

## PEMISAHAN BAHAN AKTIF IMUNOSTIMULAN DARI DINDING SEL BAKTERI *Vibrio harveyii* DAN UJI EFEKTIVITASNYA PADA BENIH IKAN KERAPU BEBEK, *Cromileptes altivelis*

Fris Johnny<sup>\*)</sup>, Zafran<sup>\*)</sup>, dan Des Roza<sup>\*)</sup>

### ABSTRAK

Suatu percobaan untuk memisahkan bahan aktif imunostimulan dari dinding sel bakteri *Vibrio harveyii* dan uji efektivitasnya dalam upaya meningkatkan imunitas benih ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* telah dilakukan di Laboratorium Patologi Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol-Bali. Dari dinding sel bakteri *Vibrio harveyii* telah berhasil dipisahkan dan dikoleksi lipopolisakarida (LPS) setengah murni dan murni. Koleksi LPS selanjutnya dilakukan untuk uji efektivitas pada benih ikan kerapu bebek dengan ukuran panjang total 6—8 cm. Benih ikan kerapu bebek sebanyak 360 ekor dipelihara dalam bak polikarbonat volume 100 L sebanyak 12 bak dengan kepadatan 30 ekor/bak, diinjeksikan secara intra peritoneal imunostimulan hasil pemisahan dengan dosis sebesar 0,1 mL bakterin/ekor (A); dosis 0,1 mL LPS setengah murni/ekor (B); dosis 0,1 mL LPS murni /ekor (C); dan tanpa perlakuan imunostimulan sebagai kontrol (D). Imunostimulan diberikan setiap 5 hari, dan pada hari ke-10, 20, dan 30 dilakukan koleksi darah untuk pengamatan aktivitas fagositik (PA) dan aktivitas lisozim (LA) dari masing-masing perlakuan. Pada hari ke-30 dilakukan uji tantang dengan menggunakan inokulum VNN. Percobaan dirancang dengan rancangan acak lengkap (RAL) menggunakan 4 perlakuan dan 3 ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa PA, LA, dan sintasan ikan yang diberi perlakuan imunostimulan lebih tinggi dibanding kontrol. Dari percobaan ini dapat disimpulkan bahwa imunostimulan yang berasal dari dinding sel bakteri *Vibrio harveyii* efektif meningkatkan imunitas non-spesifik benih ikan kerapu bebek.

**ABSTRACT:** *Extraction of immunostimulant from cell wall of Vibrio harveyii and its effectiveness on increasing non-specific immunity of juvenile humpback grouper, Cromileptes altivelis. By: Fris Johnny, Zafran, and Des Roza*

*A serial of experiments to extract immunostimulant from cell walls of Vibrio harveyii and its effectiveness to stimulate non-specific immunity of juvenile humpback grouper Cromileptes altivelis have been conducted in pathology Laboratory of Research Institute for Mariculture, Gondol-Bali. Lipopolysaccharide (LPS) both in pure and crude forms were collected. Formalin-killed Vibrio harveyii (bacterin) was also prepared as an immunostimulant. Thirty juvenile humpback groupers 6—8 cm (total length) were intraperitoneally-injected with 0.1 mL/pc of bacterin (treatment A), 0.1 mL crude LPS/pc (treatment B), 0.1 mL pure LPS/pc (treatment C), and without immunostimulant as a control (D). The fish were then reared in 100 L circular polycarbonate tank equipped with aeration system. The immunostimulant were administered every five days, the experiment was arranged in completely randomized design with three replicates. The blood of fish from each group were collected on day 10, 20, and 30 to measure non-specific immune parameters, including phagocytic activity (PA) and lyozyme activity (LA). Result showed that both PA, LA, and survival*

<sup>\*)</sup> Peneliti pada Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol

rate of fish treated with immunostimulants were higher than that of control. It is suggested that bacterin and LPS are potential materials to use as immunostimulants.

**KEYWORDS:** *humpback grouper, immunostimulant, non-specific immunity, Vibrio harveyii*

## PENDAHULUAN

Hatcheri Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut (BBRPBL), Gondol-Bali telah berhasil mengembangkan teknologi pembenihan ikan kerapu secara intensif dan terkontrol. Teknologi ini telah banyak diadopsi oleh hatcheri-hatcheri sekitar BBRPBL, baik yang skala kecil maupun skala besar. Seiring dengan perkembangannya, penyakit merupakan kendala yang tidak dapat dihindari. Penyakit yang disebabkan oleh infeksi virus, bakteri, jamur, parasit, serta penyakit-penyakit non-infeksi seperti malnutrisi, keracunan, dan kelainan bentuk, merupakan hal yang sering dihadapi dalam pembenihan ikan laut. Penyakit infeksi virus yang dapat menyebabkan kematian adalah infeksi *viral nervous necrosis* atau VNN (Zafran *et al.*, 2000) dan iridovirus (Owen, 1993).

Salah satu upaya pencegahan infeksi virus di hatcheri adalah dengan meningkatkan respons imun non-spesifik ikan tersebut melalui pemberian imunostimulan. Imunostimulan merupakan sekelompok senyawa biologi dan sintesis yang dapat meningkatkan sistem imunitas spesifik maupun 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 (Thompson *et al.*, 1999). Percobaan skala laboratorium penggunaan imunostimulan pada ikan kerapu telah dilakukan di BBRPBL Gondol, di antaranya penggunaan imunostimulan peptidoglycan dalam pakan pelet (Johnny *et al.*, 2001), dengan perendaman (Roza *et al.*, 2002), penyuntikan peptidoglycan secara intraperitoneal pada ikan kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus* (Johnny & Roza, 2002). Tetapi sampai sekarang belum ada penelitian aplikasi imunostimulan skala massal di hatcheri.

Imunostimulan dapat diperoleh dari berbagai sumber, antara lain dari dinding sel bakteri, dinding sel yeast, cangkang udang (krustasea), dan dari miselia jamur (Almendras, 2001). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk

memproduksi imunostimulan dari bakteri dan menguji efektivitasnya dalam meningkatkan imunitas benih kerapu.

## BAHAN DAN METODE

### *Pemisahan Lipopolisakarida Setengah Murni*

Bakteri ditumbuhkan pada media penumbuh TSA (30,2 g tryptone soya agar; 20 g NaCl; 15 g bacto agar; 1 L akuades ) dan dipanen dalam saline steril dengan kepadatan  $10^{10}$  CFU/mL. Suspensi disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang dan kemudian ditambahkan 0,1 g/mL dalam 0,1 M acetat Buffer (1,25 mM MgOSO<sub>4</sub>; pH 5,0) dengan perbandingan 1:1. Suspensi diaduk rata dengan vortex, ditambahkan 1 µg D-Nase dan R-Nase per mL. Suspensi didinginkan dalam freezer suhu 10°C selama 10 menit. Selanjutnya suspensi disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit dengan suhu 4°C, supernatan dibuang. Lakukan pencucian pelet sebanyak 3x dalam larutan dingin HEPES (10 mM N-2-hydroethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic acid) yang mengandung 0,1 M NaCl. Ditambahkan 0,05 g/mL PBS (10 mM sodium fosfat dalam 0,85% NaCl, pH 7,3). Terakhir suspensi diaduk rata dan disterilkan dengan autoclave selama 15 menit. LPS setengah murni telah diperoleh, dikoleksi, dan disimpan dalam tabung sentrifuse plastik volume 15 cc di almari pendingin sampai siap digunakan.

### *Pemisahan Lipopolisakarida Murni*

Metode pemisahan lipopolisakarida setengah murni dengan murni hampir sama, hanya dibedakan dengan merusak dinding sel bakteri dengan menggunakan sonikasi. Setelah suspensi didinginkan dalam freezer suhu 10°C selama 10 menit, kemudian dilakukan merusak dinding sel bakteri dengan sonikasi. Suspensi yang mengandung sel bakteri yang telah disonikasi disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit dengan suhu 4°C dan supernatan dibuang. Pencucian pelet dilakukan sebanyak

3x dalam larutan dingin HEPES (10 mM N-2-hydroethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic acid) yang mengandung 0,1 M NaCl. Dilakukan pemeriksaan mikroskopis dengan pewarnaan crystal violet untuk memastikan tidak ada lagi sel yang utuh. Ditambahkan 0,05 g/mL PBS (10 mM sodium fosfat dalam 0,85% NaCl, pH 7,3). Suspensi diaduk rata dan disterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit. LPS murni telah diperoleh, dikoleksi, dan disimpan dalam tabung sentrifuse plastik volume 15 cc di almari pendingin sampai siap digunakan.

Metode yang digunakan untuk pemisahan lipopolisakarida setengah murni dan murni adalah modifikasi Metode Westphal & Jann (1965), Ezzel *et al.* (1990), dan Rukyani *et al.* (1998).

### Uji Efektivitas Imunostimulan

#### Penyiapan 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 bakterin dimatikan dengan metode taburan. Sebelum bakterin diberikan ke ikan uji dilakukan uji viabilitas pada medium TSA selama 48 jam pada suhu 26°C. Apabila terjadi pertumbuhan, inaktivasi diulang kembali. Sebelum digunakan bakterin tersebut disimpan dalam lemari pendingin.

#### Ikan uji

Benih ikan yang digunakan adalah benih ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* dengan ukuran panjang total 6–8 cm. Benih ikan kerapu bebek sebanyak 360 ekor dipelihara dalam bak polikarbonat volume 100 L sebanyak 12 bak dengan kepadatan 30 ekor/bak, bakterin dan imunostimulan lipopolisakarida (LPS) hasil pemisahan diinjeksikan secara intra peritoneal dengan dosis;

- Imunostimulan bakterin dosis 0,1 mL/ekor
- Imunostimulan LPS setengah murni dosis 0,1 mL/ekor
- Imunostimulan LPS murni dosis 0,1 mL/ekor
- Tanpa perlakuan imunostimulan (PBS) sebagai kontrol

Imunostimulan diberikan setiap 5 hari, dan pada hari ke-10, 20, dan 30 dilakukan koleksi darah untuk pengamatan aktivitas fagositik dan aktivitas lisozim dari masing-masing perlakuan. Percobaan dirancang dengan rancangan acak lengkap (RAL) menggunakan 4 perlakuan dan 3 ulangan.

#### Uji Tantang

Pada hari ke-30 pasca perlakuan, masing-masing 15 ekor benih ikan uji dari tiap-tiap kelompok perlakuan diuji tantang dengan VNN hasil ekstraksi organ otak yang positif VNN melalui penyuntikan 0,1 mL inokulum VNN/ekor ikan secara intramuskular. Pengamatan dilakukan terhadap gejala klinis dan sintasan selama 12 hari pemeliharaan.

#### Uji Aktivitas Fagositik (PA) dan Indeks Fagositik (PI)

Uji PA menggunakan modifikasi dari metode Siwicki & Anderson (1993) dan Ellis (1993). Untuk uji PA dibutuhkan bahan enzim Zymosan A (Sigma) yang berasal dari *Saccharomyces cerevisiae*. Zymosan sebanyak 50 mg dilarutkan dalam larutan 10 mL PBS menggunakan tabung mikro. Lima puluh µL leukosit dicampur dengan Zymosan A, diaduk rata dengan mikro pipet dan disimpan pada suhu 25°C selama satu jam. Selanjutnya dari campuran tersebut dibuat preparat oles pada gelas objek dan diwarnai dengan May-Gruenwald's Solution Modified dan Giemsa Solution 3%. Pengamatan PA dilakukan di bawah mikroskop menggunakan rumus:

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

$$PI = \frac{\text{Jumlah zymonase A}}{\text{Jumlah fagosit}}$$

#### Uji Aktivitas Lisozim (LA)

Metode yang digunakan adalah modifikasi dari metode Rowley (1993) dan Klontz (1997). Tahap pertama disiapkan media agar yang mengandung *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) pada cawan petri. Pada cawan petri tersebut dibuat lubang berdiameter 40 mm sebanyak tiga buah menggunakan pipet. Plasma darah sebanyak 10 µL dimasukkan ke dalam dua lubang tersebut, sedangkan satu lubang lagi diisi dengan 10 µL *chicken egg*

*white lysozyme* (Sigma) sebagai kontrol. Cawan petri tersebut dibiarkan selama 10 menit pada suhu kamar, kemudian diinkubasi pada suhu 25°C. LA diamati dengan mengukur diameter zona yang terbentuk. Pengamatan dilakukan selama 3 hari dan dilakukan penghitungan dengan rumus sebagai berikut:

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

## HASIL DAN BAHASAN

Hasil pemisahan lipopolisakarida (LPS) dari dinding sel bakteri *Vibrio harveyi* telah diperoleh dua jenis LPS yaitu setengah murni dan murni. Untuk pemisahan LPS setengah murni dan murni sebetulnya tahapannya hampir sama, hanya saja dibedakan dengan perusakan dinding sel bakteri menggunakan sonikasi. Perusakan dinding sel bakteri bertujuan untuk memperoleh LPS yang murni dan bebas dari ikatan-ikatan biokimia sel bakteri, sehingga bahan aktif imunostimulan dari sel bakteri *Vibrio harveyi* yang diperoleh tidak diikuti oleh bahan penghambat aktivasi LPS. LPS adalah komponen utama lapisan luar dari bakteri gram negatif, penyambung utama dari integritas struktur dari bakteri dan melindungi membran dari berbagai jenis kerusakan oleh bahan kimia. Selain itu, LPS merupakan suatu endotoksin dan memicu suatu respons yang kuat dari sistem kebal hewan normal. Hanya ada satu bakteri gram positif yang menguasai LPS yaitu *Listeria monocytogenes*, secara umum terjadi sebagai agen infeksi pada susu yang tidak steril. LPS berperan sebagai prototipikal endotoksin, sebab LPS mengikat CD 14/TLR4/MD2 reseptor kompleks dengan cara kerja promotor pengeluaran "pro-inflammatory cytokines" dalam banyak tipe sel, terutama dalam makrofag. Suatu tantangan LPS dalam imunologi adalah memapar subjek dengan LPS yang berperan sebagai suatu toksin. LPS juga meningkatkan *negative charge* membran sel dan membantu menstabilkan struktur membran secara keseluruhan. Sebagai tambahan, LPS adalah "exogenous pyrogen" atau senyawa yang menyebabkan demam eksternal. Dengan peran LPS yang begitu penting bagi bakteri gram negatif, dapat mematikan sel jika dimutasi/dipindahkan atau dibuang, maka LPS selanjutnya merupakan target utama untuk senyawa antimikrobia masa depan (Westphal & Jann, 1965; Ezzel *et al.*, 1990; Rukyani *et*

*al.*, 1998). Di Kanada, LPS telah dibuktikan mampu meningkatkan antibodi ikan dari infeksi bakteri *Flavobacterium psychrophilum* (Crump *et al.*, 2003), bahkan identifikasi gen ikan kerapu, *Epinephelus awoara* yang distimulus dengan LPS telah dilakukan di Cina (Wang & Wu, 2007).

Dalam pemisahan LPS murni sering terjadi kesulitan ketika proses sonikasi, apabila waktu dan tingkat desibel tidak sesuai maka kerusakan dinding sel bakteri yang diperoleh tidak sempurna dan masih ada dinding sel yang utuh, maka LPS yang diperoleh adalah LPS setengah murni. Untuk meyakinkan bahwa LPS yang diperoleh adalah murni, maka setelah proses sonikasi dilakukan pembuatan preparat ulas dengan pewarnaan untuk pengamatan utuh tidaknya sel bakteri. Modifikasi LPS dapat untuk memperoleh suatu struktur gula yang spesifik, LPS ini dapat berfungsi sebagai suatu mekanisme adaptif untuk membantu inang mengatasi kemungkinan efek toksik dari bakteri gram negatif yang umum ditemukan dalam usus halus.

Aktivitas fagositik adalah suatu kemampuan dari sistem imun non-spesifik untuk menetralkan/memangsa (fagositosis) benda asing, termasuk organisme patogen yang masuk ke dalam tubuh. Sedangkan lisozim adalah enzim hidrolitik yang terdapat dalam lendir, serum, dan sel-sel fagositik dari berbagai spesies ikan. Zat ini diyakini memberikan daya kekebalan yang penting terhadap patogen mikrobik. Neutrofil dan monosit dari ikan mengandung lisozim dalam sitoplasmanya dan lisozim serum mungkin berasal dari leukosit (Ellis, 1993).

Pada Tabel 1 terlihat bahwa aktivitas fagositik (PA) benih kerapu bebek belum meningkat secara nyata pada hari ke-10 pemeliharaan. Peningkatan yang nyata baru terjadi mulai hari ke-20 pada perlakuan bakterin dan LPS murni, sedangkan pada perlakuan LPS setengah murni PA-nya tidak berbeda nyata dengan kontrol. Pada Tabel 2 juga terlihat peningkatan yang signifikan PI kelompok ikan yang diberi perlakuan imunostimulan. Aktivitas lisozim kelompok ikan yang diberi perlakuan imunostimulan juga meningkat dan berbeda nyata dibanding kontrol (Tabel 3). Hasil penelitian ini mendukung penelitian-penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, bahwa imunostimulan efektif meningkatkan kekebalan non-spesifik pada ikan. Johnny *et al.* (2001) melaporkan bahwa imunostimulan

Tabel 1. Hasil pengujian persentase (%) aktivitas fagositik (PA) pada hari ke-10, 20, dan 30 pemeliharaan pada benih ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* yang diberi perlakuan imunostimulan

Table 1. Percentage (%) of phagocytic activity (PA) at D-10, D-20, and D-30 of juvenile humpback grouper, *Cromileptes altivelis* treated with immunostimulant

Perlakuan (Treatment)	D-10	D-20	D-30
Bakterin ( <i>Bacterin</i> )	8.33 ± 0.58 <sup>a</sup>	9.33 ± 0.58 <sup>a</sup>	11.67 ± 0.58 <sup>b</sup>
LPS setengah murni ( <i>Crude LPS</i> )	9.33 ± 0.58 <sup>a</sup>	9.67 ± 0.58 <sup>ab</sup>	9.33 ± 0.58 <sup>a</sup>
LPS murni ( <i>Pure LPS</i> )	9.33 ± 0.58 <sup>a</sup>	10.67 ± 0.58 <sup>b</sup>	12.33 ± 0.58 <sup>b</sup>
Kontrol ( <i>Control</i> )	8.33 ± 0.58 <sup>a</sup>	8.67 ± 0.58 <sup>a</sup>	8.33 ± 0.58 <sup>a</sup>

Keterangan: Perbandingan adalah vertikal. Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda secara statistik (P>0,05)

Remarks: Comparison is vertical. Values with the same superscripts are not significantly different (P>0.05)

Tabel 2. Hasil pengujian indeks fagositik (PI) pada benih ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* setelah pemberian imunostimulan pada hari ke-10, 20, dan 30 perlakuan

Table 2. Value of phagocytic index (PI) at D-10, D-20, and D-30 of juvenile humpback grouper, *Cromileptes altivelis* treated with immunostimulant

Perlakuan (Treatment)	D-10	D-20	D-30
Bakterin ( <i>Bacterin</i> )	1.17 ± 0.11 <sup>ab</sup>	1.23 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.40 ± 0.10 <sup>bc</sup>
LPS setengah murni ( <i>Crude LPS</i> )	1.13 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.27 ± 0.05 <sup>ab</sup>	1.27 ± 0.06 <sup>ab</sup>
LPS murni ( <i>Pure LPS</i> )	1.17 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.27 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.47 ± 0.06 <sup>c</sup>
Kontrol ( <i>Control</i> )	1.07 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.17 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.13 ± 0.06 <sup>a</sup>

Keterangan: Perbandingan adalah vertikal. Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda secara statistik (P>0,05)

Remarks: Comparison is vertical. Values with the same superscripts are not significantly different (P>0.05)

Tabel 3. Hasil pengujian aktivitas lisosim (LA) berdasarkan diameter cakram (cm) yang terbentuk pada benih ikan kerapu bebek setelah pemberian imunostimulan pada hari ke-10, 20, dan 30 perlakuan

Table 3. Diameter (cm) of lysozyme activity (LA) at D-10, D-20, and D-30 of juvenile humpback grouper, *Cromileptes altivelis* treated with immunostimulant

Perlakuan (Treatment)	D-10	D-20	D-30
Bakterin ( <i>Bacterin</i> )	1.04 ± 0.14 <sup>ab</sup>	1.47 ± 0.06 <sup>c</sup>	1.56 ± 0.07 <sup>c</sup>
LPS setengah murni ( <i>Crude LPS</i> )	1.01 ± 0.21 <sup>ab</sup>	1.17 ± 0.12 <sup>b</sup>	1.28 ± 0.05 <sup>b</sup>
LPS murni ( <i>Pure LPS</i> )	1.21 ± 0.25 <sup>b</sup>	1.50 ± 0.04 <sup>c</sup>	1.60 ± 0.07 <sup>c</sup>
Kontrol ( <i>Control</i> )	0.81 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.93 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.99 ± 0.10 <sup>a</sup>

Keterangan: Perbandingan adalah vertikal. Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda secara statistik (P>0,05)

Remarks: Comparison is vertical. Values with the same superscripts are not significantly different (P>0.05)

peptidoglycan (PG) yang dicampurkan ke dalam pakan mampu meningkatkan PA, PI, dan LA ikan kerapu bebek. Pada percobaan lain terbukti bahwa PG yang diberikan melalui penyuntikan intraperitoneal mampu meningkatkan imunitas non-spesifik ikan kerapu macan (Johnny & Roza, 2002).

Aktivitas fagositik (PA) adalah suatu kemampuan 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 intrinsik untuk mengikat mikroorganisme secara langsung. Fagositosis yang efektif pada invasi kuman dini akan dapat mencegah timbulnya infeksi (Secombes, 1996). Lisozim adalah enzim hidrolitik yang ada di dalam lendir, serum, dan sel-sel fagositik dari berbagai spesies ikan. Kemungkinan zat ini memberikan daya kekebalan yang penting terhadap patogen mikrobik. Neutrofil dan monosit dari ikan-ikan mengandung lisozim dalam sitoplasmanya dan lisozim serum mungkin berasal dari leukosit-leukosit tersebut (Ellis, 1993). Aktivitas lisozim pada ikan turbot, *Scophthalmus maximus* L., meningkat pesat setelah penyuntikan glukucan (Santarem *et al.*, 1997).

Berdasarkan hasil uji tantang dengan VNN selama 12 hari pengamatan setelah 30 hari paska perlakuan memberikan korelasi positif terhadap peningkatan ketahanan benih kerapu bebek (Tabel 4). Perlakuan LPS murni terlihat memberikan respons terbaik dalam meningkatkan ketahanan benih ikan kerapu bebek yang ditantang dengan VNN setelah 12 hari dengan sintasan sebesar 68,89%; diikuti

perlakuan bakterin sebesar 60,00%; LPS setengah murni sebesar 51,11%; dan kontrol sebesar 42,22%. Secara statistik antara perlakuan imunostimulan berbeda nyata ( $P < 0,05$ ).

Pada kontrol (tanpa imunostimulan) setelah 3 hari uji tantang, ikan memperlihatkan gejala klinis, di mana nafsu makan mulai menurun cepat diikuti ikan berenang dengan posisi tubuh terbalik, tapi belum ada kematian. Pada hari ke-4 paska penyuntikan, ikan pada kontrol sudah mulai mengalami kematian, untuk perlakuan bakterin dan LPS setengah murni kematian ikan dimulai pada hari ke-5, sedangkan pada perlakuan LPS murni kematian ikan mulai pada hari ke-6. Pada semua perlakuan imunostimulan kematian berakhir pada hari ke-10, sedangkan ikan kontrol masih berlanjut sampai hari ke-12. Zafran *et al.* (2000) menemukan bahwa tanda spesifik ikan yang terinfeksi VNN yaitu berenang dengan keadaan tubuh terbalik. Setelah dilakukan pengamatan terhadap sayatan histologi pada organ otak dan mata terlihat dengan jelas terjadi degenerasi jaringan saraf dan mata yang ditandai dengan adanya nekrosis dan vakuolasi. Selain itu, pengamatan pada patologi anatomi, terlihat gelembung renang membesar, kematian akan terjadi akibat dari partikel virus sudah terakumulasi pada sistem saraf ikan sehingga akan mengakibatkan gangguan pernapasan, dan terhentinya proses makan (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001).

## KESIMPULAN

Bahan aktif imunostimulan yang diperoleh dari dinding sel bakteri *Vibrio harveyii* adalah lipopolisakarida. Lipopolisakarida murni yang

Tabel 4. Sintasan (%) benih ikan kerapu bebek setelah uji tantang dengan VNN

Table 4. Survival rate (%) of juvenile humpback grouper following challenge with VNN

Perlakuan <i>Treatment</i>	Sintasan <i>Survival rate*</i> (%)
Bakterin ( <i>Bacterin</i> )	60.00 <sup>c</sup>
LPS setengah murni ( <i>Crude LPS</i> )	51.11 <sup>b</sup>
LPS murni ( <i>Pure LPS</i> )	68.89 <sup>d</sup>
Kontrol ( <i>Control</i> )	42.22 <sup>a</sup>

Keterangan : Perbandingan adalah vertikal. Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda secara statistik ( $P > 0,05$ )

Remarks : Comparison is vertical. Values with the same superscripts are not significantly different ( $P > 0.05$ )

dipisahkan dari dinding sel bakteri mampu meningkatkan kekebalan non-spesifik benih ikan kerapu bebek.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh APBN tahun anggaran 2006. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Saudara Slamet Haryanto dan Muhammad Anshori sebagai teknisi Laboratorium Patologi atas bantuannya selama penelitian ini berlangsung.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Almendras, J.M.E. 2001. Immunity and biological methods of disease prevention and control. *In* Health Management in Aquaculture. G.D. Lio-Po, C.R. Lavilla, and E.R. Cruz-Lacierda (Eds.). p. 137—158.
- 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, USA. p. 289—310.
- 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.
- Crump, E.M., M.P. Perry, S. Gale, E. Crawford, and W.W. Kay. 2003. Lipopolysaccharide O-Antigen Antibody-Base Detection of the Fish Pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 6: 182—190.
- Ellis, A.E. 1993. Lysozyme assays *In* Stolen *et al.* (Eds.). Techniques in Fish Immunology-1. Sos Publications, Fair Haven, NJ 07760. USA. p. 101—103.
- Ezzel, J.W., T.G. Abshire, S.F. Little, B.C. Lidgerding, and C. Brown. 1990. Identification of *Bacillus anthracis* by using monoclonal antibody to cell wall Galactose-N-Acetylglucosamine-Polysaccharide. *Journal of Clinical Microbiology*. 28(2): 223—231.
- Johnny, F., I. Koesharyani, D. Roza, Tridjoko, N.A. Giri, dan K. Suwirya. 2001. Respons ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* terhadap imunostimulan peptidoglycan melalui pakan pelet. *J. Pen. Perik. Indonesia*. 7(4): 52—56.
- Johnny, F. dan D. Roza. 2002. Pengaruh penyuntikan imunostimulan peptidoglycan terhadap peningkatan tanggap kebal non-spesifik ikan kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus*. Laporan Penelitian Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol. 12 pp.
- Klontz, G.W. 1997. Fish hematology. Techniques in fish immunology-3. *In* Stolen *et al.* (Eds.). Sos Publications, Fair Haven, NJ 07704-3303, USA. p. 121—131.
- 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.
- Rowley, A.F. 1993. Collection, separation and identification of fish leukocytes *In* Stolen *et al.* (Eds.). Techniques in Fish Immunology-1. Sos Publications, Fair Haven, NJ 07760. USA. p. 113—136.
- Roza, D., K. Mahardika, F. Johnny, Zafran, dan Tridjoko. 2002. 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. p. 91—101.
- Rukyani, A., F.H. Pasaribu, dan A. Sunarto. 1998. Penggunaan imunostimulan asal dinding sel bakteri untuk meningkatkan kekebalan udang windu. Dewan Riset Nasional. Laporan Riset Unggulan Terpadu. 64 pp.
- Santarem, M., B. Novoa, and A. Figueras. 1997. Effect of  $\beta$ -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.
- Thompson, K.D., J.H. Lilley, S.C. Chen, A. Adams, and R.H. Richards. 1999. The immune response of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) against *Aphanomyces invadans*. *Fish & Shellfish Immunology*. 9: 195—210.
- Wang, L. and X. Wu. 2007. Identification of differentially expressed genes in lipopolysaccharide stimulated yellow

- grouper, *Epinephelus awoara* spleen. *Fish & Shellfish Immunology*. 23(2): 354—363.
- Westphal, O. and K. Jann. 1965. Bacterial polysaccharides: extraction with phenol-water and further application of the procedure. *In* Whistler, R.L. & J.N. Mc Miller (ed.): *Methods in Carbohydrate Chemistry*. 5: 83—95.
- 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 Pathol.* 35(2): 95—96.