

**PENINGKATAN IMUNITAS YUWANA IKAN KERAPU BEBEK,  
*Cromileptes altivelis* TERHADAP INFEKSI  
VIRAL NERVOUS NECROSIS (VNN) DENGAN CARA VAKSINASI  
MELALUI PERENDAMAN**

Des Roza, Fris Johnny, dan Tridjoko

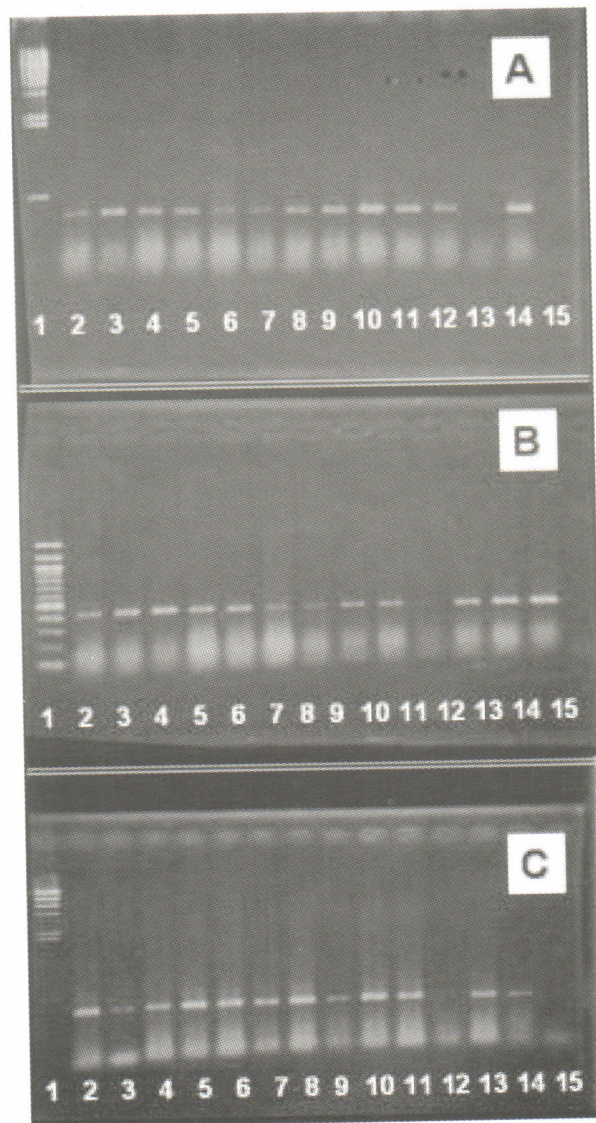
**ABSTRAK**

Penelitian dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh perbedaan dosis vaksin dan lama perendaman terhadap ketahanan yuwana kerapu bebek terhadap infeksi VNN, telah dilakukan di Laboratorium Patologi Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol. Penelitian dilakukan dua tahap, tahap pertama percobaan dosis vaksin efektif dan tahap kedua terhadap lama perendaman dalam vaksin. Percobaan ini dilaksanakan secara RAL dengan 3 ulangan. Percobaan tahap I, terhadap 360 ekor yuwana kerapu bebek ukuran 2—3 cm diberi perlakuan perendaman dengan vaksin inaktif selama 1 jam dengan dosis berbeda yaitu; A (15 mL/L), B (10 mL/L), C (5 mL/L), dan D(0 mL/L/Kontrol). Setelah 10, 25, dan 40 hari pasca vaksinasi masing-masing 10 ekor yuwana diuji tantang dengan VNN selama 6 jam perendaman. Kemudian ikan dipelihara selama 2 minggu, dan diamati timbulnya gejala klinis dan mortalitas. Pada percobaan tahap II, dengan jumlah ikan yang sama diberi perlakuan vaksin inaktif dengan dosis 15 mL/L dengan perlakuan lama perendaman A (1 jam), B (2 jam), C (3 jam), dan D (0 jam/kontrol). Setelah 10, 20, dan 30 hari pasca vaksinasi masing-masing 10 ekor ikan diuji tantang dengan VNN selama 6 jam. Selanjutnya pengamatan dilakukan seperti tahap I. Dari percobaan tahap I, hasil uji tantang dengan VNN memperlihatkan perlakuan 15 mL/L memberikan hasil dengan sintasan sebesar 86,67% setelah 25 hari pasca vaksinasi. Hasil pada percobaan tahap II adalah; pada perlakuan perendaman selama 3 jam memberikan sintasan setelah uji tantang sebesar 86,67% setelah 20 hari pasca vaksinasi. Vaksinasi dengan VNN pada dosis 15 mL/L dengan lama perendaman 3 jam dapat meningkatkan imunitas yuwana ikan kerapu bebek terhadap infeksi VNN.

**ABSTRACT:** *Immunity stimulation of humpback grouper, *Cromileptes altivelis* juvenile against viral nervous necrosis (VNN) infection by immersion vaccination.*  
By: Des Roza, Fris Johnny, and Tridjoko

*Vaccination may one of effective prevention method, practical, and cheap. An experiment to evaluate the effectiveness of vaccine delivered by different dosages of vaccine and different duration of immersion periods was conducted at the Disease Laboratory of Research Institute for Mariculture, Gondol-Bali. Phase I; 360 fishes of humpback grouper juveniles (about 2—3 cm in total length) were bathed in VNN inactive vaccine for one hour at different dosages, namely 15 mL/L (A), 10 mL/L (B), 5 mL/L (C), and 0 mL/L (D) as a control. Phase II; fishes of humpback grouper juveniles were bathed in VNN inactive vaccine at different immersion periods, namely 1 hour (A), 2 hours (B), 3 hours (C), and 0 hour (D) as a control. Ten juveniles from each treatment were then subjected to challenge tests with VNN virus ( $LD_{50}$ ) phase I for 6 hours at 10, 25, and 40 post vaccination and phase II at 10, 20, and 30 days post vaccination. The experiment was arranged in completely randomized design with four treatments and three replicates. Clinical signs and survival of each groups were observed for two weeks. Phase I; result of challenge test showed that highest survival was gave by treatment as 15 mL/L (86.67%) 25 days post vaccination. Phase II; showed that treatment as 3 hours (86.67%) 20 days post vaccination. It was suggested that hump-back grouper juveniles gave positive response to vaccination and 15 mL/L is optimum dosage of vaccine at least for 25 days, and the optimum immersion period to enhance immunity of hump-back grouper juveniles against VNN is 3 hours.*

**KEYWORDS:** *immunity, humpback grouper juvenile, VNN, vaccination*

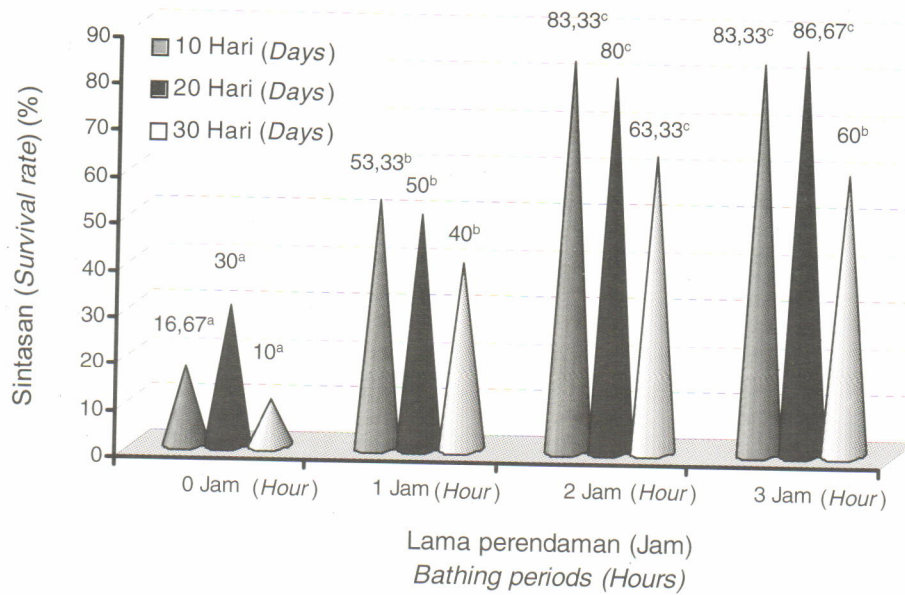


Gambar 2. Gel agarose elektroforesis RT-PCR hasil amplifikasi yuwana kerapu bebek yang mati pada perlakuan vaksin inaktif dan tanpa vaksin setelah uji tantang dengan VNN. A) Setelah 10 hari pasca vaksinasi, B) Setelah 20 hari pasca vaksinasi, dan C) Setelah 30 hari pasca vaksinasi. Baris 1. Marker (100 bp); 2—4. A (15 mL/L); 5—7. B (10 mL/L); 8—10. C (5 mL/L); 11—13. D (0 mL/L); 14. Positif kontrol; 15. Negatif kontrol

Figure 2. Agarose gel electrophoresis of PCR amplication products from humpback grouper juvenile died on inactive vaccine and non-vaccine after challenge test with VNN. 10 days post vaccination (A), 20 days post vaccination (B), and 30 days post vaccination (C). Row 1 as marker (100 bp), row 2—4 on dosage 15 mL/L, row 5—7 on dosage 10 mL/L, row 8—10 on dosage 5 mL/L, row 11—13 on dosage 0 mL/L (control), row 14 as positive control, and row 15 as negative control

Setelah divaksinasi dengan dosis sebesar 15 mL/L masing-masing dengan lama perendaman 1 jam (A), 2 jam (B), 3 jam (C), dan 0 jam (D) dilakukan uji tantang terhadap yuwana kerapu bebek tersebut pada 10, 20, dan 30 hari pasca vaksinasi. Perlakuan C memberikan hasil terbaik dalam meningkatkan ketahanan yuwana terhadap VNN (Gambar 3) dan

memberikan sintasan tertinggi setelah uji tantang yaitu 56,67%; 86,67%; dan 56,67% masing-masing pada 10, 20, dan 30 hari pasca vaksinasi. Kemudian diikuti B yaitu 50,00%; 76,67%; dan 53,33% dan A sebesar 50,00%; 66,67%; dan 50,00% sedangkan pada D (Kontrol) hanya 26,67%; 30,00%; dan 30,00%. Secara statistik antara perlakuan vaksin dengan lama



- Angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata secara statistik ( $P>0,05$ )
- Values on graph followed by the same superscript are not significantly different ( $P>0,05$ )

Gambar 3. Sintasan (%) yuwana kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* yang diuji tantang dengan VNN selama 2 minggu setelah 10, 20, dan 30 hari pasca vaksinasi dengan anti VNN dengan lama perendaman berbeda

Figure 3. Survival rate (%) of humpback grouper juvenile, *Cromileptes altivelis* after 2 weeks challenged with VNN on 10, 20, and 30 days post vaccination with different time of immersion

perendaman yang berbeda tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ), namun dengan kontrol memperlihatkan perbedaan yang nyata ( $P<0,05$ ).

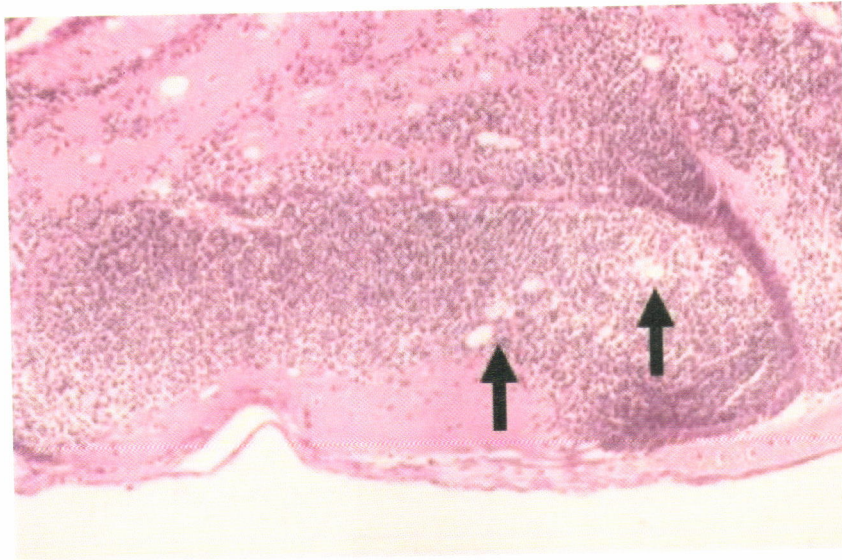
Dari pengamatan gejala klinis terhadap ikan uji memperlihatkan bahwa perlakuan D pada hari ke-3 setelah uji tantang mulai terlihat ikan diam di dasar, nafsu makan menurun, dan berenang abnormal dengan posisi terbalik. Mortalitas mulai terjadi secara massal hari berikutnya (ke-4) sampai akhir penelitian mencapai 70%—80%. Pada perlakuan A, B, dan C mulai menampilkan adanya gejala klinis pada hari ke-5 sedangkan mulai ada kematian pada hari ke-7 sampai hari ke-11. Setelah itu ikan uji yang divaksinasi dengan lama perendaman berbeda tersebut secara perlahan terlihat pulih kembali dan bertahan hidup sampai 2 minggu pengamatan. Padahal Nakai *et al.* (1995); Nakai (2000); Fukuda *et al.* (1996); Munday & Nakai (1997); Zafran *et al.* (1998;2000); Zafran & Yuasa (1999); Yuasa (2000) melaporkan bahwa VNN akan mengakibatkan kematian total dalam 3—7 hari. Berdasarkan hasil penelitian ini diketahui bahwa upaya vaksinasi dengan vaksin inaktif selama 3 jam perendaman dengan dosis 15 mL/L efektif untuk memacu ketahanan yuwana kerapu bebek terhadap VNN setelah 20 hari pasca vaksinasi. Rukyani *et al.* (1995) menyatakan bahwa efektivitas vaksin pada ikan akan terlihat optimal setelah 10 hari dan akan

mengalami penurunan setelah 25—30 hari. Berdasarkan hal ini vaksinasi lebih baik dilakukan secara periodik.

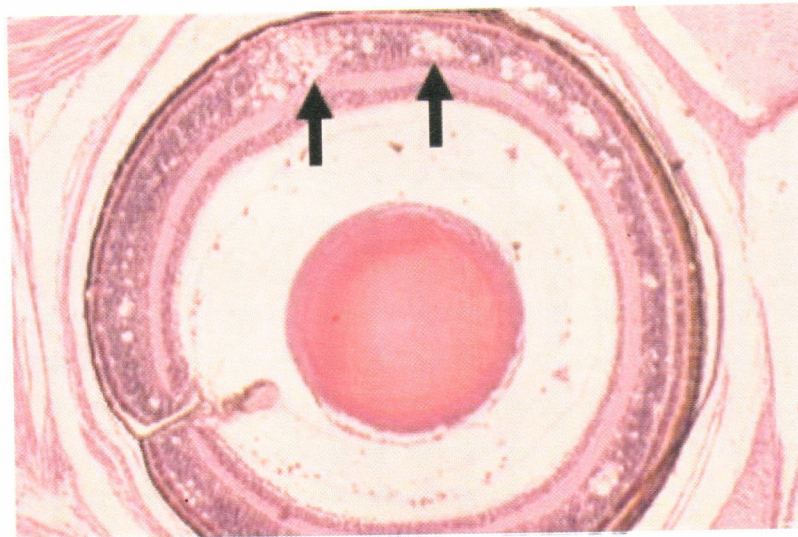
Pada prinsipnya vaksinasi dapat dilakukan secara oral melalui pakan, injeksi intraperitoneal atau intramuskular, pencelupan, dan perendaman (Ellis, 1988; Rukyani *et al.*, 1995; Nakai *et al.*, 1996; Fukuda *et al.*, 1996).

Secara histopatologi, jaringan organ otak ikan yang terinfeksi VNN terlihat adanya nekrosis dan vakuolasi, serta terjadi kelainan sel-sel saraf (Gambar 4). Hal serupa juga terjadi pada retina mata (Gambar 5).

Indikasi kerusakan jaringan organ otak dan retina mata pada ikan kerapu bebek ini ternyata sama dengan kerusakan yang terjadi pada kasus infeksi VNN pada ikan budi daya lainnya (Glazerbrook *et al.*, 1990; Bloch *et al.*, 1991; Munday *et al.*, 1992; Arimoto *et al.*, 1993; Chua *et al.*, 1995; Boonyaratpalin *et al.*, 1996; Munday & Owen, 1998; Zafran *et al.*, 1998; Zafran *et al.*, 2000). Piscine nodavirus sebagai penyebab VNN disebut juga encephalopathy dan retinopathy (Munday & Nakai, 1997). Jaringan syaraf merupakan jaringan target utama serangan VNN, seperti sel otak, tetapi jaringan lain juga dapat diserang. Vakuolasi terbanyak ditemukan pada bagian otak posterior. VNN selain banyak ditemukan pada



Gambar 4. Nekrosis dan vakuolasi pada sayatan histologi organ otak yang terinfeksi VNN  
Figure 4. Necrosis and vacuolation by histological examination on brain infection by VNN



Gambar 5. Nekrosis dan vakuolasi pada sayatan histologi organ mata yang terinfeksi VNN  
Figure 5. Necrosis and vacuolation by histological examination on retina infection by VNN

bagian otak dan retina mata, juga pernah ditemukan pada insang, otot, hati, kelenjar pilorik, lambung, usus, dan sel darah pada jantung (Chi *et al.*, 2001). Nguyen *et al.* (1996) melaporkan pula bahwa pada larva ikan *stripped jack* yang diserang VNN secara akut ditemukan sel hyperplasia pada epithelium kulit. Secara mikroskopis terlihat adanya lesi, nekrosis, dan vakuolasi pada jaringan pusat dan retina (Mori *et al.*, 1992). Sedangkan pengamatan pada sayatan histologi organ otak dengan mikroskop elektron yang dilakukan pada ikan kakap putih, *Lates calcarifer* yang terinfeksi VNN di Indonesia dapat dilihat adanya partikel virus yang berdiameter 30 nm (Zafran *et al.*, 1998).

## KESIMPULAN

Vaksinasi VNN dengan metode perendaman dapat meningkatkan ketahanan yuwana kerapu bebek terhadap infeksi VNN. Dosis vaksin 15 mL/L setelah 25 hari pasca vaksinasi memberikan respon positif dalam meningkatkan ketahanan yuwana terhadap infeksi VNN dengan sintasan sebesar 86,67%; diikuti dosis 10 mL/L sebesar 76,67%; dan dosis 5 mL/L sebesar 66,67%; sedangkan sintasan terendah pada kontrol sebesar 30%. Lama perendaman dalam vaksin selama 3 jam merupakan waktu efektif untuk meningkatkan ketahanan terhadap VNN setelah 20 hari pasca vaksinasi dengan sintasan sebesar

86,67%; diikuti perendaman 2 jam sebesar 80% dan perendaman 1 jam sebesar 50%, sedangkan sintasan terendah diperoleh pada kontrol sebesar 30%.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Saudara Putu Suarjana, Sri Suratmi, dan Slamet Haryanto selaku teknisi Laboratorium Patologi yang telah banyak membantu penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- 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.
- Bloch, B., K. Gravningen, and J.L. Larsen. 1991. Encephalomyelitis among turbot associated with apicornavirus-like agent. *Dis. of Aquatic Organism*, 10: 65—70.
- Bondad-Reantaso, M.G., S.E. McGladdery, I. East, and R.P. Subasinghe. 2001. Asia diagnostic guide to aquatic animal diseases. *FAO Fisheries Technical Paper*, 402(2): 72—75.
- Boonyaratpalin, S., K. Supamattaya, J. Kasornchandra, and H.R. Hoffman. 1996. Picorna-like virus associated with mortality and spongious encephalopathy in grouper *Epinephelus malabaricus*. *Dis. Of Aquatic Organism*, 26: 75—80.
- Chi, S.C., B.J. Lo, and S.C. Lin. 2001. Characterization of grouper nervous necrosis virus (GNNV). *Journal of Fish Diseases*, 24: 3—13.
- Chinabut, S., C. Limsuwan, and P. Kitsawat. 1991. Histology of the walking catfish, *Clarias batrachus*. *Asian Fish Health Network-IDRC*, 96 pp.
- Chua, F.H.C., J.J. Loo, and J.Y. Wee. 1995. Mass mortality in juvenile grasy grouper, *Epinephelus tauvina*, associated with vacuolating encephalopathy and retiopathy. *Dis. in Asian Aquaculture*, p. 235—241.
- Craig, H. 2002. Grouper hatchery health in the APEC region: Surveys of hatcheries and nurseries and regional experts and institutions involved in grouper health. *Diseases of Aquatic Vertebrates 5<sup>th</sup> Symposium on Diseases in Asian Aquaculture*. Symposium Abstracts, 93 pp.
- Danayadol, Y. 1999. Cultured grouper diseases in Thailand. *In Report of the APEC/NACA Cooperative Grouper Aquaculture Workshop 1*, p. 81—86.
- Ellis, A.E. 1988. *Fish Vaccination*. Academic Press Limited, London. p. 461—469.
- Fukuda, Y., H.D. Nguyen, M. Furuhashi, and T. Nakai. 1996. Mass mortality of cultured sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, associated with viral nervous necrosis. *Fish Pathol.*, 31(3): 165—170.
- Glazebrook, J.S., M.P. Heasman, and S.W. de Beer. 1990. Picorna-like viral particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *J. of Fish Diseases*, 13: 245—249.
- Heppel, J., N. Lorenzen, N.K. Armstrong, T. Wu, E. Lorenzen, K. Einer-Jensen, J. Schorr, and H.L. Davis. 1998. Development of DNA vaccines for fish: Vector design, intra-muscular injection and antigen expression using viral haemorrhagic septicaemia virus genes as a model. *Fish and Shellfish Immunology*, 8: 271—286.
- Iwamoto, T., K. Mori, M. Arimoto, and T. Nakai. 1999. High permissivity of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Dis. Aquat. Organism*, 39: 37—47.
- Kaattari, S.L. and J.D. Piganelli. 1996. The Specific Immune System: Humoral Defense. *In The Fish Immune System: Organism, Pathogen, and Environment*. G. Iwama and T. Nakanishi (eds.), Academic Press. USA, p. 207—254.
- 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 Diseminasi Teknologi Budidaya Laut dan Pantai*. Jakarta, p. 237—240.
- 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* (By: Sugama, K., K. Hatai, and T. Nakai). Gondol Research Institute of Mariculture, CRIFI and Japan International Cooperation Agency, 49 pp.
- Luria, S.E., J.E. Darnell-JR, D. Baltimore, and A. Campbell. 1984. *General Virology 3<sup>rd</sup> Edition*. John Wiley & Sons. New York-Toronto, 491 pp.
- Mori, K., T. Nakai, K. Muroga, M. Arimoto, K. Mushiake, and I. Furusawa. 1992. Properties new virus belonging to nadaviridae found in larval striped jack, *Pseudocaranx dentex* with nervous necrosis. *Virology*, 187: 368—371.
- Munday, B.L. and L. Owens. 1988. Viral disease of fish and shellfish in Australian mariculture. *Fish Pathology*, 33 (4): 193—200.
- Munday, B.L. and T. Nakai. 1997. Special topic review: Nodavirus as pathogen in larval and juvenile marine finfish. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 13: 375—381.
- Muroga, K. 1997. Recent advances in infectious diseases of marine fish with particular reference to the case in Japan *In Diseases in Aquaculture III* (Ed. by Flegel, T.W. and MacRae, I.H.). *Fish Health Section, Asian Fisheries Society*, Manila, p. 21-31.
- Murphy, F.A., C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, S.A. Ghabrial, A.W. Jarvis, G.P. Martelli, M.A. Mayo, and M.D. Summers. 1995. *Virus Taxonomy; Classification and Nomenclature of Viruses*. Springer-Verlag Wien New York, 585 pp.
- Mushiake, K., T. Nishizawa, I. Furusawa, and K. Muroga. 1994. Control of VNN in striped jack: Selection of spawners based on the detection of SJVNN gene by polymerase chain reaction (PCR). *Fish Pathology*, 29(3): 177—182.
- Nakai, T., K. Mori, T. Nishizawa, and K. Muroga. 1995. Viral nervous necrosis of larval and juvenile marine fish. *Proceeding of the International Symposium of*

- Biotechnology Applications in Aquaculture*. Asian Fisheries Society Special Publication 10: 147—152.
- Nakai, T. 2000. VNN pada ikan laut yang dibudidayakan: Sebuah tinjauan kecil. *Lolitikanta Newsletter*, 15: 1—2.
- Nakai, T. and K. Nakajima. 2002. Recent advances of betanodaviruses and iridoviruses in Asian Aquaculture. *Diseases of Aquatic Vertebrates 5<sup>th</sup> Symposium on Diseases in Asian Aquaculture*. Symposium Abstracts, 44 pp.
- Nakajima, K., Y. Maeno, J. Kurita, and Y. Inui. 1997. Vaccination against red sea bream iridoviral disease in red sea bream. *Fish Pathology*, 32(4): 205—209.
- Nguyen, H.D., T. Nakai, and K. Muroga. 1996. Progression of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) infection in naturally and experimentally infected striped jack *Pseudocaranx dentex* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 24: 99—105.
- Nime, K. 2002. Nodavirus infection as an emerging disease in aquaculture. *Diseases of Aquatic Vertebrates. 5<sup>th</sup> Symposium on Diseases in Asian Aquaculture*. Symposium Abstracts, 117 pp.
- Nishizawa, T., K. Mori, T. Nakai, I. Furusawa, and K. Muroga. 1994. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack viral nervous necrosis (SJVNN). *Disease of Aquatic Organism*, 18: 103—107.
- Rukyani, A., Taukhid, dan H.N. Kamiso. 1995. Imunisasi maternal: Suatu teknik baru dalam penanggulangan penyakit ikan. *Jurnal Litbang Pertanian XIV* (1): 1-5.
- Rukyani, A. 2001. Strategi pengendalian penyakit viral pada budi daya kerapu. *Prosiding Teknologi Budi Daya Laut dan Pengembangan Sea Farming di Indonesia*. Dep. Kelautan dan Perikanan-JICA, p. 27—34.
- 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.
- Somkiat, K., R. Somporn, and D. Yaowanit. 2002. A virological survey in diseased grouper in Thailand using virus isolation and polymerase chain reaction (PCR) technique. *Diseases of Aquatic Vertebrates 5<sup>th</sup> Symposium on Diseases in Asian Aquaculture*. Symposium Abstracts, 53 pp.
- Stoskopf, S.K. 1993. Immunology. In *Fish Medicine*. Stoskopf, M.K. (Eds.), W.B. Saunders Company. Mexico. p. 149—159.
- Syamsudin, A. 1983. Pengembangan metode produksi beberapa vaksin veteriner. *Jurnal Litbang Pertanian II*(2): 43—47.
- Tizard, I. 1988. *Pengantar Immunologi Veteriner*. Terjemahan Partodiredjo et al., 1988. Airlangga University Press. 497 pp.
- Watanabe, K., S. Suzuki, K. Suzuki, T. Nishizawa, M. Yoshimizu, and Y. Ezura. 1998. Control strategy for viral nervous necrosis of barfin flounder. *Fish Pathology*, 33 (4): 445—446.
- Yukio, M., L. de la Pena, and E. Cruz-Lacierda. 2002. Susceptibility of marine fish species to Piscine nodavirus from orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* in the Philippines. *Diseases of Aquatic Vertebrates 5<sup>th</sup> Symposium on Diseases in Asian Aquaculture*. Symposium Abstracts, 46 pp.
- Yuasa, K. 2000. Penyakit utama pada produksi benih kerapu tikus: VNN, deteksi, dan pencegahannya. *Lolitikanta Newsletter*, 15: 9—11.
- Yuasa, K., I. Koesharyani, D. Roza, K. Mahardika, F. Johnny, and Zafran. 2001. Manual for PCR procedure: Rapid diagnosis on viral nervous necrosis (VNN) in grouper. *Lolitikanta-JICA Booklet*. No.13, 35 pp.
- Zafran, T. Harada, I. Koesharyani, K. Yuasa, and K. Hatai. 1998. Indonesian hatchery reared sea bass larvae, *Lates calcarifer* associated with viral nervous necrosis (VNN). *Indonesian Fish. Res. J.*, IV (1): 19—22.
- Zafran dan K. Yuasa. 1999. Sejarah penyakit VNN di Indonesia. *Lolitikanta Newsletter* 15: 3—4.
- Zafran, I. Koesharyani, F. Johnny, K. Yuasa, T. Harada, and K. Hatai. 2000. Viral nervous necrosis in humpback grouper, *Cromileptes altivelis* larvae and juveniles in Indonesia. *Fish Pathology* 35 (2): 95—96.
- Zapata, A.G., A. Chiba, and A. Varas. 1996. Cells and Tissues of the Immune System of Fish. In *The Fish Immune System: Organism, Pathogen, and Environment*. G. Iwama and T. Nakanishi (eds.), Academic Press. USA, p. 1—62.