benih ikan kerapu lumpur pada hari ke-20 setelah perlakuan bakterin boster memberikan hasil lebih tinggi (80%) dari perlakuan non-boster (70%) dan kontrol (40%). Pada hari ke-30 setelah perlakuan, sintasan tertinggi terlihat pada perlakuan bakterin boster sebesar 60%, diikuti perlakuan non-boster sebesar 10%, dan pada kontrol terjadi kematian total atau sintasan sebesar 0%. Dari percobaan ini terlihat bahwa perlakuan bakterin dapat menekan mortalitas atau meningkatkan sintasan benih ikan kerapu lumpur. Selain itu, bakterin dapat meningkatkan respon imun non spesifik benih ikan kerapu lumpur terhadap infeksi virus irido.

KESIMPULAN

1. Immunostimulan bakterin mampu memacu timbulnya kekebalan non spesifik pada benih ikan kerapu lumpur dilambangkan dengan meningkatnya aktivitas fagositik (PA), indeks fagositik (PI), dan aktivitas lisosim (LA).
2. Dosis efektif immunostimulan bakterin adalah 0,1 mL melalui injeksi secara intraperitoneal dengan kepadatan 10^7 cfu/mL.
3. Perlakuan immunostimulan bakterin dapat meningkatkan sintasan dan menekan mortalitas, serta meningkatkan kekebalan non spesifik benih ikan kerapu lumpur terhadap infeksi virus irido.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kepada Saudara Putu Suarjana, Sri Suratmi, dan Slamet Haryanto selaku teknisi Laboratorium Patologi yang telah banyak membantu penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Animoto, 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.
- Chen, D. and A.J. Ainsworth. 1992. Glucan administration potentiates immune defense mechanism of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *J. of Fish Diseases*, 15: 295—304.
- Chua, F.H.C., M.L. Ng, K.L. Ng, I.J. Loo, and J.Y. Wee. 1994. Investigation of outbreaks of a novel disease, 'Sleepy Grouper Disease', affecting the brown-spotted grouper, *Epinephelus tufina* Forskal. *J. Fish Disease*, 17: 417—427.
- Chou, H.Y., C.C. Hsu, and T.Y. Peng. 1998. Isolation characterization of a pathogenic iridovirus from cultured grouper (*Epinephelus* sp.) in Taiwan. *Fish Pathol.*, 33: 201—206.
- Dalmo, R.A. and R. Seljelid. 1995. The immunomodulatory effect of LPS, laminaran and sulphated laminaran {b(1,3)-D-glucan} on Atlantic salmon, *Salmo salar* L., macrophages *in vitro*. *J. Fish Diseases*, 18: 175—185.
- Dalmo, R.A., K. Ingebrigtsen, B. Sveinbjornsson, and R. Seljelid. 1996. Accumulation of immunomodulatory laminaran b(1,3)-D-glucan in the heart, spleen and kidney of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *J. Fish Disease*, 19: 129—136.
- Dalmo, R.A., B. Martinsen, T.E. Horsberg, A. Ramstad, C. Syvertsen, R. Seljelid, and K. Ingebrigtsen. 1998. Prophylactic effect of b(1,3)-D-glucan (laminaran) against experimental *Aeromonas salmonicida* and *Vibrio salmonicida* infection. *J. Fish Disease*, 21: 459—462.
- Danayadol, Y., S. Direkbusarakom, S. Boonyaratpalin, T. Miyazaki, and M. Miyata. 1997. Iridovirus infection in brown-spotted grouper (*Epinephelus malabaricus*) cultured in Thailand. In T. W. Flegel and I. H. MacRae (Eds.), *Diseases in Asian Aquaculture III*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, p. 67—72.
- Espelid, S., O.M. Rodseth, and T.O. Jorgensen. 1991. Vaccination experiments and studies of the humoral immune responses in cod, *Gadus morhua* L., to four strains of monoclonal-defined *Vibrio anguillarum*. *J. Fish Diseases*, 14: 185—197.
- 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 Stolen et al. (Eds.), *Techniques in Fish Immunology-1*. Sos Publications, Fair Haven, NJ 07704-3303. USA, p. 101—103.
- Figueras, A., M.M. Santarem, and B. Novoa. 1998. Influence of the sequence of administration of b-glucans and *Vibrio damsela* vaccine on the immune response of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 64: 59—68.
- Inouye, K., K. Yamano, Y. Maeno, K. Nakajima, M. Matsuoka, Y. Wada, and M. Sorimachi. 1992. Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.*, (27): 19—27. (In Japanese with English summary).
- Johnny, F., I. Koesharyani, D. Roza, Tridjoko, N.A. Giri, dan K. Suwiry. 2001. Respon ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* terhadap imunostimulan peptidoglycan melalui pakan pelet. *J. Pen. Per. Indonesia*, 7(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 pp.
- Kasornchandra, J. and R. Khongpradit. 1997. Isolation and preliminary characterization of a pathogenic iridovirus in nursing grouper, *Epinephelus*

- malabaricus**. *Diseases in Asia Aquaculture III*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, p. 61—66.
- 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. 1994. Fish Hematology. In Stolen et al. (Eds.). *Techniques in Fish Immunology-3*. Sos Publications, Fair Haven, NJ 07704-3303. USA, p. 121—131.
- Koesharyani, I., Zafran, F. Johnny, dan Tridjoko. 1999. Respon ikan kerapu bebek, *Chromileptes altivelis*, terhadap imunostimulan peptidoglycan melalui suntikan. Loka Penelitian Perikanan Pantai, Gondol-Bali. *Laporan Penelitian*, 5 pp.
- Koesharyani, I., K. Mahardika, K. Sugama, and K. Yuasa. 2001. Iridovirus penyebab kematian pada budidaya ikan kerapu lumpur, *Epinephelus coioides*. Deteksi menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR). *Teknologi Budi Daya Laut dan Pengembangan Sea Farming di Indonesia*. DKP bekerja sama dengan JICA, p. 228—234.
- Kurita, J., K. Nakajima, I. Hirono, and T. Aoki. 1998. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA of red sea bream iridovirus (RSIV). *Fish Pathol.*, 33: 17—23.
- Mahardika, K., I. Koesharyani, K. Sugama, A. Priyono, and K. Yuasa. 2001. Studi histopatologi iridovirus pada *Epinephelus coioides* dan *Epinephelus bleekeri*. *Teknologi Budi Daya Laut dan Pengembangan Sea Farming di Indonesia*. DKP bekerja sama dengan JICA, p. 334—341.
- 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): 1,377—1,379.
- 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.
- Nakajima, K. and M. Sorimachi. 1994. Biological and physico-chemical properties of the iridovirus isolated from cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.*, 29: 29—33.
- Nakajima, K., Y. Maeno, M. Fukudome, Y. Fukuda, S. Tanaka, S. Matsuoka, and M. Sorimachi. 1995. Immunofluorescence test for the rapid diagnosis of red sea bream iridovirus infection using monoclonal antibody. *Fish Pathol.*, 30: 115—119.
- Noga, E.J. 1996. *Fish Disease. Diagnosis and Treatment*. Mosby-Year Book. Inc. St. Louis. Missouri, 299 pp.
- Owen, L. 1993. *Report On Sleepy Grouper Disease*. Dept. Of Biomedical and Tropical Veterinary Science, James Cook Univ. of North Queensland Townsville, Australia, 4,811 pp.
- 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 & J.R. Arthur* (Eds.). Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, p. 39—50.
- Rowley, A.F. 1993. Collection, Separation and Identification of Fish Leucocytes. In Stolen et al. (Eds.). *Techniques in Fish Immunology-1*. Sos Publications, Fair Haven, NJ 07704-3303. USA, p. 114—136.
- Rukyani, A., P. Taufik, and A. Yuliansyah. 1993. *Laporan Survei Kasus Kematian Ikan Kerapu (Grouper) di Daerah Sumatera Utara*, 9 pp.
- Rukyani, A., E. Silvia, A. Sunarto, dan Tauhid. 1997. Peningkatan respon kebal non spesifik pada ikan lele dumbo (*Clarias* sp.) dengan pemberian imunostimulan (b-glucan). *J. Pen. Per. Indonesia*, 2(1): 1—10.
- Santarem, M., B. Novoa, and A. Figueras. 1997. Effect of b-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; Cellulae Defences. In *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment*. G. Iwama and T. Nakanishi (Eds.), Academic Press. USA. 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 pp.
- Stoskopf, M.K. 1993. *Fish Medicine*. W.B. Saunders Company. Philadelphia. Pennsylvania. 664 pp.
- 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 & Shellfish Immunology*, 9: 195—210.
- Tizard, I. 1988. An introduction to veterinary immunology. Penerjemah P. Masduki dan S. Hardjosworo. *Pengantar Immunologi Veteriner*. Universitas Airlangga. Surabaya, 497 pp.
- Vadstein, O. 1997. The use of immunostimulatin in marine larviculture: possibilities and challenges. *Aquaculture*, 155: 401—417.
- Wong, S.Y., T.Y. Lee, and T.S. Leong. 1995. Cross protection of vibrio vaccines against various pathogenic vibrio obtained from diseased grouper (*Epinephelus salmoides*). In *Diseases in Asian Aquaculture II*. M. Syariff, J.R. Arthur & R.P. Subasinghe (Eds.), Fish Health Section. Asian Fisheries Society. Manila. Philippines, p. 683—687.
- Yano, T. 1996. The Nonspecific Immune System; Humoral Defense. In *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment*. G. Iwama and T. Nakanishi (Eds.). Academic Press. USA, p. 106—140.
- 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. (Eds.). Sudrajat et al. (1998). *Seminar Teknologi Perikanan Pantai, Denpasar 6—7 Agustus 1998*, Puslitbang Perikanan bekerja sama dengan JICA, p. 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 pp.

