

**LAPORAN PENELITIAN AKHIR TAHUN 2009**



MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

**ANALISIS STRUKTUR PROTEIN DAN PENEN-  
TUAN PROTEIN IMMUNOGENIK VIRAL NERVOUS  
NECROSIS : PENCARIAN PROPHY-LAXIS UNTUK  
PENCEGAHAN TINGGINYA MORTALITAS  
KERAPU *Epinephelus fuscogutattus***

**INSENTIF DASAR**

**Dr. A.T. Soelih Estoepangestie, Drh.**

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN  
MASYARAKAT UNIVERSITAS AIRLANGGA  
November, 2009**

## ABSTRAK

Fish Nodavirus berbentuk icosahedral, tidak mempunyai envelope dengan diameter rata-rata 25 nm atau dengan kisaran 20-34 nm. Inti electron berukuran 13-21 nm, dikelilingi oleh lapisan jernih 5 nm. Virion terikat dengan membrane oleh endoplasmic reticulum atau bebas didalam sitoplasma, mungkin ada dalam susunan paracrystalline (Glazebrook *et al.*, 1990 ; Breuil *et al.*, 1991; Block *et al.*, 1991; Boonyaratpalin *et al.*, 1996; Grotmol *et al.*, 1997). Fish Nodavirus sekarang diklasifikasikan kedalam genus *Betanovirus* yang masuk kedalam *Nodaviridae* (Ball *et al.*, 2000) yang berbeda dengan nodavirus dari insek ialah alphanodavirus. Nama virus secara resmi adalah barfin flounder nervous necrosis (BFNNV), *Dicentrarchus labrax* encephalitis virus (DIEV), Japanese flounder nervous necrosis virus (JFNNV), *Lates carcarifer* encephalitis virus (LcEV), redspotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV), striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) and tiger puffer nervous necrosis virus (TPNNV). Selanjutnya dua nama sementara adalah Atlantic halibut nodavirus (AHNV) dan Malabar grouper nervous necrosis virus (MGNNV).

Kematian kerapu disebabkan oleh VNN setelah konfirmasi dengan PCR dan vaksinasi dengan whole cell virus proteksi yang didapatkan adalah 29 persen. Vaksinasi dilakukan selama 45 hari dimulai pada saat ikan berusia 30 hari dan diakhiri usia 80 hari. Selama vaksinasi kerapu diberi pakan *Artemia salina* sampai akhir penelitian. Kualitas air selama penelitian berlangsung adalah oksigen terlarut adalah 5 – 6 ppm, suhu 27 – 29 °C , salinitas 31 – 32 ppm dan pH air 7,3 – 7,5. Kualitas air seperti ini sudah cukup baik untuk mendukung kehidupan ikan dan organisme air lain. VNN juga tidak menular terhadap ikan yang hidup di air payau (bandeng) dan beberapa ikan air tawar (lele, koi, koki, mujair, nila). PI berada pada kisaran normal ialah 5.8-9.2 dan berat molekul coat protein adalah 32-95 kDa.

## SUMMARY

Fish nodavirus does not have envelope, icosahedral, with diameter 25 nm or between 20-34 nm. Electron core size is 13-21 nm, surrounded by clear layer 5 nm. Virion engaged by endoplasmic reticulum membrane or free inside cytoplasm, and my there is paracrystline arrangement (Glazebrook *et al.*, 1990 ; Breuil *et al.*, 1991; Block *et al.*, 1991; Boonyaratpalin *et al.*, 1996; Grotmol *et al.*, 1997). Today fish nodavirus is classified into genus Betanovirus or Nodaviridae (Ball *et al.*, 2000) which difference from insectnodavirus is alphanodavirus. The scientific name of the virus are barfin flounder nervous necrosis (BFNNV), *Dicentrarchus labrax* encephalitis virus (DIEV), Japanese flounder nervous necrosis virus (JFNNV), *Lates carcarifer* encephalitis virus (LcEV), red spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV), striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) and tiger puffer nervous necrosis virus (TPNNV), and 2 tentative name are Atlantic halibut nodavirus (AHNV) and Malabar grouper nervous necrosis virus (MGNNV).

The mortality of grouper is caused by VNN after confirmed with PCR, vaccination with whole cell virus resulted protection of 29 percent. Vaccination was done for 45 days, it was started when fish age of 30 days ended at 80 days old fish. Fish was feed *Artemia salina* during the course of experiment. The water quality were DO 5 – 6 ppm, water temperature 27 – 29 °C , salinity 31 – 32 ppm water pH air 7,3 – 7,5. Those water quality was support for aquatic organism live. VNN does not spread to another brackishwater fish (milkfish *Chanos chanos*) and other freshwater fish such as lele, koi, koki, mujair, nila.

## PRAKATA

Penelitian perikanan di Indonesia masih tertinggal jauh dibandingkan dengan bidang pertanian lainnya, terutama terhadap masalah yang dihadapi didalam pembudidayaan ikan baik di panti pembenihan dan kolam budidaya, apalagi jika dibandingkan dengan kemajuan penelitian diluar negeri. Kerapu *Epinephelus fuscoguttatus* adalah primadona ekspor non udang Indonesia berharga mahal tetapi kematian benih kerapu yang sangat tinggi yang disebabkan oleh Viral Nervous Necrosis (VNN) sampai sekarang masih belum teratasi dibelahan dunia manapun.

Kesembronoan dan sulitnya kerjasama antar pembudidaya kerapu juga menjadi faktor utama susahny pemberantasan penyakit pada sistem budidaya. Pembuangan limbah industri maupun limbah budidaya dan air yang telah tercemar virus kadang tanpa disertai peringatan dini, sehingga virus sangat mudah sekali menyebar bebas berkeliaran didalam ekosistem. Penelitian analisis struktur protein dan epitope dari coat protein VNN sangat penting untuk membuat diagnose cepat dan pembuatan vaksin yang bisa digunakan untuk pencegahan penyakit. Harapan kami hal tersebut bisa kami lakukan sehingga bisa memberikan masukan bagi kepentingan industri nasional dan membimbing mahasiswa pasca untuk penelitian yang bermutu internasional dan dibutuhkan oleh industri budidaya nasional. Selain hal tersebut alih ketrampilan penelitian kepada mahasiswa sangatlah penting agar mata rantai pemikiran ini tidak terputus ditengah jalan, dan juga penelitian yang baik dari mahasiswa sulit dicapai tanpa pembiayaan yang memadai. Penelitian ini adalah sebagian kecil dari problema diatas, karena kasus penyakit VNN sering terjadi di beberapa daerah di Indonesia. Tetapi tanpa kesungguhan operator di lapangan untuk melaksanakan sistem budidaya yang benar sulit kiranya untuk bisa mengatasi VNN di Indonesia.





## DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	ii
ABSTRAK	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
I. PENDAHULUAN	1
II. SIGINIFIKASI PENELITIAN	4
III. KERANGKA KONSEPTUAL	5
IV. MATRIK PENELITIAN	8
V. STUDI PUSTAKA	10
5.1. VNN Penyebab Kematian Tinggi Kerapu	10
5.2. Aetiology VNN	12
5.3. Epidemiology dari VNN	16
5.4. Penularan VNN	17
5.5. Faktor Eskternal Sebagai Pemicu Penyakit	18
5.6. Pencegahan Virus Dengan Sistem Budidaya Tertutup	19
5.7. Pengurangan Kandungan Bahan Organik di Kolam	21
5.8. Penurunan Potensi Lahan	22
VI. METODE PENELITIAN	24
• Penelitian Tahun Ketiga	23
VII. HASIL DAN PEMBAHASAN	36
VIII. KESIMPULAN DAN SARAN	50
IX. KEPUSTAKAAN	51

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Matrik penelitian	8
Tabel 2. Penyakit utama kerapu panti pembenihan dan jarring apung di Indonesia	10
Tabel 3. Gejala klinis kerapu yang rentan terhadap infeksi VNN	15
Tabel 4. Gejala klinis utama ikan yang terserang viral encephalopathy dan retinopathy pada larva dan juvenil	16
Tabel 5. Berat molekul dalam kilodalton (kDa) dari VNN berdasarkan pergerakan relatif dalam SDS-polyacrilamide gel.	39
Tabel 6. Isoelectric point dari VNN,	40
Tabel 7. Proteksi kerapu sesudah vaksinasi dengan Whole Killed Virus (WKV) dan 32 kDa protein setelah uji tantang dengan VNN.	41
Tabel 8. Produksi antibody kerapu setelah divaksin dengan 32 kDa dan Whole Killed Virus (WKV) dan diuji tantang dengan VNN dan diamati selama 14 hari.	42
Tabel 9. Hasil test netralisasi dari sera kerapu dengan jumlah ikan adalah 5 ekor. Netralisasi adalah resiprokal nilai dari pengenceran serum 50% atau yang lebih tinggi dari titer VNN	44
Tabel 10. Penularan VNN terhadap bandeng setelah penyuntikan dengan VNN isolat Bali dan diamati selama 14 hari.	50
Tabel 11. Penularan VNN terhadap berbagai ikan air tawar.	51
Tabel 12. Jumlah kematian ikan kerapu tikus selama masa aklimatisasi dan pemberian vaksin secara oral.	45
Tabel 13. Kematian total ikan kerapu tikus selama masa vaksinasi (50 hari).	47

**DAFTAR GAMBAR**

Gambar 1. Alur penelitian VNN yang telah dan akan dilakukan di FKH Unair	7
Gambar 2. Alur kerja untuk isolasi dan identifikasi struktur protein dan immonogenik protein dari VNN.	24
Gambar 3. Produk PCR dari ikan kerapu yang terinfeksi alami oleh VNN.	34
Gambar 4. Kultur sel yang digunakan untuk memperbanyak VNN.	35
Gambar 5. Hasil SDS-PAGE dari protein VNN yang diisolasi ikan kerapu.	37
Gambar 6. Hasil elusi dari protein 32 kDa dari VNN isolat Bali	38
Gambar 7. Struktur protein VNN dari SDS PAGE, lane 1 marker, 2 VNN, 3 KHV dan 4 WSBV.	39
Gambar 8. Kumulatif kematian ikan kerapu yang divaksin dengan 2 macam vaksin dan berbagai macam dosis dengan cara injeksi pada kerapu	
Gambar 9. Produksi superoxide anion dari kerapu macrophage	45
Gambar 10. Produksi extracellular O <sub>2</sub> dari kerapu macrophage	46
Gambar 11. Produksi intracellular O <sub>2</sub> dari kerapu macrophage	47
Gambar 12. Histopat lensa mata kerapu yang terinfeksi VNN.	49

## I. PENDAHULUAN

Laporan dari Dinas Perikanan dan Kelautan Indonesia bahwa jenis ikan yang perlu dibudidayakan untuk keperluan ekspor adalah ikan kerapu macan *Epinephelus fuscogutattus*, kerapu tikus *Chromileptis altivelis*, kakap merah *Lutjanus sp*, kerapu *Epinephelus sp*, kerapu putih *Lates calcarifer*, beronang *Siganus sp*, napoleon *Chelius undulus* (Dit-Jen Perikanan, 1997). Hingga tahun 1995 dari potensi yang ada telah dimanfaatkan 0.3 % masing-masing untuk ikan 0.5 % (5.120 ton), kerang-kerangan 0.04 % (19.3 ton) dan rumput laut 0.28 % (139.400 ton). Panjang pantai Indonesia adalah nomor dua sesudah Kanada sepanjang 81.000 km, telah diusahakan untuk budidaya laut mencapai 89.025 Ha. Sejak tahun 1992 7.5 juta ton (MT) ikan yang mempunyai kerapui ekonomis tinggi dibudidayakan di dunia, lebih dari 90 persen dihasilkan oleh benua Asia (Main and Rosenfeld, 1994).

Sekarang ikan kerapu telah diekspor sehingga kelangsungan pengiriman ikan harus dijaga, oleh sebab itu kegagalan budidaya yang disebabkan oleh penyakit harus dicegah. Ikan kerapu macan *Epinephelus fuscogutattus* termasuk *warmwater fish* dengan suhu pemeliharaan optimal 20 - 30°C bisa hidup pada air payau dan laut. Indonesia adalah negara produsen kerapu terbesar didunia dengan produksi 13,94 persen atau 41.000 MT pada tahun 1995. Atau 90 persen hasil tersebut dari tangkapan di alam dan ini harus disertai dengan produksi buatan. Bobot ikan konsumsi adalah 0.5 – 2 kg/ekor dan berharga sangat mahal. Jika *Vibrio sp*. menimbulkan penyakit pada kerapu, kemungkinan disebabkan defense mechanism menurun, karena dalam keadaan stress produksi antibody dan aktifitas phagocytosis terganggu. Salah satu cara untuk mendapatkan panen kerapu yang banyak dalam jangka waktu yang singkat adalah memakai teknik budidaya intensif walaupun banyak kendalanya. Karena semakin tinggi padat penebaran yang digunakan menyebabkan stress pada ikan yang akhirnya menyulut terjadinya penyakit.

Luas perairan karang di Indonesia dari hasil sensus tahun 1991 adalah 6.800 km<sup>2</sup> dengan perkiraan produksi ikan di perairan karang



adalah 97.014 ton per tahun, sedangkan potensi lestari adalah 52.221 ton per tahun. Angka ini didapatkan dari hasil penangkapan ikan di perairan karang, sedangkan potensi budidaya dengan jarring apung belum termasuk disini. Harga ikan kerapu *Epinephelus fuscogutattus* di Indonesia saja per kg kurang lebih Rp 350.000 – Rp 400.000 per kg, suatu jumlah yang menggiurkan bagi banyak orang. Dengan pertumbuhan konsumsi sebesar 9,55 persen per tahun produksi ikan kerapu seberapapun akan terserap oleh pasar dunia.

Sebenarnya sampai saat ini belum pernah adan penelitian mendalam tentang VNN di Indonesia. Zafran *et al* (1998; 1998) melaporkan penyebab kematian massal kerapu (humpback grouper) *Epinephelus fuscogutattus* adalah VNN pada stadium larvae dan juvenile. VNN penyebab kematian kerapu bahkan pada awal tahun 1998 kematian larva kerapu bisa mencapai 100 persen. Setelah dilakukan konfirmasi dengan PCR diketahui bahwa penyebabnya adalah VNN. Tetapi sampai saat ini di negara manapun pencegahan yang utama dilakukan berdasarkan skrining induk dengan PCR, artinya hanya induk bebas PCR yang digunakan sebagai brood stock untuk penghasil benih, hal tersebut juga dilakukan di Indonesia. Penelitian tentang kerapu kearah struktur protein belum pernah dilakukan, dan penelitian ini akan menjadi dasar kearah penelian lain dikemudian hari misalnya pengembangan vaksin. Kematian massal kerapu disebabkan oleh VNN dan menimbulkan kerugian yang sangat besar, terutama pada stadium larva dan juvenil. Kematian tersebut terjadi pada beberapa spesies grouper yang dibudidayakan di beberapa negara, dan sampai saat ini pencegahan yang digunakan adalah skrining induk dengan PCR. Benih yang bebas VNN pun jika dipelihara dalam medium air yang terkontaminasi VNN tidak menjamin bahwa VNN tidak akan menyerang kerapu. Sehingga untuk pencegahan tersebut diberbagai belahan dunia manapun sedang dicari prophylaxis yang manjur untuk mencegah VNN. Misalnya dengan vaksinasi dengan partikel virus yang dimatikan. Sebelum dilakukan vaksinasi harus diketahui manakah struktur protein penyusun VNN yang immunogenik. Pada tataran ini harus diketahui terlebih dahulu struktur protein penyusun virus. Untuk mengetahui faktor

lain yang sangat penting dari vaksinasi adalah melihat apakah serum kerapu yang lolos dari serangan VNN mempunyai aktifitas netralisasi. Berpijak dari hasil diatas dikemudian hari akan dilakukan penelitian lanjutan tentang pencarian prophylaxis untuk infeksi kerapu strain Indonesia.

## II. SIGNIFIKASI PENELITIAN

Sebenarnya sampai saat ini belum pernah ada penelitian mendalam tentang VNN di Indonesia. Zafran *et al* (1998 dan 1998) melaporkan penyebab kematian massal kerapu (humpback grouper) *Epinephelus fuscogutattus* adalah VNN pada stadium larvae dan juvenile. VNN penyebab kematian kerapu bahkan pada awal tahun 1998 kematian larva kerapu bisa mencapai 100 persen. Setelah dilakukan konfirmasi dengan PCR diketahui bahwa penyebabnya adalah VNN. Tetapi sampai saat ini di negara manapun pencegahan yang utama dilakukan berdasarkan skrining induk dengan PCR, artinya hanya induk bebas PCR yang digunakan sebagai *brood stock* untuk penghasil benih, hal tersebut juga dilakukan di Indonesia. Penelitian tentang kerapu kearah struktur protein belum pernah dilakukan di Indonesia karena kemungkinan VNN strain lokal tersebut berbeda dengan VNN dari Australia, Jepang atau negara lain, dan penelitian ini akan menjadi dasar kearah penelian lain dikemudian hari misalnya pengembangan vaksin atau pengembangan prophylaxis lain.

Oleh sebab itu isolasi dan karakterisasi virus sangat diperlukan untuk mengetahui struktur protein penyusun virus sehingga bisa diketahui protein mana yang immunogenik. Karena sampai saat ini belum diketemukan cara untuk menanggulangi virus tersebut kecuali dengan pencegahan skrining induk. Jika protein immunogenik diketahui akan dicoba dibuat vaksin dari WSBV dengan berbagai tipe, killed virus vaccine, sub unit vaccine atau beberapa turunan virus tersebut. Kematian pada stadium larva dan juvenile sangat merepotkan karena walaupun divaksin sangat sulit mengingat ukurannya masih kecil. Vaksin yang dicaripun harus bisa diberikan secara oral.

### III. KERANGKA KONSEPTUAL

**3.1. Status penelitian VNN saat ini (Roadmap penelitian) yang telah dilakukan oleh Dr. A.T.Soelih Estupangesti bekerja sama dengan Program Studi Perikanan Universitas Airlangga**

**a. Penelitian yang telah dilakukan di Program Studi Perikanan FKH Unair**

1. Studi tentang VNN penyebab kematian massal kerapu *Epinephelus fuscoguttatus* pada stadium larva dan juvenile.

**b. Publikasi pada jurnal ilmiah penelitian tentang WSBV**

1. Suprpto, H., W.Hastuti, L.Sumartiw, A.T.S. Estupangesti and M. Murdjani (2006) : Detection of Viral Nervous Necrosis (VNN) from grouper *Epinephelus fuscoguttatus* and study of their pathological changes.J. Perikanan IPB Bogor. (Submitted).

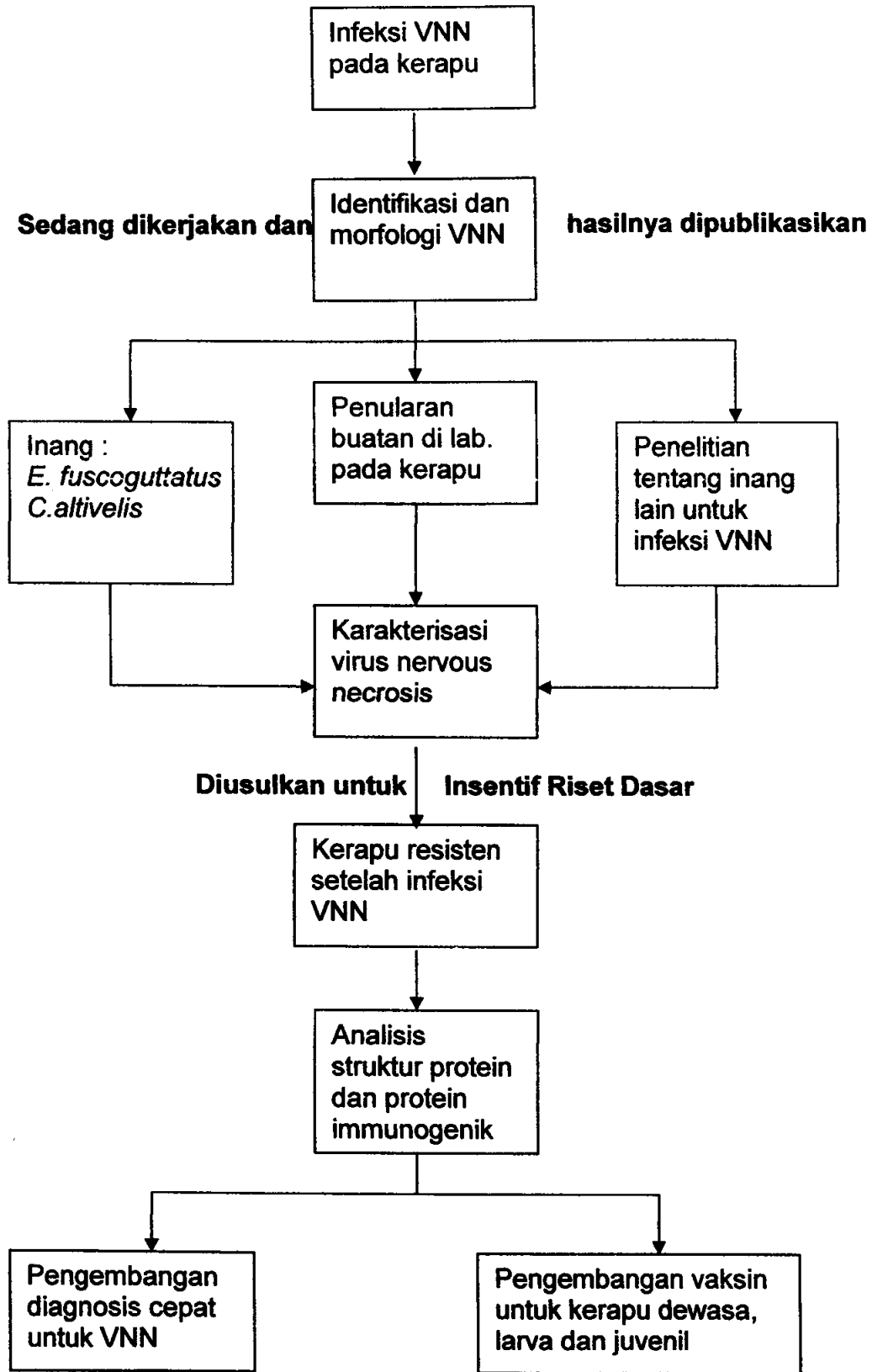
Dan ada beberapa artikel lain tentang VNN yang sedang dipersiapkan untuk diterbitkan di berbagai jurnal internasional dan nasional dari penelitian yang sedang dilakukan diatas.

Untuk penelitian tentang VNN di luar negeri terutama di Asia Timur, Tenggara dan Selatan sangat berbeda karena VNN terdiri dari beberapa strain virus. Nama virus secara resmi adalah barfin flounder nervous necrosis (BFNNV), *Dicentrarchus labrax* encephalitis virus (DIEV), Japanese flounder nervous necrosis virus (JFNNV), *Lates carcanifer* encephalitis virus (LcEV), redspotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV), striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) and tiger puffer nervous necrosis virus (TPNNV). Selanjutnya dua nama sementara adalah Atlantic halibut nodavirus (AHNV) dan Malabar grouper nervous necrosis virus (MGNNV). Karena berbeda strain kemungkinan besar sifat dan karakter virus tersebut juga berbeda sehingga untuk strain Indonesia perlu diteliti tersendiri dan dikembangkan untuk diagnosa cepat dan pencarian beberapa prophylaxis lain misalnya dengan pembuatan vaksin. Alur penelitian yang disajikan pada gambar dibawah



**semua telah dilakukan di Program Studi Perikanan kecuali yang sedang dilakukan adalah analisis struktur protein dan protein immunogenik coat protein WSBV yang sedang dilakukan untuk hibah pasca.**

**3.2. Alur penelitian yang telah dan akan dilakukan oleh Dr. A.T. Soelih  
Estupangesti bekerjasama dengan Program Studi Perikanan Unair**



**Gambar 1. Alur penelitian VNN yang telah dan akan dilakukan di Unair**

**IV. Matrik Penelitian**

Bidang : Ketahanan Pangan  
 Judul Penelitian : Analisis Struktur Protein Dan Penentuan Protein Immunogenik Viral Nervous Necrosis : Pencarian Prophylaxis Untuk Pencegahan Tingginya Mortalitas Kerapu *Epinephelus fuscoguttatus*  
 Topik Penelitian : Vaksinasi larva ikan kerapu dengan vaksin oral  
 Program : Insentif Riset Dasar

Tabel 1. Matrik penelitian

No	URAIAN	TAHAPAN KEMAJUAN PELAKSANAAN		
		Tahun I	Tahun II	Tahun III
1	Masalah Penelitian	Pemurnian virus, uji patogenitas, test neutralisasi, amplifikasi dengan PCR, peran inang selain kerapu, karakterisasi struktur protein VNN.	Penentuan protein immunogenik, pemurnian protein, protein antigenik dominan, uji immunogenitas dan antigenitas	Uji lapangan proteksi immunogenik kerapu terhadap infeksi VNN
2	Model dan Variabel Penelitian	Survey lapangan dilanjutkan eksperimen murni, analisis karakter	Eksperimen murni dengan tahap penting adalah penentuan	Eksperimen murni, apakah proteksi protein immunogenik terhadap

		VNN isolat lokal diterangkan diatas	protein immunogenik serta evaluasi proteksinya terhadap ikan kerapu	ikan kerapu di laboratorium juga mempunyai proteksi yang sebenarnya di lapangan
3	Teknik Pengumpulan Data	Sampling random sistematis	Sampling random sistematis	Sampling random sistematis
4	Teknik Pengolahan Data	Analisis komparasi dan korelasi	Analisis komparasi dan korelasi	Analisis komparasi dan korelasi
5	Hasil Analisis dan Interpretasi Data	Karakter VNN mungkin sama dengan isolat internasional dan mempunyai sebaran inang yang luas	Protein immunogenik mampu memberikan proteksi terhadap ikan kerapu	Protein immunogenik memberikan proteksi terhadap infeksi VNN di lapangan atau lahan yang sebenarnya
6	Generalisasi dan rekomendasi	Mendapatkan struktur atau kekerabatan isolat lokal dan internasional serta sebaran inang pada lingkungan laut yang sebenarnya	Mendapatkan protein yang immunogenik yang bisa memberikan proteksi terhadap infeksi VNN pada skala laboratorium	Mendapatkan vaksin VNN yang bisa diberikan secara oral dengan dicampur pakan dan mempunyai daya proteksi yang tinggi



## V. STUDI KEPUSTAKAAN

### 5.1. *Viral Nervous Necrosis* Penyebab Kematian Tinggi Kerapu

Viral Nervous Necrosis (VNN) adalah penyakit yang sangat berbahaya karena menimbulkan kematian yang tinggi pada kerapu terutama pada stadia larva dan juvenil. Di Jepang dilaporkan oleh Yoshikoshi dan Inoue (1990) menyebabkan kematian massal pada Japanese parrotfish *Oplegnathus fasciatus*. Kemudian VNN disebut dengan nama fish encephalitis (Breuil *et al.*, 1991) atau viral encephalopathy and retinopathy atau VER (Munday *et al.*, 1992) yang menyebabkan kerugian besar pada panti pembenihan dan pembesaran finfish. Penyebab kematian tersebut dikenal dengan piscine nodaviruses termasuk beberapa tipe genome (Nishizawa *et al.*, 1997). Ikan yang terinfeksi begitu banyak, dengan perkiraan 19 spesies dalam 10 famili ikan (Munday and Nakai, 1997).

Di Indonesia, infeksi VNN dilaporkan pertama kali pada barramundi *Lates carcarifer* pada panti pembenihan di Jawa Timur pada tahun 1997 (Zapran *et al.*, 1998). Kemudian menyebar ke panti pembenihan barramundi di Bali pada tahun 1998, kemudian pada tahun yang sama beberapa panti pembenihan berhasil membudidayakan humpback grouper *Epinephelus fuscoguttatus*. Tetapi kematian absolut terjadi di Bali pada tahun itu juga sehingga tidak ada benih yang hidup. Penyakit yang disebabkan oleh VNN digolongkan menjadi beberapa tingkatan kehidupan ikan ialah induk, larva, juvenil dan grow-out.

Tabel 2. The main disease of humpback grouper in Indonesian hatchery and farms on the difference stadium of liver

Fish speceis	Larvae/juvenile	Grow-out	Broodstocks
Humpback grouper <i>Epinephelus fuscoguttatus</i>	VNN	VNN Parasite (capsalid monogenean)	Parasite ( <i>Cryptocaryon</i> , <i>Trichodina</i> , <i>Caligus</i> , capsalid monogenean, gill trematodes, nematodes, cestodes)

Coral trout <i>Plectropomus leopardus</i>	Not produced	Bacterial gill Disease (gill rot)	Parasite (capsalid monogenean, nematodes, <i>Lepheophtheirus</i> )
Orange-spotted grouper <i>Epinephelus coioides</i>	VNN	Vibriosis Iridovirus	Parasite (capsalid monogenean, gill trematodes, <i>Lepheophtheirus</i> )
Tiger grouper <i>Epinephelus fuscoguttatus</i>	VNN	Virbiosis Parasite (capsalid monogenean)	Parasite (capsalid monogenean, gill trematodes, <i>Lepheophtheirus</i> )
Marbled grouper <i>Epinephelus polyphkadion</i>	VNN	Not produced	Parasite (capsalid monogenean)
Brown-spotted grouper <i>Epinephelus malabaricus</i>	Not produced	Not produced	Parasite (capsalid monogenean, <i>Lepheophtheirus</i> )

**a. Broodstock**, penyakit induk kerapu yang terdiri dari 6 spesies ikan adalah humpback grouper *Epinephelus fuscoguttatus*, Coral trout *Plectropomus leopardus*, Orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, Tiger grouper, *Epinephelus fuscoguttatus*, Marbled grouper, *Epinephelus polyphkadion*, Brown-spotted grouper *Epinephelus malabaricus*. Penyakit utama yang menyerang induk adalah ektoparasit termasuk diantaranya *Cryptocaryon irritans*, *Trichodina*, *Benedia* spp., *Caligus* sp. , *Lepheophtheirus* sp., *Neobenediagirellae*, *Haliotrema* sp., *Pseudorhabdocynocus*. Diantara parasit tersebut *Cryptocaryon irritans* menyebabkan kematian yang tinggi tetapi , *Benedia* spp. dan *Neobenediagirellae* adalah parasit yang sering diketemukan (Koesharyani *et al.*, 1999). Humpback grouper dan coral trout juga terinfeksi oleh parasit internal misalnya nematoda dan cestoda, tetapi pathogenitasnya belum diketahui. Infeksi bakteri kadang dijumpai pada beberapa spesies, dan kematian pada induk yang disebabkan oleh VNN belum pernah diketemukan.

**b. Larva dan juvenil**, penyakit yang sering menyerang ikan kerapu pada stadium ini adalah VNN yang menyebabkan kematian massal.



Sedangkan coral trout dan brown-spotted grouper kemungkinan kedepan bisa juga terinfeksi karena diproduksi pada tempat yang sama.

c. *Grow-out fish*, *Vibrio* sp. menyerang kerapu yang dibudidayakan pada jarring apung di Indonesia pada tahun 1998-2000. Vibriosis pada orange-spotted grouper ditandai dengan adanya luka pada permukaan tubuh ikan, sedangkan fingerling grouper terjadi pembengkakan disertai pendarahan pada permukaan tubuh. *Vibrio* sp. yang diisolasi mempunyai koloni berwarna kuning pada media TCBS. Sedangkan coral trout, gill rot sering sekali diketemukan dan menyebabkan kematian yang tinggi dan bakteri tersebut termasuk didalam gliding bacteria. Akhir-akhir ini infeksi iridovirus diketemukan pada orange-spotted grouper pada budidaya jarring apung di Sumatera Barat dengan kematian mencapai 80-90 persen. Iridovirus kemungkinan akan menjadi penyakit yang potensial pada budidaya kerapu di jarring apung dikemudian hari. Infeksi parasit yang disebabkan oleh capsalid monogenean dan trematoda insang juga sering diketemukan pada budidaya kerapu di jarring apung.

## 5.2. Aetiology Viral Nervous Necrosis

Fish Nodavirus berbentuk icosahedral, tidak mempunyai envelope dengan diameter rata-rata 25 nm atau dengan kisaran 20-34 nm. Inti electron berukuran 13-21 nm, dikelilingi oleh lapisan jernih 5 nm. Virion terikat dengan membrane oleh endoplasmic reticulum atau bebas didalam sitoplasma, mungkin ada dalam susunan paracrystalline (Glazebrook *et al.*, 1990 ; Breuil *et al.*, 1991; Block *et al.*, 1991; Boonyaratpalin *et al.*, 1996; Grotmol *et al.*, 1997). Sel yang terinfeksi virus sering teridentifikasi sebagai neurons, astrocytes, oligodendrocytes dan microglia (Yoshikoshi and Inoue, 1990; Bloch *et al.*, 1991; Grotmol *et al.*, 1997) yang selalu ditandai dengan luka pada saraf dan gejala kelainan/penyakit saraf pada ikan yang sakit. Tetapi pada Atlantic halibut, Grotmol *et al.* (1997) menemukan partikel virus pada sel endothelial, sel pilar, limfosit yang menempel dengan endocardium, cardiac myocytes and epicardial cells (Munday *et al.*, 1992; Le Breton *et al.*, 1997). Fish Nodavirus sekarang diklasifikasikan kedalam genus

*Betanovirus* yang masuk kedalam *Nodaviridae* (Ball *et al.*, 2000) yang berbeda dengan nodavirus dari insek ialah alphanodavirus. Nama virus secara resmi adalah barfin flounder nervous necrosis (BFNNV), *Dicentrarchus labrax* encephalitis virus (DIEV), Japanese flounder nervous necrosis virus (JFNNV), *Lates carcarifer* encephalitis virus (LcEV), redspotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV), striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) and tiger puffer nervous necrosis virus (TPNNV). Selanjutnya dua nama sementara adalah Atlantic halibut nodavirus (AHNV) dan Malabar grouper nervous necrosis virus (MGNNV).

#### **a. Ikan yang mudah terinfeksi, usia dan stadia**

Deteksi dengan PCR pada ikan yang terinfeksi selama kurun waktu 1998-2000 adalah VNN. Ikan yang mudah terserang adalah humpback grouper yang berukuran 10 hari – 4 bulan, tetapi kematian massal terjadi pada usia 20-30 hari. Tetapi kematian menurun jika ikan berusia 1 tahun, sedangkan pada spesies lain kematian massal terjadi pada usia yang sama. VNN diketahui mempunyai inang yang sangat luas tetapi usia ikan yang terinfeksi tertentu. Ada 9 spesies yang rentan terhadap infeksi VNN, hal ini menunjukkan bahwa grouper sensitive terhadap Nodavirus. VNN akan menjadi penyakit utama didalam produksi benih grouper, karena ikan yang gampang terserang adalah larva dan juvenil (Mori *et al.*, 1991; Mori *et al.*, 1992; Munday and Nakai, 1997; Chi *et al.*, 1997) kecuali sevenband grouper di Jepang (Fukuda *et al.*, 1996). Kerapu yang dibudidayakan pada laut yang mempunyai aliran air yang terus meneruspun terinfeksi oleh Nodavirus. Lokasi ayang ideal dengan kualitas air yang bagus, permukaan air yang tenang dan gelombang yang kecil merupakan tempat yang ideal untuk budidaya kerapu. Pada ikan dengan stress yang tinggi kematian ikan sangat besar jika disertai dengan infeksi parasit capsalid monogenean. Laporan terakhir oleh Munday *et al* (2002) lebih dari 32 spesies ikan dari 16 famili telah terinfeksi. Di Australia, ikan utama yang dibudidayakan misalnya barramundi telah terinfeksi dan menyebabkan kematian massal pada larva dan juvenil (Munday *et al.*, 1992). Tetapi dua contoh ikan infeksi



alami pada ikan air tawar ditemukan di Australia, Hyatt menemukan histology berupa luka khusus yang disebabkan oleh infeksi VNN dan partikel seperti-virus pada otak catfish Australia didekat jarring apung untuk budidaya barramundi di air tawar dan Moody yang mengisolasi nodavirus dari ikan yang menunjukkan gejala klinis VER pada sleepy cod in air tawar tetapi tidak berdekatan dengan budidaya barramundi. VER bisa ditularkan secara buatan pada beberapa spesies ikan air tawar, misalnya Macquarie perch, Murray cod, silver perch (Glazbrook, 1995), golden perch, sleepy cod, barco grunter, tetapi ikan air tawar tidak sebegitu sensitive dibandingkan dengan barramundi. Grotmol et al (1997) melaporkan bahwa Atlantic salmon yang terinfeksi penyakit vascular misalnya cardiac myopathy syndrome ditemukan partikel virus mirip dengan betanovirus pada jaringan yang terinfeksi.

#### **b. Gejala klinis ikan yang terinfeksi**

Gejala klinis ikan yang terserang disajikan pada tabel 2 dibawah. Sebelum usia 20 hari ikan tidak menunjukkan gejala apapun kecuali hilangnya nafsu makan. Pada usia 20-45 hari ikan yang terinfeksi terlihat lemah dan sering berenang didekat permukaan air, dan mulai terjadi kematian ikan. Sesudah 45 hari sampai 4 bulan ikan yang sakit akan berada didasar kolam kemudian diikuti dengan kematian. Setelah usia ikan 4 bulan ikan yang terinfeksi berada didekat permukaan air, karena kemungkinan ikan terjadi kelainan pada gelembung renang. Tetapi kebanyakan ikan yang terinfeksi adalah larva dan juvenil, tetapi sekarang ikan yang dewasa dan siap panenpun, khususnya European seabass (Le Breton *et al.*, 1997), grouper (Fukuda *et al.*, 1996) dan Atlantic halibut (Aspehaug *et al.*, 1999). Khusus untuk grouper dan sea bass penyakit tersebut lebih akut jika suhu air meningkat (Le Breton *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1998). Ikan ayang sakit akan mengalami ketidaknormalan gerak, kontrol gelembung renang, dan perubahan warna. Pada beberapa ikan akan terjadi arah renang yang tidak beraturan, misalnya renang searah spiral (Mori *et al.*, 1991; Mori *et al.*, 1992; Breuil *et al.*, 1991).

### c. Perubahan histopathology pada ikan

Terjadi vakuolisasi dan degenerasi dari sel saraf pada otak pada larva dan juvenil. Ikan yang sembuh sesudah infeksi VNN pada usia 5 bulan atau lebih tidak terjadi perubahan histopathology walaupun positif terinfeksi VNN setelah konfirmasi dengan PCR. Gejala tersebut dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Gejala klinis kerapu dan usia ikan yang rentan terhadap infeksi VNN di Indonesia

Usia ikan	Rentan terhadap virus	Gejala klinis
Larvae (10 d-20 d)	++	Inappetence
Post larvae (21 d -30d)	++	Weakened swimming
Juvenil/fingerling (31 d – 120 d)	++	Resting at bottom
Grow-out (121 d)	+	Floating near the water surface
Induk	-	-

Catatan - : Tidak ada yang mati, + : Kematian terjadi, ++ : Kematian tinggi

Hyperinflasi dari gelembung renang dilaporkan terjadi pada barramundi, European sea bass dan striped jack (Breuil *et al.*, 1991; Mori *et al.*, 1992). Pada larva halibut dan barramundi menjadi pucat (Galzebrook *et al.*, 1990; Grotmol *et al.*, 1997), tetapi grouper, halibut juvenil, Sdea bass Eropa dan turbot menjadi lebih gelap, dan akhirnya terjadi kematian massal, khususnya larva (Munday and Nakai, 1997).

### d. Distribusi penyakit diseluruh dunia

VER telah dilaporkan dari seluruh benua kecuali di Afrika, tetapi mayoritas laporan tersebut berasal dari negara yang mempunyai intensif mariculture. Tetapi di Australia VER telah dilaporkan di Queensland, Northern territory dan Tasmania (Munday *et al.*, 2002). Sedangkan di Indonesia penyakit tersebut sudah ada, dan terdeteksi mulai tahun 1998.

**Tabel 4. The main clinical signs of fish infected with viral encephalopathy and retinopathy of larval dan juvenile fish**

Fish species	Earliest occurrence of disease	Usual onset of disease	Latest occurrence	Mortality rate	Highest mortality rate
Barramundi/Asian sea bass	9 dph	15-18 dph	>24	50-100%/month	100% <1 month
European sea bass	10	25-40	12 month and older	10%/month	
Redspotted grouper	14	9-10	<40	80	Up to 100%
Brownspotted grouper		20-50		50-80	
Striped jack	1	1-4	<20	100	
Japanese parrotfish	6-25		<40		Up to 100%
Halibut		60-70	Adult		Up to 100%
Japanese flounder	35	25		100	
Turbot	<21		Bodyweight 50-100 mg		Up to 100%

dph : day post hatch

### 5.3. Epidemiology dari Viral Nervous Necrosis

Epidemiology dari VNN pada striped jack telah didokumentasikan dengan baik, karena penyakit tersebut mempunyai kesamaan dengan spesies lain (Munday *et al.*, 2002). Penyakit tersebut menular secara vertikal dengan berbagai macam cara dan kadang disertai dengan transmisi lateral. Resistensi betanodavirus terhadap kondisi lingkungan misalnya pH 2-9 (Frerich *et al.*, 1996) dan disimpan dalam air laut pada suhu 15°C lebih dari setahun (Frerich *et al.*, 2000) kelihatannya bisa menguatkan transmisi lateral. Tetapi penularan lewat aerosol tidak bisa dan tidak ada data penularan lewat fomite. Karena betanodavirus dapat hidup pada air laut 15°C kemungkinan dia bisa hidup pada ikan yang sudah mati. Produk hasil perikanan mempunyai kemampuan untuk

menyebarkan virus tersebut ke tempat lain yang belum terinfeksi. Betanovirus bisa dimatikan pada pemanasan 60°C selama 30-60 menit (Arimoto *et al.*, 1996; Frerichs *et al.*, 2000).

#### 5.4. Penularan Viral Nervous Necrosis

**a. Penularan secara vertikal** : Penularan secara vertikal dilaporkan oleh Arimoto *et al* (1992) yang mendeteksi virus ada pada 65 persen induk striped jack. Breuil *et al* (2000) melaporkan bahwa 17 persen ikan liar dan 18 persen ikan budidaya European sea bass adalah seropositif dengan ELISA, juga Huang *et al* (2001) menemukan bahwa 9 persen barramundi yang dijual di pasar adalah seropositif. Perlu diketahui bahwa virus tidak diketemukan pada organ reproduksi selamanya dan bisa diketemukan di organ tersebut jika ikan dalam kondisi stress berat, misalnya pada waktu pemijahan (Nguyen *et al.*, 1997).

**b. Penularan lateral** : Penularan secara lateral dapat disebabkan oleh padat penebaran, suhu ambient dan virulent dari nodavirus yang diisolasi dari spesies tertentu. Arimoto *et al* (1993) menemukan bahwa untuk striped jack VNN tidak menyebar jika perbandingan antara ikan terinfeksi dengan naïve fish 1:100 atau kurang. Pada ikan yang telah dewasa penyakit lebih disebabkan karena meningkatnya suhu perairan (Tanaka *et al.*, 1998).

**c. Nodavirus cross-infectivity** : Di Australia perhatian ekstra diperlukan karena kemungkinan nodavirus dari barramundi bisa menular di lingkungan air tawar pada juvenil yang dibudidayakan di air setengah asin. Variasi sensitifitas terhadap LcEV telah dilaporkan pada ikan catfish Australia, Macquarie perch, Murray cod, silver perch (Glazbrook, 1995), golden perch, sleepy cod, Barco grunter. Tetapi sampai sekarang VNN tersebut belum eksis pada air tawar.

Pada prinsipnya dua cara penularan virus, ialah melalui air yang disebut dengan horizontal transmission dan melalui induk ke anak atau vertical transmission. Sebagian besar udang yang ditangkap untuk dijadikan induk telah tercemar oleh virus bahkan di Jepang 13.3 - 55 % induk yang ditangkap di Propinsi Kyushu telah terinfeksi oleh PRDV

(White spot) (Takahashi *et al.*, 1998). Sedangkan di Taiwan (Liao *et al.*, 1990) induk betina yang tertangkap di perairan Taiwan 33 % terkontaminasi virus pada tahun 1987 dan mencapai puncaknya (100%) pada tahun Desember 1988 dan Oktober 1989. Sedangkan induk yang diimpor 40% sudah tercemar oleh MBV. Di Philipina infection rate dari induk adalah 67.7 - 100 % tergantung dari setiap propinsi dilakukan sampling (Navitidad and Lightner, 1992). Oleh sebab itu skrining induk bebas virus amatlah penting sebagai awal pencegahan pemularan udang di tambak. Pada percobaan penularan dari udang yang sakit MBV dapat menular terhadap udang yang sehat dalam masa inkubasi 24 jam (Lightner, 1996). Stress yang disebabkan oleh beberapa bahan kimia dan pestisida yang ada di perairan dapat menyebabkan udang menjadi rentan terhadap MBV. Penularan lewat induk ke anak bisa dicegah dengan membuang tahi/feces udang yang terkontaminasi MBV dan mencucinya dengan air laut yang bersih. Karena infeksi MBV terjadi di saluran pencernaan oleh sebab itu cara tersebut diatas bisa dipakai. Penularan dari induk ke anak tidak ditularkan melalui proses genetik, sehingga sebetulnya penularannya lebih mudah diatasi. Liao *et al.* (1990) melaporkan bahwa kontaminasi MBV di hatchery dapat dikurangi dengan membasuh telur atau nauplii sebelum dipindah ke tanki pemeliharaan dengan menggunakan air laut yang bersih. Pada bulan Maret-Oktober 1993 di Jepang terjadi kematian massal udang *P. japonicus* pada stadia juvenil yang diimport dari China (Nakano *et al.*, 1994). Penularan penyakit tersebut terjadi secara horizontal melalui udang yang diimpor dari China.

### **5.5. Faktor eksternal sebagai pemicu terjadinya penyakit**

Stress dialami ikan jika sudah tidak sanggup menyesuaikan diri dengan lingkungan (Ellis, 1989). Stressor dapat berupa berbagai macam misalnya kepadatan yang tinggi, adanya mikroba diair, berbagai macam polusi, perubahan suhu yang mendadak. Perubahan yang terjadi karena response terhadap lingkungan disebut General Adaptation Syndrome (GAS). Output-nya berupa adrenocorticotrophic



hormone (ACTH) dan corticosteroid dan menghasilkan penyimpanan ion  $\text{Na}^+$  dan  $\text{Cl}^-$  sedangkan ion  $\text{K}^+$  dibuang, akhirnya menyebabkan peningkatan blood glucose dan metabolisme nitrogen. Efek dosis kecil ACTH terhadap jumlah circulating leucocyte mirip efek yang ditimbulkan oleh cold shock. Level plasma cortisol dipakai secara umum sebagai index stress pada ikan salmon (Barton and Iwama, 1991). Level plasma cortisol pada ikan yang tidak stress sangat rendah ( $<5.0 \text{ ng ml}^{-1}$ ) (Pickering and Pottinger, 1989) tetapi akan naik beratus kali dalam kondisi stress (Sumpter *et al.*, 1985). Kenaikan level cortisol menunjukkan *stress-induced immuno suppression* (Maule *et al.*, 1987), memperlambat pertumbuhan (Pickering, 1990) dan kerusakan system reproduksi (Carragher *et al.*, 1989; Pottinger and Pickering, 1990). Plasma glucose dan cortisol hanya menunjukkan acutes stress tetapi bukan kondisi yang kronis. Injeksi cortisone terhadap ikan menunjukkan keterlambatan infiltrasi leucocyte pada luka dan inhibisi proses penyembuhan luka.

Pada percobaan yang dilakukan oleh Mushiake *et al.* (1985) menyatakan bahwa kemampuan leucocyte dari belut Jepang *Anguilla japonica* yang distresskan dengan Copper menurun. Produksi Striped jack di Jepang pada tahun 1989 diatas 830 ribu tetapi pada tahun 1990 tidak berproduksi sama sekali karena overcrowding sehingga memicu Viral Necrosis Virus (VNN) (Arimoto, personal communication). Stress juga disebabkan oleh polusi perairan di perairan, yang mengakibatkan menurunnya jumlah leucocyte dan thrombocyte (McLeay and Gordon, 1977). Japanese eel yang distresskan dengan ferric ammonium citrate menjadikan eel sangat peka terhadap *Vibrio anguillarum* (Nakai *et al.*, 1987). Stress yang terjadi di udang dapat menyebabkan jumlah hemocyte menurun (Hennig *et al.*, 1998).

## 5.6. Pencegahan virus dengan sirkulasi tertutup

Sistem sirkulasi air laut tertutup adalah suatu sistem yang tidak ada pembuangan dan pemasukan air, air yang telah dipakai mendapat

intensive treatment untuk bisa digunakan lagi. Keuntungan memakai sistem ini masuknya ikan liar, parasit dan bakteri bisa dikontrol. Obat dan pakan bisa diberikan secara efisien terhadap udang sehingga pertumbuhannya cepat dan merata. Karena sistem ini bisa dikontrol sehingga penyakit bukan merupakan masalah (Landau, 1992). Air laut yang masuk pertama kali diendapkan pada kolam pengendapan, selama 72 jam dan dimatikan semua ikan dan kepiting atau binatang lainnya yang masuk bersama dengan air laut. Bisa dilakukan dengan pemberian formalin dengan harapan walaupun bakteri tidak mungkin mati semuanya, tetapi beberapa inang perantara sebagai tumpangan virus bisa mati.

Dengan sistem sirkulasi ini transmisi horizontal bisa dicegah dengan terbunuhnya inang perantara. Beberapa virus tidak bisa tahan lama hidup di air laut, tetapi untuk White spot diseases virus bisa hidup diluar inang sampai sekitar 60 hari (Takahashi *et al.*, 1998) dalam percobaan laboratorium. Sirkulasi air tertutup telah dipakai oleh beberapa petambak di Jawa Timur, hanya sebagian yang berhasil sedangkan yang lainnya kurang menggembirakan hasilnya. Ketidak berhasilan ini disebabkan para petambak kurang mematuhi kaidah budidaya yang benar dan belum adanya standar budidaya udang dengan teknologi intensif.

Walaupun memakai sirkulasi tertutup jika tidak dibarengi dengan pemakaian benih bebas penyakit tidak bisa mencegah timbulnya penyakit. Pemakaian benih bebas virus adalah untuk mencegah penularan secara horizontal dari induk ke anak. Jika benih yang tercemar masih saja dimasukkan pemakaian sistem sirkulasi tertutup tidak banyak berguna. Benih sebagai inang perantara sangat rentan terhadap stress sehingga sewaktu-waktu terjadi penyakit di tambak.

Tandon karantina berfungsi untuk membebaskan air yang masuk terhadap inang perantara dengan beberapa tingkatan. Pertama dengan menggunakan filter dibuat dari nylon sebanyak 2-3 lapis, kemudian ditingkat kedua organisme yang masih lolos dengan filter tersebut dibasmi dengan klorin 30 ppm atau difterex 0.5 ppm. Air yang masuk

tersebut diendapkan selama minimal 72 jam. Jika terjadi penguapan bisa diencerkan dengan pemberian air sumur yang relatif bebas penyakit. Tandon resirkulasi pada prinsipnya mempunyai 3 fungsi : pengendapan, biofilter, pemulihan /aerasi. Perbandingannya adalah 75 % petak udang dan 25 % kolam resirkulasi dan karantina dengan kedalaman 1.5 m

### **5.7. Pengurangan kandungan bahan organik di kolam**

Bahan organik yang dihasilkan dari sisa pakan udang akan larut didalam air dan akan terkumpul didalam kolam. Bahan organik yang berlebih akan menimbulkan permasalahan karena bahan organik yang berlebih adalah habitat beberapa bakteri patogen terhadap udang. Dengan memperhatikan pemberian pakan yang tepat tidak akan terjadi kelebihan  $\text{NH}_3\text{N}$  dan  $\text{NO}_2$  didalam air. Beberapa tumbuhan dan hewan dapat menyerap ammonia yang terdapat di air dapat juga dipakai sebagai filter biologi. Biofilter yang dipakai adalah kerang hijau, bandeng 2 ekor/ $\text{m}^2$ , nila atau belanak 3 ekor/ $\text{m}^2$  dan rumput laut (Winarto, 1998). Bakteri *Vibrio* akan tumbuh subur pada air yang mengandung bahan organik yang tinggi (Austin dan Austin, 1988) begitu pula *Aeromonas* (Inglis *et al.*, 1993). Selain hal tersebut kandungan bahan organik yang tinggi dapat menyebabkan plankton menjadi bloom dan mengganggu pertumbuhan udang. Oleh sebab itu air yang mengandung bahan organik yang tinggi perlu dikurangi dengan cara mengalirkan pada kolam yang berisi ikan nila yang kemudian kita sebut sebagai filter biologi. Fungsi kolam ini sebagai pengurang bahan organik dari air pemeliharaan udang karena bahan organik yang melimpah akan digunakan oleh plankton untuk tumbuh dan sebagai makanan utama dari ikan nila. Ammonia dan beberapa gas lain sebagian bisa diuapkan di kolam aerasi. Selain hal tersebut suspended matter akan diendapkan pada kolam ini. Filter biologi ini tidak bisa untuk menghilangkan padatan yang ada didalam air, tetapi gunanya adalah untuk mengubah zat yang berbahaya misalnya ammonia menjadi zat yang tidak berbahaya misalnya nitrat. Untuk keperluan tersebut kedalam filter kolam bisa

ditambahkan beberapa bakteri misalnya *Nitrosomonas* sp untuk membantu nitrifikasi didalam air (Boyd, 1982). Filter biologi yang utama adalah autotrophic bacteria walaupun algae, yeast dan protozoa dan kadang hewan yang kecil lain membantu mengubah limbah dari badan air.

### **5.8. Penurunan potensi lahan budidaya**

Tanah memegang peranan penting dalam budidaya udang, dan hampir semua tanah cocok untuk budidaya udang, tetapi yang paling bagus adalah yang banyak mengandung tanah liat untuk konstruksi kolam. Tanah yang mengandung banyak bahan organik tidak bagus untuk kolam karena untuk penguraian bahan organik tersebut membutuhkan banyak oksigen. Potensi redox dari tanah atau air menunjukkan tingkat oksigenasi atau reduksi dari tanah. Jika DO tinggi maka nilai redox dari air 500 mv, jika nilai redox turun dibawah 340 mv maka DO akan menjadi 2-3 mg/l dan nitrit mulai terdapat di perairan. Pada nilai redox 200 mv DO menjadi 0 mg/l dan beberapa iron compound mulai nampak dan tanah menjadi berwarna hitam. H<sub>2</sub>S akan mulai nampak jika nilai redox turun sampai 100 mv. Lapisan atas tanah berwarna coklat menunjukkan adanya proses oksidasi, sedangkan lapisan berwarna hitam merupakan tanda reduksi. Permukaan tanah tersebut biasanya diantara 1 - 5 cm. Lapisan tanah yang keras lebih memudahkan penanganan sisa bahan organik, karena bahan organik yang tersisa tidak gampang masuk kedalam pori tanah.

Keasaman yang dikeluarkan oleh tanah biasanya akan dinetralsisir oleh air. Jika tanah tidak asam sekali maka pemberian beberapa kapur tidak diperlukan lagi. Pengambilan sedimen dan untuk mengoksidasi bahan organik yang tersisa dilakukan dengan penambahan beberapa mikroorganisme pengurai, selain hal tersebut dimaksudkan untuk menetralkan tanah.



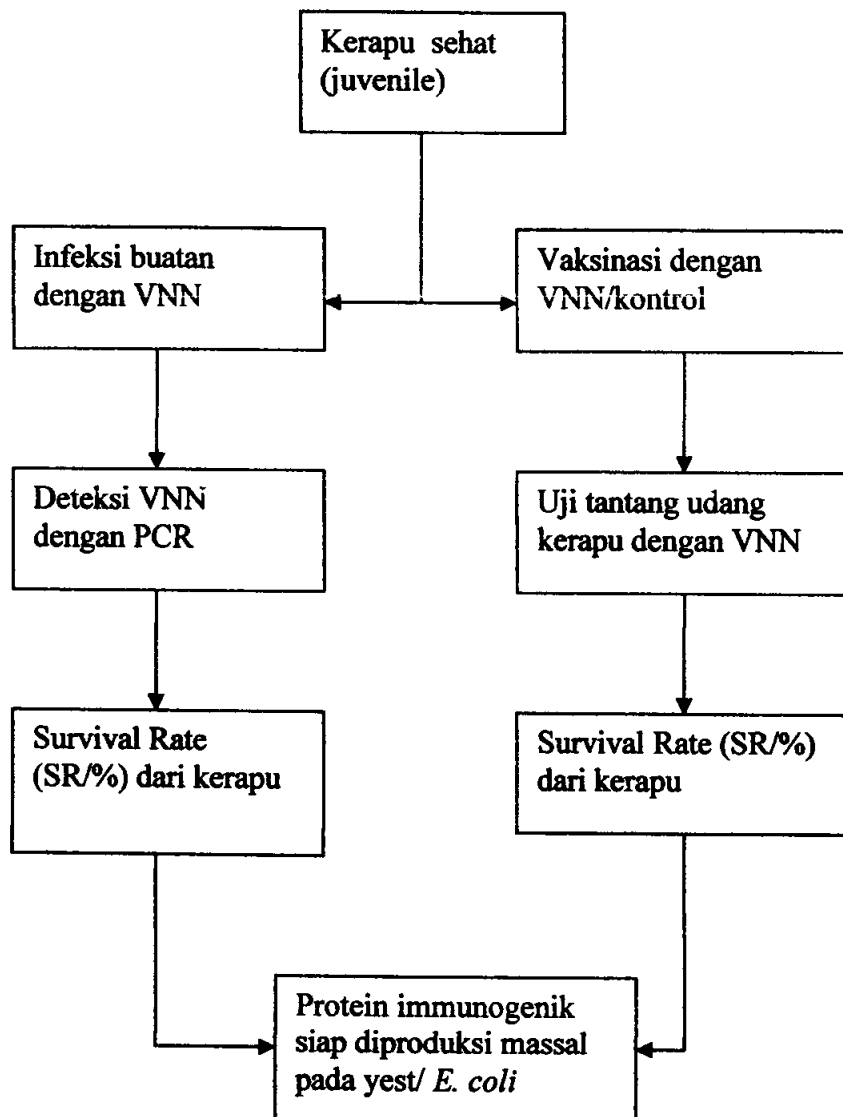
## VI. METODE PENELITIAN

Kerapu yang sakit dikumpulkan dari Balai Budidaya Air Payau Situbondo di Jawa Timur, konfirmasi dilakukan dengan PCR. Kerapu kemudian disimpan pada  $-80^{\circ}\text{C}$  sampai digunakan untuk penelitian. Deteksi kerapu selanjutnya dilakukan dengan Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk mengetahui dengan benar bahwa kematian kerapu memang disebabkan oleh VNN. Penelitian ini dilakukan tiga tahun dengan tahapan sebagai berikut:

**Tahun III** : Uji lapangan proteksi imunogenik kerapu terhadap infeksi VNN

## Penelitian Tahun Ketiga

### *Uji proteksi protein immunogenik VNN di lapangan*



Gambar 3. Alur kerja tahun ketiga uji lapangan protein immunogenik pada ikan kerapu

#### *e. Pembuatan Vaksin VNN*

Virus yang telah diisolasi dari kerapu kemudian dimatikan untuk dibuat vaksin. Vaksin dibuat dengan cara sebagai berikut, larutan virus diukur konsentrasinya kemudian dipanaskan pada suhu 60°C selama 10 min untuk membunuh virus, didinginkan pada suhu ruang, kemudian disimpan pada suhu 4°C sampai digunakan untuk penelitian selanjutnya.

**b. Vaksinasi VNN pada kerapu**

Sebanyak 500 ekor kerapu divaksin kemudian diuji tantang dengan VNN. Ikan kerapu masing-masing dibagi menjadi 3 kelompok yaitu : Kelompok pertama (I) : diinfeksi dengan homogenat dosis 0,1 ml secara injeksi; kedua (II) : dicelup pada larutan vaksin VNN dan ketiga (III) sebagai kontrol diberikan PBS. Semua kelompok diamati, selama 1 tahun, dari semua kelompok hewan coba di lakukan pengambilan darah untuk pengambilan serum. Serum darah kemudian akan diperiksa produksi antibody terhadap VNN.

**c. Pengamatan Hasil Vaksinasi**

Kerapu yang telah divaksin akan diamati selama 1 tahun dengan parameter adalah mortalitas keseluruhan kerapu, jumlah yang hidup dan pencatatan kualitas air selama penelitian berlangsung. Juga dicatat gejala klinis ikan yang mati, *moribund fish* (sekarat) dan pengamatan lingkungan lain yang berperan terhadap perubahan kualitas air.

## VII. HASIL DAN PEMBAHASAN

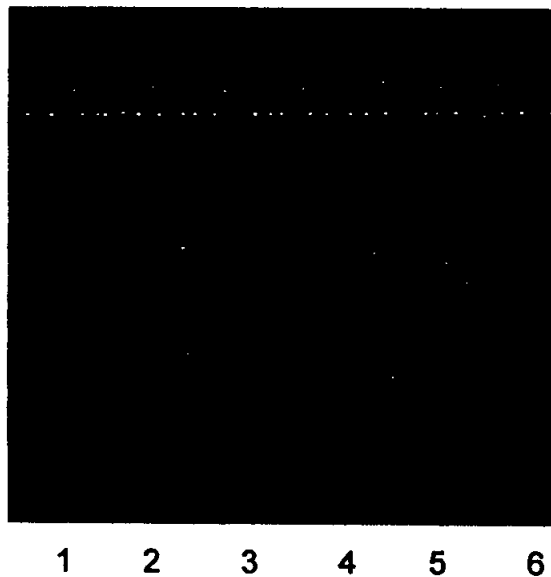
### 7.1. Pengumpulan sample dan skrining VNN

Ikan kerapu kecil yang terinfeksi oleh VNN sebagai sample yang akan digunakan untuk penelitian selanjutnya telah didapatkan dan disimpan pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  (deep freezer). Ikan yang terinfeksi masih berukuran kecil dengan panjang sekitar 5-7.5 cm dari Balai Budidaya Air Payau (BBAP) Situbondo, karena ikan dengan ukuran tersebut diatas atau dengan ukuran yang lebih kecil lagi kematiannya paling tinggi. Pada ikan yang sedikit besar atau berusia diatas 70 hari kematian yang disebabkan oleh VNN ataupun bakteri kematiannya rendah. Di Indonesia, infeksi VNN dilaporkan pertama kali pada barramundi *Lates carcarifer* pada panti pembenihan di Jawa Timur pada tahun 1997 (Zapran *et al.*, 1998). Kemudian menyebar ke panti pembenihan barramundi di Bali pada tahun 1998, kemudian pada tahun yang sama beberapa panti pembenihan berhasil membudidayakan humpback grouper *Epinephelus fuscoguttatus*. Tetapi kematian absolut terjadi di Bali pada tahun itu juga sehingga tidak ada benih yang hidup. Penyakit yang disebabkan oleh VNN digolongkan menjadi beberapa tingkatan kehidupan ikan ialah induk, larva, juvenil dan grow-out. Ikan tersebut dikumpulkan dari Propinsi Bali dan Kabupaten Situbondo, keduanya setelah dilakukan skrining dengan PCR positive untuk VNN. Ikan yang dari Bali sudah agak besar dengan panjang sekitar 15 cm dan terinfeksi berat VNN, sedangkan dari Situbondo berukuran masih kecil dengan panjang sekitar 5-7.5 cm dan terinfeksi ringan VNN. Hanya yang terinfeksi berat dari Bali ikan kerapu terlihat berubah warna sedangkan yang dari Situbondo terlihat seperti normal atau tanpa tanda-tanda kelainan apapun. Kedua sample diatas kemudian disimpan pada deep freezer sampai digunakan untuk penelitian selanjutnya.

Sebenarnya pada infeksi alami gejala klinis sering terlihat dengan ciri utama adalah hilangnya nafsu makan ikan, terjadi perubahan warna pigmen bias menjadi lebih gelap atau menjadi lebih terang, terjadi hyperinflation dari gelembung renang, ikan menjadi hiperaktif dan terjadi



ketidak abnormalan renang. Jika dilihat perubahan patologi secara mikroskopis terjadi luka misalnya ada *cellular vacuolation* dan degenerasi sistem saraf pusat, juga terjadi kerusakan pada ganglia dan *peripheral nervous system* (Munday and Nakai 1997). Telah lama diketahui bahwa induk dari beberapa ikan bertulang sejati menjadi reservoir dari nodavirus dan menularkannya dengan cara menularkan virus lewat cairan gonad dan kemudian menular pada keturunannya (Mushiake *et al.*, 1994), walaupun untuk prophylaxis dapat dilakukan dengan skrining induk yang terinfeksi nodavirus dengan PCR,



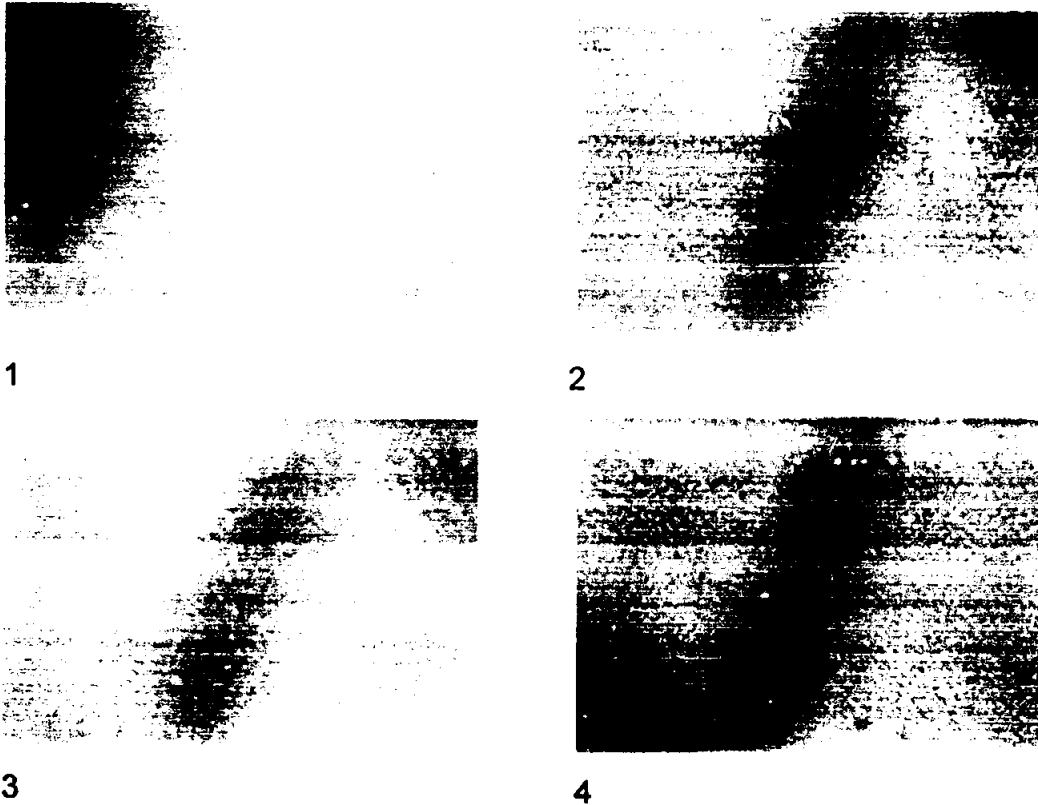
Gambar 3. Produk PCR dari ikan kerapu yang terinfeksi alami oleh VNN. Lajur 1 : Marker, 2 Kontrol negatif, 3 : Kontrol positif, 4 : Sampel terinfeksi berat, 5 : sample terinfeksi sedang, 6 : sample terinfeksi ringan.

## 7.2. Perbanyakan dan pemurnian virus

Pada perbanyakan virus di mancanegara dilakukan dengan SSN-1 cell line (Frerichs *et al.*, 1996) dengan medium yang sering digunakan adalah L-15 (10% foetal bovine serum, 200 mM L-glutamine, 100 µg µl-1 Gentamycin sulphate dan 100 mM HEPES buffer).

VNN kemudian diisolasi dari kerapu yang dan kemudian diinfeksi pada kultur sel sirip ekor kerapu sebanyak 50 µl per sumuran (well). Kemudian ditunggu sampai terlihat CPE selama 7 hari atau jika CPE telah komplet

kemudian virus dipanen dan kemudian dimurnikan dengan sucrose gradient. Gambar dibawah adalah kultur sel dari sirip ekor ikan kerapu yang digunakan untuk perbanyak VNN.



**Gambar 4.** Kultur sel yang digunakan untuk memperbanyak VNN, kultur sel ini masih akan disubkultur lagi sampai selnya menjadi banyak dan virus akan dipanen jika sudah terlihat CPE atau komplet CPE.

Kultur sel tersebut adalah hasil dari isolasi yang dilakukan sendiri di PS Perikanan Unair. VNN tersebut kemudian digunakan untuk SDS-PAGE untuk mengetahui pola protein dan hasilnya disajikan dibawah.

### 7.3. Struktur protein dari VNN

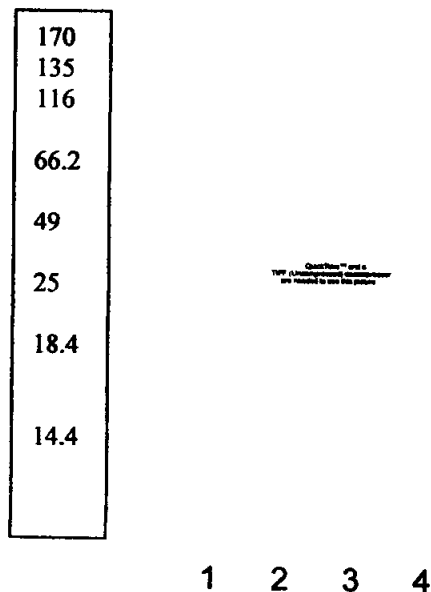
Betanodavirus adalah penyebab VNN pada ikan kerapu yang mengakibatkan kerugian yang sangat besar perikanan di dunia. Termasuk kedalam family Nodaviridae yang terdiri dari *Alphanodavirus* dan *Betanodavirus* adalah penyebab penyakit pada insek dan ikan. Virus yang termasuk kedalam genus betanodavirus adalah penyebab

encephalopathy dan retinopathy yang dikenal dengan nama Viral Nervous Necrosis (VNN) yang menyebabkan kerugian yang sangat besar pada budidaya ikan laut (Thiey, *et al.*, 2006). Ikan yang terinfeksi akan menunjukkan kelainan system saraf yang biasanya terlihat adanya vakuolisasi pada system saraf pusat dan retina. Pada penelitian sekarang ini ada 2 sampel ikan yang terinfeksi virus ialah dari Bali dan Situbondo, dan sample Bali menunjukkan adanya infeksi yang kuat atau kerapu terinfeksi yang akut.

Betanodavirus adalah virus yang berukuran kecil, spherical, nonevelope virus dan genome terdiri atas utas tunggal, dan positive-sense molekul RNA. Genomic segment yang besar RNA 1 (3.1 kb) encode RNA-dependent RNA polymerase, sedangkan yang lebih kecil genomic segment RNA2 (1.4 kb) encode code protein. Berdasarkan analysis phylogentic dari coat protein sequencing dari beberapa nodavirus bisa dibagi menjadi 4 genotype ialah striped jack nervous necrosis virus (SJNNV), barfin flounder nervous necrosis virus (BFNNV), tiger puffer nervous necrosis virus (TPNNV) dan red spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) (Valle *et al.*, 2001; Nishizawa *et al.*, 1997).

Sekarang kontrol penyakit tersebut hanya berdasarkan adanya VNN pada induk atau ikan yang akan dibudidayakan. Berdasarkan beberapa metode diagnostik misalnya isolasi komponen virus atau antigen dan genome. Identifikasi induk yang diduga bebas virus dapat dilakukan dengan antibody antibetanodavirus untuk skrining induk ikan. Juga desinfeksi terhadap fasilitas, peralatan dan prosedur terhadap lingkungan budidaya harus dilakukan dengan teliti. Pemakaian bahan kimia yang digunakan untuk membunuh virus sangat dianjurkan walaupun prosedur tersebut mungkin agak sulit untuk dilakukan di lapangan.

Telah lama diketahui bahwa vaksin mempunyai kemampuan untuk mencegah infeksi VNN pada ikan, dan ini merupakan kontrol yang efektif terhadap penyakit yang disebabkan oleh VNN sehingga dapat mengurangi kerugian yang sangat besar didalam industri perikanan didunia. Partial protective immunity dapat diperoleh pada beberapa ikan dengan recombinan coat protein dari betanodavirus yang diekspresikan pada *Escherichia coli* (Husgard *et al.*, 2001), sedangkan peptide syntetis



Gambar 7. Struktur protein VNN dari SDS PAGE, lane 1 marker, 2 VNN, 3 KHV dan 4 WSBV.

Tanaka *et al.* (2001) melaporkan bahwa vaksinasi dengan nodavirus atau mantel nodavirus yang diekspresikan rekombinan pada *Escherichia coli* menghasilkan proteksi yang tinggi. Bahkan titer antibodinya cukup tinggi antara 1: 158 sampai 1 : 1257 pada serum ikan yang hidup setelah uji tantang secara injeksi dengan VNN. 32, 49, 65, 75, 95 kDa.

Tabel 5. Berat molekul dalam kilodalton (kDa) dari VNN berdasarkan pergerakan relatif dalam SDS-polyacrilamide gel

Protein	VNN (kDa)
L	95
G	75
N	65
M1	49
M	32
M2	-

Dari data dibawah bahwa PI untuk VNN pada kisaran 5.8 sampai 9.2 menunjukkan bahwa VNN pada kisaran normal pH. Data PI bisa

menggambarkan bahwa hanya M2 saja yang mempunyai pH yang tinggi, hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh perbedaan derajat fosforilasi dari virus tersebut.

Tabel 6. Isoelectric point dari VNN

Protein	VNN
Polymerase (L)	6.1-6.6
Glycoprotein (G)	7.0-7.2
Nucleoprotein (N)	5.8-6.2
Matrix protein 1 (M1)	7.2
Matrix protein 1 (M2)	9.0-9.2

Protein hasil elusi 32 kDa tersebut bersama dengan whole killed virus (WKV) kemudian disuntikkan ke kerapu untuk mengetahui respon imun. Nishizawa (1995) melaporkan bahwa protein ini adalah region T2 yang tersusun 876 base dari 1023-base ORF dari capsid protein gene. Region rT2 yang diperkirakan mempunyai berat molekul 32 kDa juga dilaporkan oleh Grotmol *et al* (2000). Gejala awal kerapu yang diinfeksi adalah malas dan hilangnya nafsu makan dan hampir semua ikan menampilkan gejala klinis ini. Berikutnya diikuti oleh ikan berubah menjadi gelap, sangat aktif, renang yang tidak terkontrol dan hyperemia disekitar disekitar cranium. Sedangkan pada kontrol tidak menunjukkan gejala apapun.

Vaksin yang digunakan T2 region memancing respon imun humoral yang mempunyai netralisasi virus pada kerapu. Hal ini juga dilaporkan oleh Nakai *et al.* (1995) dan Husgaro *et al.* (2001) yang mendeteksi antibody spesifik pada striped jack dewasa setelah imunisasi dengan recombinant dari capsid SJNNV. Sedangkan pada penelitian ini terjadi peningkatan titer antibody dan ini menunjukkan bahwa imunisasi dapat memancing timbulnya antibody dalam jangka waktu yang lama di kerapu. Sengaja tidak memakai adjuvant untuk menghindari buruknya karkas karena pada

beberapa kali penelitian memakai adjuvant bekas suntikan akan berwarna putih dan kadang menjadi borok.

#### 7.4. Efikasi dari vaksin pada kerapu

Sebelum dilakukan vaksinasi tidak ada kematian yang terjadi pada ikan coba sampai ikan digunakan untuk penelitian. Kematian awal terjadi pada hari 4-5 sesudah uji tantang dengan VNN pada ketiga peralukan, bahkan untuk kontrol ikan kematian terjadi 1 hari lebih cepat atau 3 hari sesudah uji tantang. Sampai hari ke 14 sesudah uji tantang kematian terendah terjadi pada WKV dengan kematian total 20 % dan tertinggi dari 32 kDa 60 %. Kematian pada kontrol ikan hanya 30 % sampai 80 %, merupakan hasil vaksinasi yang berhasil baik.

Tidak ada gejala klinis yang menyolok terjadi tetapi ikan kehilangan nafsu makan dan sedikit berubah warna, perubahan warna ini terjadi kemungkinan disebabkan karena ikan tidak mendapatkan sinar matahari, adalah fenomena umum yang sering terjadi pada ikan yang dipelihara secara indoor.

Tabel 7. Proteksi kerapu sesudah vaksinasi dengan Whole Killed Virus (WKV) dan 32 kDa protein setelah uji tantang dengan VNN. WKV dan 32 kDa yang diberikan adalah 10 µg/ikan dan ikan dipelihara selama 14 hari.

No	Dosis WKV dan 32 kDa (µg/ikan)	WKV (mati/tested)	32 kDa (mati/tested)	Kontrol (mati/tested)
1	100	3/10	3/10	10/10
2	200	3/10	3/10	
3	300	2/10	2/10	
4	400	4/10	2/10	

Ikan yang divaksin secara intra muscular (im) dengan recombinant coat protein titer antibody yang tinggi bisa dideteksi sampai 110 hari (Tanaka *et al.*, 2001), dari hasil diatas bisa disimpulkan bahwa vaksinasi dengan coat protein dari VNN bisa dilakukan dan menghasilkan sintasan yang tinggi, sekarang yang menjadi permasalahan adalah bagaimana



memproduksi coat protein dalam jumlah banyak dan memberikannya lewat metoda yang mudah misalnya pemberian lewat pakan.

Kumulatif kematian ikan yang divaksin jika disajikan dalam bentuk grafik terlihat seperti pada gambar 6 dibawah dengan kematian teringgi 60 % pada WKV dengan dosis injeksi 40  $\mu\text{g}/\text{ikan}$  dan 32 kDa 30  $\mu\text{g}/\text{ikan}$ . Vaksinasi untuk ikan salmon sudah berhasil dengan baik, tetapi pencarian vaksin untuk ikan kerapu masih belum mendapatkan hasil yang memuaskan. Vaksin pada umumnya adalah traditional inactivated vaccine, sedangkan pencarian vaksin dari nodavirus dengan recombinant VP2 dengan berat molekul 32 kDa sedang dicobakan pada sea bass (Thiery *et al.*, 2006). Dari percobaan tersebut WKV mempunyai proteksi antara 60-80 bergantung pada dosis virus yang digunakan untuk uji tantang terhadap ikan kerapu. Ikan kerapu yang mati karena uji tantang walalupun tidak menunjukkan gejala klinis seperti pada infeksi alami tetapi terlihat ikan tidak mempunyai nafsu makan dan sedikit berubah warna.

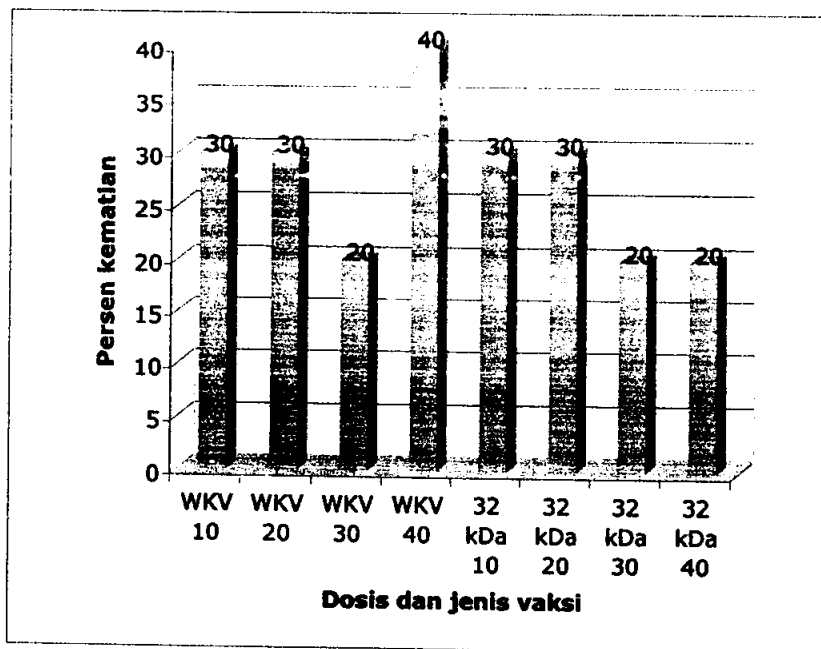
Selama ini pada umumnya kenaikan sintasan akan selalu dibarengi dengan peningkatan produksi antibody, tetapi kadang hal ini tidak selalu bersamaan artinya sintasan yang tinggi belum tentu produksi antibodynya juga tinggi (Song, 1984).

Tabel 8. Produksi antibody kerapu setelah divaksin dengan 32 kDa dan Whole Killed Virus (WKV) dan diuji tantang dengan VNN dan diamati selama 14 hari.

No	Dosis WKV dan 32 kDa ( $\mu\text{g}/\text{ikan}$ )	Produksi antibody WKV (1 :.....)	Produksi antibody 32 kDa (1 :.....)	Produksi antibody Kontrol (1 :.....)
1	100	350	659	125
2	200	556	768	
3	300	1010	1156	
4	400	1157	1256	

Dari studi ini menunjukkan bahwa region T2 mempunyai proteksi kerapu terhadap VNN sesudah 14 hari vaksinasi. Karena kontrol ikan yang tidak

disuntik dengan T2 atau Whole Kille Virus (WKV) kematian hampir 100%. Thiery *et al.* (2006) melaporkan bahwa vaksinasi dengan virus-like particles (VLPs) pada European sea bass *Dicentrarchus labrax* menghasilkan proteksi terhadap infeksi VNN. Dosis yang digunakan untuk vaksinasi adalah 20 – 100 µg VLPs dari malabaricus grouper necrosis virus (MGNNV) atau 0.1 – 20 µg coat protein SB2 VLPs per ikan. Rekombinant dari coat protein yang diekpresikan pada *Escherichia coli* sering digunakan untuk immunisasi terhadap VNN.



Gambar 8. Kumulatif kematian ikan kerapu yang divaksin dengan 2 macam vaksin dan berbagai macam dosis dengan cara injeksi pada kerapu

### 7.5. Respon imun kerapu

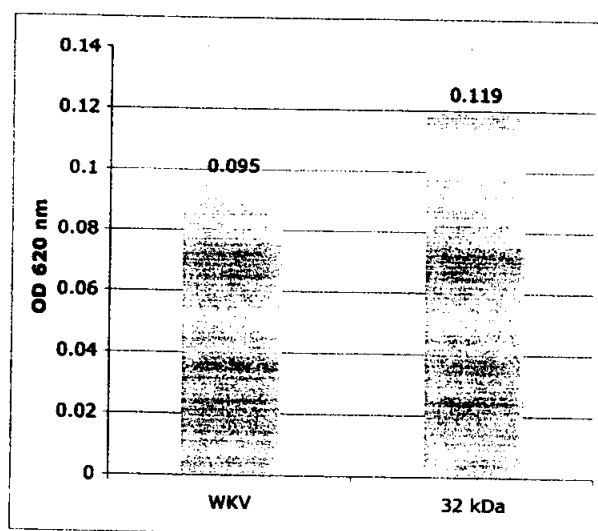
Pada ikan kerapu yang divaksin dengan WKV dan 32 kDa kematian yang terjadi sesudah 4 hari pemberian vaksin dan berakhir 14 hari sesudah vaksinasi. Sedangkan kontrol ikan kematian mulai hari ketiga sesudah vaksinasi, sedangkan gejala klinis antara kontrol dan divaksin tidak tampak adanya perubahan yang berarti. Hal ini juga terjadi pada udang yang disuntik dengan WSBV, bintik putih tidak bisa diproduksi pada infeksi buatan, karena udang diinfeksi dengan sejumlah besar virus sehingga mati dalam waktu yang singkat. Superoxide anion merupakan

salah satu mekanisme pertahanan diri ikan terhadap infeksi dari luar. Pada ikan yang divaksin dengan WKV ataupun T2 (32 kDa protein), superoxide anion (SA) diproduksi oleh macrophage ikan 0.09 untuk WKV dan 0.11 untuk 32 kDa dan hampir tidak ada perubahan sampai akhir penelitian. Pada sevenband grouper *Epinephelus semtemfascinatus* juga terproteksi pada ujiantang setelah ikan divaksin dengan 60 µg recombinant protein dengan interval injeksi 10 hari (Tanaka *et al.*, 2001), tetapi RPS yang didapatkan lebih rendah dibandingkan dengan yang divaksin dengan VLPs, hal ini kemungkinan disebabkan oleh rendahnya titer antibody pada waktu ujiantang.

Tabel 9. Hasil test neutralisasi dari sera kerapu dengan jumlah ikan adalah 5 ekor. Neutralisasi adalah resipokal nilai dari pengenceran serum 50% atau yang lebih tinggi dari titer VNN

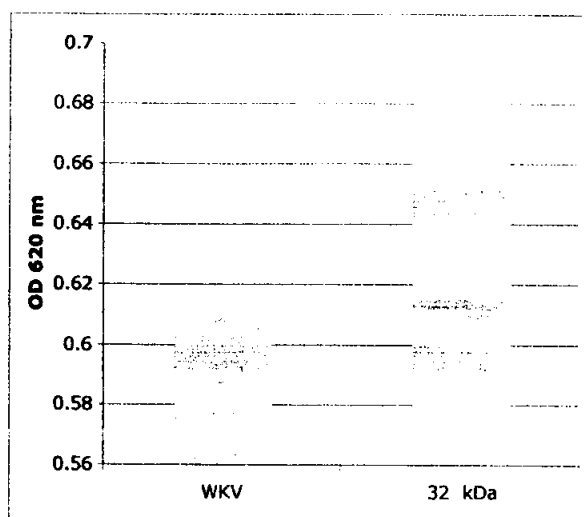
No	Sesudah 14 hari	Kontrol (0 hari)
1	100	0
2	100	0
3	1600	0
4	3200	0
5	3200	0

Walaupun viral-neutralising humoral immune response kemungkinan disebabkan karena infeksi virus atau vaaksinasi, komponen seluler dari sistem imun dikenali sebagai komponen pertama sistem pertahanan diri dari setiap ikan.



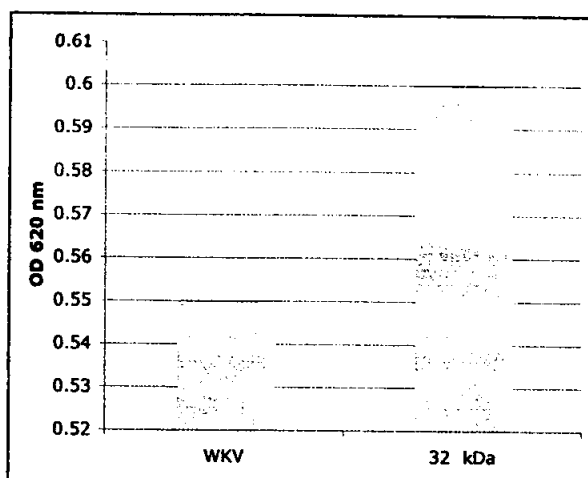
Gambar 9. Produksi superoxide anion dari kerapu macrophage

Demikian pula terhadap produksi intracellular O<sub>2</sub> yang juga merupakan salah satu mekanisme pertahanan diri ikan terhadap adanya infeksi yang disebabkan oleh virus ataupun bakteri. Vaksin yang dites diatas sebenarnya telah membangkitkan respon imun humoral spesifik ikan kerapu dengan kemungkinan virus neutralizing antibody, hal ini sebenarnya juga diketemukan oleh Nakai *et al.* (1995) yang mendeteksi antibody pada striped jack dewasa sesudah immunisasi dengan recombinant capsid protein dari SJNNV. Pada studi sekarang ini peningkatan produksi antibody memang terukur pada semua ikan jika dibandingkan dengan kontrol ikan. Kerapu memang seinditif terhadap VNN dan setelah infeksi dengan VNN kematian segera terjadi. Pada infeksi tersebut kerusakan pada ikan mestinya terjadi pada sistem saraf pusat dan retina ikan, tetapi jika infeksi buatan dengan dosis yang besar kerusakan seperti diatas belum tentu terjadi. Dengan dosis ujiantang sekitar  $1.0 \times 10^7$  cell virus untuk ukuran ikan kerapu 10-15 cm panjangnya, dosis tersebut lebih dari cukup. Pada penelitian yang dilakukan oleh ilmuwan di berbagai manca negara dosis diatas dapat mematikan 30-100 % populasi ikan coba. Misalnya pada European sea bass dengan ujiantang dengan pencelupan mortalitas tercatat hanya 32 % (Peducasse *et al.*, 1999). Memang pada penelitian vaksinasi dosis ujiantang dan metode pemberian vaksin sangat mempengaruhi hasilnya.



Gambar 10. Produksi extracellular  $O_2$  dari kerapu macrophage

Phagocyte mempunyai kemampuan untuk membunuh berbagai macam patogen dengan menggunakan berbagai macam cara yang biasanya disebut dengan oxygen dependent atau oxygen independent. Pada banyak kasus, dimana patogen merupakan mikroorganisme, pembunuhan mikroorganisme oleh fish phagocyte merupakan mekanisme intracellular dan terjadi dalam waktu yang singkat/ misalnya 1 hari (Daly *et al.*, 1994). Tetapi extracellular killing juga terjadi misalnya pembunuhan larva helminth oleh macrophage dari rainbow trout (Whyte *et al.*, 1989). Pada waktu phagocyte ingest particle, akan terjadi pengambilan oksigen yang bergantung pada respirasi mitokondria, misalnya rainbow trout head kidney macrophage memerlukan  $12 \text{ nmol } O_2/\text{min}/10^7 \text{ cell}$  sesudah stimulasi dengan zymosan disbanding dengan pengambilan  $1.3 \text{ nmol } O_2/\text{min}/10^7 \text{ cell}$  pada sel yang istirahat (Nagelkerke *et al.*, 1990). Soluble membrane stimulant misalnya phorbol ester dapat juga membangkitkan respon, dan ini disebut dengan respiratory burst untuk memproduksi sejumlah oksigen dan nitrogen radikal bebas yang toksik untuk bacteria dan parasit.



Gambar 11. Produksi intracellular  $O_2$  dari kerapu macrophage

Telah lama diketahui bahwa radikal bebas oksigen diproduksi oleh fish phagocyte selama respiratory burst (Secombes and Fletcher, 1992). Sebagian secara langsung bersamaan dengan superoxide anion ( $O_2^-$ ) dan hydrogen peroxide. Reaksi pertama dari respiratory burst adalah reduksi satu electron menjadi  $O_2$  dengan katalisator NADPH oksidase. NADPH oksidase adalah enzim kompleks, enzim multikomponen yang terdapat yang ditemukan pada membran plasma dari phagocyte. Tersusun dari cytochrom b dan a flavoprotein yang berfungsi sebagai transport rantai electron yang dikatalisatori oleh NADPH. Pada sistem sel bebas hydrogen peroksida berfungsi sebagai potent bacterial agent (Hardie *et al*, 1996).

Keduanya baik macrophage maupun neutrophil dapat membangkitkan ROS, walaupun ada beberapa perbedaan. Misalnya ikan Atlantik salmon produksi  $O_2$  sesudah adanya stimuli dari phorbol ester lebih besar terjadi pada neutrophil dibandingkan dengan macrophage (Lamas and Ellis, 1994). Juga telah diketahui bahwa aktifitas phagocyte dapat dimodulasi dengan endogenous atau exogenous factor (Secombes, 1994).



### **7.6. Histology retina**

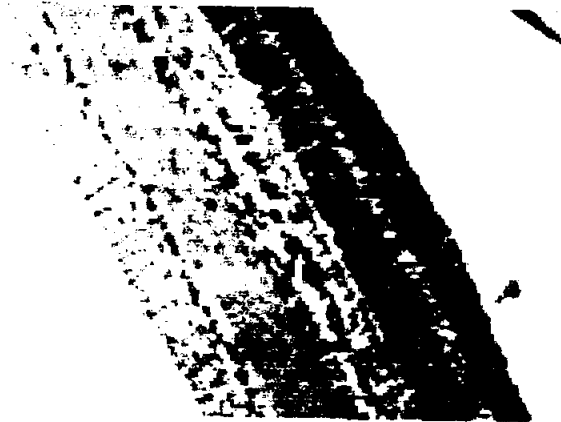
Pada ikan kerapu yang terinfeksi VNN berat perubahan histology mudah diamati dengan adanya perubahan pada retina dan otak. Otak akan menunjukkan adanya vakuolisasi yang hebat, nekrosis dan degenerasi dari sel-sel syaraf. Sedangkan pada retina perubahan utama adalah adanya vakuolisasi. Sedangkan pada hasil sekarang ini perubahan tersebut tidak teramati, kemungkinan infeksi yang terjadi tidak terlalu hebat karena hasil PCR pita yang dihasilkan tidak terlalu tebal.

Hasil dari histology terhadap mata ikan kerapu walaupun tidak diketemukan pembentukan vakuola tetapi mata ikan kerapu menunjukkan kerusakan dengan adanya ruang yang lebar atau vakuolisasi ringan. Tidak seperti biasanya hal tersebut terjadi, tetapi jika hal tersebut disebabkan karena kerusakan prosesing sebenarnya sangat kecil.

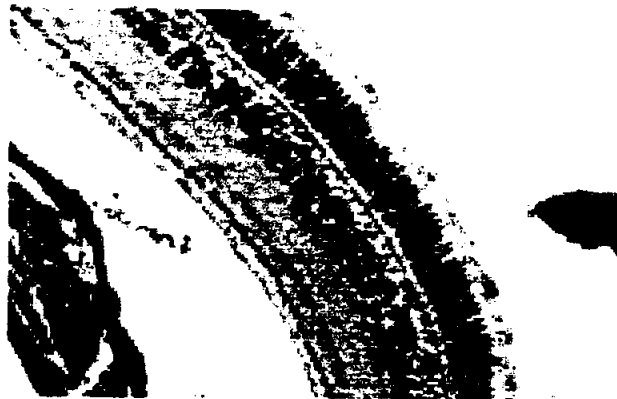
Walaupun sebenarnya perubahan patologi umum yang terjadi pada ikan kerapu telah diketahui dengan baik ialah luka dan pembentukan vakuola pada sel dan perubahan pada sistem saraf pusat (Munday and Nakai, 1997). Penyakit ini sering terjadi di Asia Pasifik misalnya di Indonesia, Philipina yang menyebabkan kematian pada sea bass dan grouper yang menyebabkan kerugian yang sangat besar didalam industri budidaya finfish.



1



2



3

**Gambar 12. Histopat retina kerapu yang terinfeksi VNN. Gambar yang diambil dari daerah sekitar mata dan sistem saraf ikan.**

**Husgaro *et al.* (2001) memperkirakan bahwa masuknya virus kedalam sistem saraf pusat dengan axonal transport melewati saraf motor sesudah inokulasi intramuscular. Tidak ada perubahan khusus pada retina kerapu kecuali sedikit vakuolisasi pada retina.**

### 7.7. Peran inang dalam penularan VNN

Ikan yang hidup didekat ikan kerapu hidup dapat berperan sebagai inang sementara untuk VNN sebelum ia menginfeksi kerapu. Pada saat ini VNN jika disuntikkan pada ikan kerapu lain misalnya kerapu macan ternyata setelah penyuntikan ditemukan tanda-tanda kerapu yang sakit seperti pada kerapu tikus. Sayangnya kita sulit menangkap dan mengetahui ikan apa saja yang hidup disekitar jaring apung, tetapi sesama kerapu mungkin lebih mudah tertulari oleh penyakit virus diatas tentunya selain bakteri *Vibrio sp.* yang memang selalu ada di dalam air.

Tabel 10. Penularan VNN terhadap bandeng setelah penyuntikan dengan VNN isolat Bali dan diamati selama 14 hari.

No	Dosis suntik ( $\mu\text{g}/\text{fish}$ )	Bandeng (mati/tested)	Kontrol (mati/tested)
1	100	0/10	0/10
2	200	0/10	0/10
3	300	1/10	0/10

Pada table dibawah disajikan data tentang percobaan penularan VNN terhadap beberapa jenis ikan air tawar, lele *Clariad batrachus*, koi *Cyprinus carpio koi*, koki, mujair *Tilapia mossambica*, nila *Oreochromis niloticus*. Sekarang nodavirus telah ditemukan menyerang pada ikan air tawar (Athanasopoulou *et al.*, 2003 ; Chi *et al.*, 2003 ; Hedge *et al.*, 2003). Pada infeksi ikan air tawar diyakini penularan tersebut berasal dari ikan yang hidup dilingkungan laut kemudian mereka bermigrasi ke air tawar.

Gejala klinis VER ditandai dengan hilangnya nafsu makan, perubahan warna tubuh (depigmentasi), kerusakan sistem saraf termasuk ketidak normalan arah renang ikan. Kerusakan yang diakibatkan oleh pada ikan VER termasuk nekrosis dan pembentukan lubang-lubang (vakuolisasi) pada otak dan mata.

Untuk sementara sampai penelitian ini dilaporkan hasilnya seperti disajikan dibawah pada table 11.

Tabel 11. Penularan VNN terhadap berbagai ikan air tawar setelah penyuntikan dengan VNN isolat Bali dan diamati selama 14 hari, dosis untuk infeksi adalah 50  $\mu\text{g}/\text{fish}$ .

No	Spesies ikan air tawar	Mortalitas (mati/tested)	Kontrol (mati/tested)
1	Lele	0/10	0/10
2	Koi	0/10	0/10
3	Koki	0/10	0/10
4	Mujair	0/10	0/10
5	Nila	0/10	0/10

Ternyata pada penelitian penularan VNN pada ikan air tawar diantara 5 ekor ikan tidak ada yang mati. Walaupun menggunakan dosis 50  $\mu\text{g}/\text{fish}$  selama satu bulan ternyata tidak ada yang mati. Pernyataan diatas kemungkinan benar bahwa infeksi mungkin terjadi pada lingkungan payau kemudian ikan tersebut pindah ke air tawar.

### 7.8. Uji Lapangan Vaksinasi Kerapu

Tanah memegang peranan penting untuk budidaya ikan dan hampir semua tanah cocok untuk budidaya ikan kecuali tanah yang bersifat porous, tetapi yang paling baik adalah tanah liat. Yang mengandung banyak bahan organik juga tidak bagus untuk kolam karena untuk penguraian bahan organik membutuhkan banyak oksigen. Potensi redox dari tanah atau air menunjukkan tingkat oksigenasi atau reduksi dari tanah. Jika DO tinggi maka nilai redox dari air 500 mv, jika nilai redox turun dibawah 340 mv maka DO akan menjadi 2-3 mg/l dan nitrit mulai terdapat di perairan. Pada nilai redox 200 mv DO menjadi 0 mg/l dan beberapa iron compound mulai nampak dan tanah menjadi berwarna hitam. H<sub>2</sub>S akan mulai nampak jika nilai redox turun sampai 100 mv. Lapisan atas tanah berwarna coklat menunjukkan adanya proses oksidasi, sedangkan lapisan berwarna hitam merupakan tanda reduksi.

Permukaan tanah tersebut biasanya diantara 1 - 5 cm. Lapisan tanah yang keras lebih memudahkan penanganan sisa bahan organik, karena bahan organik yang tersisa tidak gampang masuk kedalam pori tanah. Pada budidaya di tambak tanah memegang peran yang sangat penting karena tanah menyokong kehidupan ikan dan biota lain. Selain itu peran lingkungan laut tidak kalah penting karena mempunyai peran yang sangat besar terhadap fluktuasi lingkungan dan pakan alami yang selalu berubah disetiap musim. Pada ikan kerapu yang masih kecil/barusan menetas masih sangat peka terhadap perubahan lingkungan, sehingga besar kecilnya kematian benih tersebut erat dengan fluktuasi lingkungan/musim. Tabel 12 dibawah adalah

Tabel 12. Jumlah kematian ikan kerapu macan selama masa aklimatisasi dan pemberian vaksin secara oral. Usia ikan waktu vaksinasi adalah 30 hari dan ikan dipelihara sampai tahap kritis terlewati (80 hari).

Minggu	Kematian Benih Kerapu (ekor)				Tahap
	Bak I	Bak II	Bak III	Kontrol	
1	50	20	20	70	Aklimarisasi benih
Total SR (persen)	10	4	4	14	
2	20	20	20	70	Vaksinasi
3	20	40	40	50	Vaksinasi
Total SR (persen)	8	12	12	24	

Usia ikan 30 hari sesudah menetas masih sangat kecil sekali, rata-rata panjangnya adalah 1 cm, sehingga ikan tidak bisa divaksin dengan suntik, satu-satunya cara adalah vaksin oral. VNN diketahui mempunyai inang yang sangat luas tetapi usia ikan yang terinfeksi tertentu. Ada 9 spesies yang rentan terhadap infeksi VNN, hal ini menunjukkan bahwa grouper sensitive terhadap Nodavirus. VNN akan menjadi penyakit

utama didalam produksi benih grouper, karena ikan yang gampang terserang adalah larva dan juvenil (Mori *et al.*, 1991; Mori *et al.*, 1992; Munday and Nakai, 1997; Chi *et al.*, 1997) kecuali sevenband grouper di Jepang (Fukuda *et al.*, 1996).

Ikan yang mudah terserang berukuran 10 hari – 4 bulan, tetapi kematian massal terjadi pada usia 20-30 hari. Kematian menurun jika ikan berusia 1 tahun, sedangkan pada spesies lain kematian massal terjadi pada usia yang sama. Tetapi pada usia ikan 20-30 hari masih sangat kecil sehingga sangat sulit untuk divaksin. Vaksinasi hanya bias dilakukan melewati pakan, yang pada penelitian ini diberikan melewati *Artemia*. Pada ikan dengan stress yang tinggi kematian ikan sangat besar jika disertai dengan infeksi parasit capsalid monogenean. Laporan terakhir oleh Munday *et al* (2002) lebih dari 32 spesies ikan dari 16 famili telah terinfeksi. Di Australia, ikan barramundi telah terinfeksi dan menyebabkan kematian massal pada larva dan juvenil (Munday *et al.*, 1992). Dua contoh ikan terinfeksi alami pada ikan air tawar ditemukan di Australia, Hyatt menemukan histology berupa luka khusus yang disebabkan oleh infeksi VNN dan partikel seperti-virus pada otak catfish Australia didekat jarring apung untuk budidaya barramundi di air tawar dan Moody yang mengisolasi nodavirus dari ikan yang menunjukkan gejala klinis VER pada sleepy cod in air tawar tetapi tidak berdekatan dengan budidaya barramundi. VER bisa ditularkan secara buatan pada beberapa spesies ikan air tawar, misalnya Macquarie perch, Murray cod, silver perch (Glazbrook, 1995), golden perch, sleepy cod, barco grunter, tetapi ikan air tawar tidak sebegitu sensitive dibandingkan dengan barramundi. Grotmol *et al* (1997) melaporkan bahwa Atlantic salmon yang terinfeksi penyakit vascular misalnya cardiac myopathy syndrome ditemukan partikel virus mirip dengan betanovirus pada jaringan yang terinfeksi.

Kematian larva kerapu yang terbesar di Indonesia disebabkan oleh *V. alginolyticus* yang menyebabkan kematian 97 persen sehingga menyisakan sekitar 3 persen benih yang hidup. Bakteri *Vibrio* akan tumbuh subur pada air yang mengandung bahan organik yang tinggi (Austin dan Austin, 1988) begitu pula *Aeromonas* (Inglis *et al.*, 1993).



Selain hal tersebut kandungan bahan organik yang tinggi dapat menyebabkan plankton menjadi bloom dan mengganggu pertumbuhan udang. Oleh sebab itu air yang mengandung bahan organik yang tinggi perlu dikurangi dengan cara mengalirkan pada kolam yang berisi ikan nila yang kemudian kita sebut sebagai filter biologi.

Tabel 13. Kematian total ikan kerapu macan selama masa vaksinasi (50 hari). Usia ikan yang divaksin 30 adalah hari, selama masa pemeliharaan kualitas air diperiksa setiap hari.

Minggu	Kematian Benih Kerapu (ekor)				Tahap
	Bak I	Bak II	Bak III	Kontrol	
4	10	30	40	50	Aklimarisasi benih
5	30	40	0	50	Vaksinasi
6	50	0	0	30	Vaksinasi
7	50	20	0	50	Vaksinasi
8	0	0	0	40	Vaksinasi
Total SR (persen)	140 (28%)	90 (18%)	40 (8%)	220 (44%)	

Rerata kematian adalah 14,6 persen sedangkan rerata kematian kontrol adalah 44 persen, selisihnya adalah 29,4 persen. SR kerapu sebesar ini sudah cukup besar untuk pembenihan kerapu, apalagi dipelihara mulai menetas sampai usia 80 hari. Pada ikan yang terinfeksi sebelum usia 20 hari ikan tidak menunjukkan gejala apapun kecuali hilangnya nafsu makan. Pada usia 20-45 hari ikan yang terinfeksi terlihat lemah dan sering berenang didekat permukaan air, dan mulai terjadi kematian ikan. Sesudah 45 hari sampai 4 bulan ikan yang sakit akan berada didasar kolam kemudian diikuti dengan kematian. Setelah usia ikan 4 bulan ikan yang terinfeksi berada didekat permukaan air, karena kemungkinan ikan terjadi kelainan pada gelembung renang. Tetapi kebanyakan ikan yang terinfeksi adalah larva dan juvenil, tetapi sekarang ikan yang dewasa dan siap panenpun, khususnya European seabass

(Le Breton *et al.*, 1997), grouper (Fukuda *et al.*, 1996) dan Atlantic halibut (Aspehaug *et al.*, 1999). Khusus untuk grouper dan sea bass penyakit tersebut lebih akut jika suhu air meningkat (Le Breton *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1998). Ikan yang sakit akan mengalami ketidaknormalan gerak, kontrol gelembung renang, dan perubahan warna. Pada beberapa ikan akan terjadi arah renang yang tidak beraturan, misalnya renang searah spiral (Mori *et al.*, 1991; Mori *et al.*, 1992; Breuil *et al.*, 1991).

Infeksi VNN dilaporkan pertama kali pada barramundi *Lates carcarifer* pada panti pembenihan di Jawa Timur pada tahun 1997 (Zapran *et al.*, 1998). Kemudian menyebar ke panti pembenihan barramundi di Bali pada tahun 1998, kemudian pada tahun yang sama beberapa panti pembenihan berhasil membudidayakan humpback grouper *Epinephelus fuscoguttatus*. Tetapi kematian absolut terjadi di Bali pada tahun itu juga sehingga tidak ada benih yang hidup. Penyakit yang disebabkan oleh VNN digolongkan menjadi beberapa tingkatan kehidupan ikan ialah induk, larva, juvenil dan grow-out. Sampai saat ini infeksi VNN masih menjadi permasalahan besar didalam budidaya kerapu, khususnya dipanti pembenihan karena VNN menyebabkan kematian yang tinggi. Budidaya laut sangat penting bagi Indonesia dan kendala utama untuk kerapu adalah VNN, VNN dapat berkembang dengan baik pada suhu air 28 – 32 °C. Sekarang infeksi VNN tidak hanya terjadi pada kerapu saja, tetapi terjadi pada beberapa ikan ekonomis penting lain di Taiwan (Chen *et al.*, 2001).

Sekarang kontrol penyakit tersebut hanya berdasarkan adanya VNN pada induk atau ikan yang akan dibudidayakan. Berdasarkan beberapa metode diagnostik misalnya isolasi komponen virus atau antigen dan genome. Identifikasi induk yang diduga bebas virus dapat dilakukan dengan antibody antibetanodavirus untuk skrining induk ikan. Juga desinfeksi terhadap fasilitas, peralatan dan prosedur terhadap lingkungan budidaya harus dilakukan dengan teliti. Pemakaian bahan kimia yang digunakan untuk membunuh virus sangat dianjurkan walaupun prosedur tersebut mungkin agak sulit untuk dilakukan di lapangan. Kerapu yang dibudidayakan pada laut yang mempunyai aliran air yang terus

meneruspun terinfeksi oleh Nodavirus. Lokasi ayang ideal dengan kualitas air yang bagus, permukaan air yang tenang dan gelombang yang kecil merupakan tempat yang ideal untuk budidaya kerapu. Pada ikan dengan stress yang tinggi kematian ikan sangat besar jika disertai dengan infeksi parasit capsalid monogenean. Laporan

## VIII. KESIMPULAN DAN SARAN

### 7.1. Kesimpulan

Kematian kerapu disebabkan oleh VNN setelah konfirmasi dengan PCR dan vaksinasi dengan whole cell virus proteksi yang didapatkan adalah 29 persen. Vaksinasi dilakukan selama 45 hari dimulai pada saat ikan berusia 30 hari dan diakhiri usia 80 hari. Selama vaksinasi kerapu diberi pakan *Artemia salina* sampai akhir penelitian.

Kualitas air selama penelitian berlangsung adalah oksigen terlarut adalah 5 – 6 ppm, suhu 27 – 29 °C, salinitas 31 – 32 ppm dan pH air 7,3 – 7,5. Kualitas air seperti ini sudah cukup baik untuk mendukung kehidupan ikan dan organisme air lain. VNN juga tidak menular terhadap ikan yang hidup di air payau (bandeng) dan beberapa ikan air tawar (lele, koi, koki, mujair, nila).

### 7.2. Saran

Pada akhir penelitian sebaiknya dilakukan uji mekanisme pertahanan diri dari kerapu yang divaksin dengan ukuran ikan yang besar.

**KEPUSTAKAAN**

- Agius, C., M.T.Horne and P.D.Ward (1993) : Immunization of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson, against vibriosis: comparison of an extract antigen with whole cell bacterin by oral and intraperitoneal routes. *J. Fish Diseases*, 6 : 129 - 134.
- Alexander, J.B., A. Bower, G.A. Ingram and S.M.Shamshoon (1992) : The portal of entry of bacteria into fish during hyperosmotic infiltration and the fate of antigens. *Dev. Comp. Immunol. Suppl.*, 2 : 41 -46.
- Aoki, T., Kitao,T., Itabashi,T., Wada,Y., Sakai,M. (1981) : Proteins and lipopo-lysaccharides in the membrane of *Vibrio anguillarum*. *Deveiop. Biol. Standard.*, 49, 225 - 232.
- Arimoto, M. (1995) : Study on the virus nervous necrosis (VNN) in striped jack *Pseudocaranx dentex*. *Japan Sea Farming, Special Issue Vol. 10*.
- Arimoto, M., K. Mushiake, Y. Mizuta, T. Nakai, K. Muroga and I. Furuzawa (1992) : Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) with enzyme linked assay (ELISA). *Fish Pathol.*, 27:191-195.
- Athanassopoulou, F., C. Billinis, V. Psychas, K. Karipoglou (2003) : Viral encephalopathy and retinopathy of *Dientrarchus labrax* (L.) in farmed fresh water fish in Greece. *J. Fish Dis.* 26 : 361-375.
- Bodhipaksha, N. and B.A.Weeks-Perkin (1994) : The effects of methyl parathion on phagocytosis and respiratory burst activity of Tiger shrimp *P. monodon* phagocytes. In "Modulator of fish immune response" Eds by. J.S.Stolen and F.C. Fletcher. SOS Publication. Fair Haven. USA
- Barton, B.A. and G.K.Iwama (1991) : Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 1991 : 3 - 26.
- Breuil, G., J.R. Bonami, J.F.Pepin and Y. Pichot (1991) : Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in hatchery-

- reared sea-bass *Dicentrarchus labrax* larvae and juvenile. *Aquaculture* 97 : 109-116
- Brock, J.A. (1992) : Current diagnostic methods for agents and diseases of farmed marine shrimp. In "Diseases of Penaeid Shrimp Cultured in Asia and United States" ed. by W.Fulk and K.L.Main. The Oceanic Institute. Hawaii. Pp. 209 - 231.
- Brock, J.A. and D.V.Lightner (1990) : Microbial pathogens and diseases of marine crustacean. In : O. Kinne (Ed). Disease of marine animals, Vol.3. John Wiley and Sons, N.Y. pp. 245 - 349.
- Boyd, C.E. (1982) : Water quality management for pond fish culture. Elsevier, Oxford UK, pp. 29-33.
- Chang, P. S., D. H. Tsi and Y. C. Wang (1998) : Development and evaluation of a dot blot analysis for the detection of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in *Penaeus monodon*. *Fish Pathology*, 33 : 45 - 52.
- Chi, S.C., J.R. Shieh, S.J. Lin (2003) : Genetic and antigenic analysis of betanoviruses isolated from aquatic organism in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, 55: 221-228.
- Chen, D. (1992) : An overview of the disease situation, diagnostic techniques, treatments and preventives used on shrimp farms in China. In "Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and United States" ed. by The Oceanic Institute, Hawaii, pp 47 - 55.
- Chart,H. and Trust, T.J. (1994) : Characterization of the surface antigen of the marine fish pathogens, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalli*. *Can. J. Microbiol.*, 30, 703 - 710.
- Chi, S.C., C.F.Lo, G.H.Kou, P.S.Chang, S.E.Peng and S.N.Chen (1997) : Mass mortalities with viral nervous necrosis (VNN) disease in two species of hatchery-reared grouper *Epinephleus fuscogutatus* and *Epinephleus akaara* (Temminck and Schlegel). *J.Fish.Dis.*, 20 : 185-193.
- Coeurdarcier, J.L., F. Laporte and J.F.Pepin (2003) : Preliminary approach to find syntetic peptide from nodavirus capsid potentially protective against sea bass viral encephalopathy and retinopathy. *Fish and Shellfish Immunol.*, 14 : 435-447.



- Daly, J.G., A.R. Moore and G.Oliver (1994) : Bactericidal activity of brook trout *Salvelinus fontinalis* peritoneal macrophage against avirulent strain of *Aeromonas salmonicida*. *Fish and Shellfish Immunol.*, 4 : 273-283.
- Direktorat Jenderal Perikanan (1997) : Makalah Direktur Bina Program Pada Pertemuan Koordinasi dan Pemantapan Rekayasa Teknologi Pembenihan Lintas Unit Pelaksana Teknis Direktorat Jenderal Perikanan di Yogyakarta, 8 - 12 Juni 1997.
- Ellis, A.E. (1989) : The Immunology of Teleost. In *Fish Pathology*. Ed. by R.J. Robert. Baillere Tindall London, pp 92 - 104.
- Ellis, A.E. (1988) : Fish Vaccination. Academic Press. pp 1 - 50.
- Evelyn,T.P.T (1984) : Immunization against pathogenic vibriosis. In *Symposium Fish Vaccination*, ed. P. de Kinkelin,Paris : Off. Int. Epiz. pp.121 - 150.
- Egidius, E.C. and K. Anderson (1999) : Bath-immunization a practical and non stressing method of vaccination sea farmed rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson against vibriosis. *J.Fish Diseases* 2, 405 - 410.
- Egidius,E. and Anderson,K. (1979) : Bath immunization a practical and non stressing method of vaccinating farmed sea rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson against Vibriosis, *J.Fish.Dis.* 2, 405 - 410.
- Ellis, A.E. (1998) : Fish Vaccination. Academic Press. pp 1 - 50.
- Evelyn,T.P.T (1984) : Immunization against pathogenic vibriosis. In *Symposium Fish Vaccination*, ed. P. de Kinkelin,Paris : Off. Int. Epiz. pp.121 - 150.
- Frerich, G.N., H.D. Rodger and Z. Peric (1996) : Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax*. *J. Gen Virol.* 77 : 2067-2071.
- Fryer,J.L., Rohovec,J.S. and Garrison, R.L. (1978) : Immunization of salmonid for control of Vibriosis. *Mar. Fish Review*, 40, 20 - 23.
- Figueras, A., M. M. Santarem and B. Novoa (1997) : *In vitro* immunostimulan of turbot *Scophthalmus maximus* leucocytes with

- beta glucan and/or *Photobacterium damsela* bacterin. Fish Pathology, 32 : 153 - 157.
- Fukuda, Y., H.D. Nguyen, M. Furuhashi and T. Nakai (1996) : Mass mortality of sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*, associated with viral nervous necrosis (VNN). Fish Pathol. 31 : 165-170.
- Gabig, T. G and B.M. Babior (1981) : The killing of pathogen by phagocytes. Annual Review Medicine, 32 : 313 - 326.
- Gould, R.W., O'Leary, P.J., Garrison, R.L., Rohovec, J.S. and Fryer, J.L. (1978) : Spray vaccination: a method for immunization of fish. Fish Pathol., 13, 63 - 68.
- Grotmol, S., AH Nerland, GK Totland, E. Biering and T. Nishizawa (2000) : characterization of capsid proteingene from nodavirus strain affecting the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* and design of an reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection assay. Dis Aquat Org 39 : 79 – 88.
- Hasting, T.S. (1988) : Furunculosis vaksin. Dalam "Fish Vaccination" ed. by A.E. Ellis. Academic Press. Tokyo, Japan, pp 93 - 110.
- Higson, F.K. and O.T.G. Jones (1984) : The generation of active oxygen species by stimulated rainbow trout leucocyte in whole blood. Comp. Biochem. Physiol. 77 B: 583 - 587.
- Hedge, A., H.C. Teh, T.J. Lam, Y.M. Sin (2003) : Nodavirus infection in freshwater ornamental fish, guppy *Poecilia reticulata*- comparative characterization and pathogenicity studies. Archives of Virology 148 : 575-586.
- Hennig, O., T. Itami, M. Maeda, M. Kondo, Y. Natsukari and Y. Takahashi (1998) : Analyses of hemolymph immunoparameters in kuruma shrimp infected with Penaeid Rod-shaped DNA Virus. Fish Pathol., 33: 389-393.
- Husgaro, S., S. Grotmol, BK Hjeltnes, OM Rodseth and E Biering (2001) : Immune response to recombinant capsid protein of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in turbot *Scophthalmus maximus*

- and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, and evaluation of vaccine against SJNNV. *Dis Aquat Org* 45 : 33-44.
- Johnson, R. B. (1978) : Oxygen metabolism and the microbial activity of macrophage. *Fed. Proc.* 37, : 2759 - 2764.
- Johnson, K.A., Flynn, J.K and Ammend, D.F. (1982) : Duration of immunity in salmonids vaccinated by direct immersion with *Yersinia ruckeri* and *Vibrio anguillarum* bacterins. *J.Fish.Dis.*, 5, 207 - 213.
- Kawai, K., Kusuda, R. and Itami, T. (1981) : Mechanisms for protection in ayu orally vaccinated for vibriosis. *Fish.Pathology*, 15, 257 - 262.
- Kusuda, R and K. Kawai (1992) : Bacterial infections of fish in Japan. In : *Salmonid diseases*, editor T. Kimura. Hokkaido University Press, Sapporo, Japan.
- Kusheryani, I., Zafran, K. Yuasa and K. Hatai (1999) : Common ectoparasites of grouper in Indonesia. PP41. In: "Aquatic Animal Health for Sustainability". Book of Abstract, OP 40, Fourth Symposium on Disease in Asian Aquaculture, November 22-26, 1999 Cebu, Philippines.
- Lamas, J. and A.E. Ellis (1994) : Atlantic salmon *Salmo salar* neutrophil responses to *Aeromonas salmonicida*. *Fish and Shellfish Immunol.* 4 : 201-219.
- Lameli, U.K. (1970) : Cleavage of structural protein during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, 227 : 680 - 684.
- Landolt, M.L. (1989) : The relationship between diet and the immune response of fish. *Aquaculture*, 79 : 193 - 206.
- Leong, J.C dan J.L.Fryer (1993) : Viral vaccine for aquaculture. *Annual Rev. of Fish Disease*, pp 225 - 240.
- Landau, M. (1992) : *Introduction to aquaculture*. John Wiley and Son. Singapore, pp 59-61.
- Li, Y. and R.T. Lovell (1985) : Elevated level of dietary ascorbic acid increased immune responses in channel catfish. *J. Nutrition*, 115 : 123 - 131.

- Lavilla-Pitogo, C.R., M.C.L. Baticados, E.R. Crus-Lazierda and L.D. dela Pena (1990) : Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philliphines. *Aquaculture*. 91: 1-13.
- Lightner, D.V., T.A. Bell, R.M. Redman (1990) : A review of the known host, geographic range and current diagnostic procedure for the virus disease of cultured penaeid shrimp. *Actes de Colloquia 9* : 113-126.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L.Farr and R.J.Randall (1951) : Protein measurement with the folin fenol reagent. *J.Biol. Chemistry* 193 : 265- 275.
- Lowrie, D.B., P.S.Jackett and P.W.Andrew (1985) : Activation of macrophage for antimicrobial activity. *Immunology Letter*, 11 : 195 - 203.
- Main, K.L. and C. Rosenfeld (1994) : Cultured of high value marine fishes in Asia and the United States. The Oceanic Institute, Hawaii, pp 3 - 44.
- Mori, K., T.Nakai , M. Nagahara, K. Muroga, T. Mekuchi and T.kanno (1991) : A viral disease in hathery-reared larvae and juvenils of redspot grouper. *Fish Pathol.* 26 : 209-210.
- Mori, K., T.Nakai , M. Arimoto, K. Muroga, K. Mushiake and I. Furuzawa (1992) : Properties of a virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack *Pseudocaranx dentex* with nervous necrosis. *Virology* 187 : 368-371.
- Munday, B.L., J.S. Langdon, A.Hyatt and D.Humphrey (1992) : Mass mortality associated with a viral-induced vacuolating encephalopathy and retinopathy of larval and juvenil barramundi, *Lates carcarifer* Bloch. *Aquaculture* 103 : 197-211.
- Munday, B.L. and T. Nakai (1997) : Special topic review : nodavirus as pathogen in larval and juvenil marine finfishi. *World J. Microbio and Biotech.* 13 : 375-381.
- Mushiake, K. , M.Arimoto, T. Furusawa, T. Nakai and K. Muroga (1993) : Viral nervous necrosis (VNN) of striped jack : effect of plasma antibody level of spawner and spwning condition on the

- occurrence of the disease in their offspring. *Suisanzoshoku* 41 : 327-332.
- Murjani, M. (2004) : El maut itu bernama Vibrosis. *Trubus* vol 35 : 118-119.
- Muroga, K., T. Furuzawa and I. Furuzawa (1998) : A review : viral nervous necrosis in striped jack, *Pseudocaranx dentex*. *Suisan Zoushoku* 46 (4) : 473-480.
- Momoyama, K. (1988) : Infection source of baculoviral midgland necrosis (BMN) in mass production of Kuruma shrimp larvae, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol.*, 23: 105-110.
- Mushiake, K., T.Nishizawa, T. Nakai, I. Furuzawa and K. Muroga (1994) : Control VNN in striped jack : selection of spawner base on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR). *Fish Pthol.*, 29 : 177-182.
- Nagelkerke, L.A.J, M.C.Pannevis, D.F. Houlihan and C.J. Secombes (1990) : Oxygen uptake of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, phagocyte following stimulation of the respiration burst. *J. Exp Biol.*, 154 : 339-353.
- Nishizawa, T., M. Fusuhashi, T. Nagai, T. Nakai and K. Muroga (1997) : Genomic classification of fish nodavirus by molecular phylogenetics analysis of the coat protein gene. *Appl. Environ.Microbiol* 63 : 1633-1636.
- Nakatsugawa, T., T.Nagai, K.Hiya, T.Nishizawa and K. Muroga (1999) : A virus isolated from juvenile Japanese black abalone *Nordotis discus discus* affected with amyotrophia. *Dis.Aquat.Org.* 36 : 159-161.
- Nakai, T., K. Mori, M. Arimoto and K . Muroga (1995) : Neutralising antibody production in striped jack immunized with a recombinant coat protein of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). In :
- Nishizawa, T., K. Mori, T. Nakai, I.Furuzawa and K.Muroga (1994) : Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis.Aquat. Org.* 15 :34-39

- Nishizawa, T., R.takano, K.Muroga (1999) : Mapping a neutralizing epitope on the coat protein of stripped jack necrosis virus. *J.Gen.Virology* 80 : 3023-3027.
- Nakai, T., T. Kanno, E.R.Cruz and K. Muroga (1987) : The effects of iron compounds on the virulence of *Vibrio anguillarum* in Japanese eel and ayu. *Fish Pathology*, 22 : 185 - 189.
- Nishizawa, T., T. Nakai, K. Mori, I.Furuzawa and K. Muroga (1997) : Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis. Aquat.Org.* 18: 103-107.
- Olivier, G., T.P.T. Evelyn and R. Lallier (1985) : Immunity to *Aeromonas salmonicida* in coho salmon *Onchorynchus kisutch* induced by modified Freund's complete adjuvant: its non-specific nature and probable role of macrophage in the phenomenon. *Development and Comparative Immunology*, 9 : 419 - 432.
- Olivier, G., C.A. Eaton and N. Campell (1986) : Interaction between *Aeromonas salmonicida* dan peritoneal macrophages of brook trout *Salvelinus fontinalis*. *Veterinary Immunization and Immunopathology*, 9 : 223 - 234.
- Peck, R. (1985) : A one-plate assay for macrophage bacterial activity. *J. Immunological Methods*, 83 : 131 - 140.
- Pickering, A.D. and T.G.Pottinger (1989) : Stress response and disease resistance in salmonid fish : effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiologi dan Biochemistry*, 7 : 253 - 258.
- Pickering, A.D (1990) : Stress and the suppression of somatic growth in teleost. In *Progress in Comparative Immunology*. Ed. by Epple, A., C.G. Scannes and M.H. Stetson, pp 473 - 479.
- Perkin, B.A.W., N. Chansue and D.W. Verelle (1995) : Assays of immune function in shrimp phagocytes : Technique used as indicator of pesticide exposure. In "Techniques in Fish Immunology-4" Eds by J.Stolen et al., 1995. SOS Publication. Fair Haven .USA.
- Pottinger, T.G., and A.D. Pickering (1990) : The effects of cortisol administration on hepatic and plasma estradiol binding capacity in immature female rainbow trout *Onchorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, 80 : 264 - 273.

- Robert, R.J. and M.T. Horne (1978) : Bacterial meningitis in farmed rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson, affected with chronic pancreatic necrosis. J. Fish Diseases. 1 : 157 - 164.
- Salati, F., K. Watanabe, K.Kawai and R.Kusuda (1989) : Immune response of ayu against *Vibrio anguillarum* Lipopolysaccharide. Nippon Suisan Gakkaishi, 19 : 45 - 49.
- Smith, P.D. (1982) : Analysis of the hyperosmotic and bath methods for fish vaccination -comparison of uptake of particulate and non particulate antigens. Dev. Comp. Immunol. Suppl., 2 : 181 - 186.
- Secombes, C.J. and T.C Fletcher (1992) : The role of phagocytes in the protective mechanism of fish. Annu. Rev. Fish. Dis. 2 : 53-71.
- Secombes, C.J. (1994) : Macrophage activation in fish. Modulat Fish immune Response 1 : 49-57.
- Sommerset, I., S. Husgard, and A.H. Nerland (2001) : Development of vaccine against nodavirus affecting Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. In 10 th International conference of the European Association of Fish Pathologist, Dublin Ireland.
- Sommerset, I., S. Kern, E. Biering, H. Bleie, I. Uglenes Fiksdal, S. Grove and A.H. Nerland (2005) : Protection against halibut nodavirus in turbot is induced by recombinant capsid protein vaccination but not following DNA vaccination. Fish and Shellfish Immunol., 18 : 13-29.
- Suprpto, H., T. Hara, T. Nakai and K. Muroga (1996a) : Purification of a lethal toxin of *Edwardsiella tarda*. Fish Pathology 31 : 203 - 207.
- Stave, J.W., B.S. Roberson and F.M.Hetrick (1984) : Factors affecting the chemilumi-nescenct response of fish phagocytes. J. Fish Biol., 25 : 197 - 200.
- Sumpter, J.P., H.M. Dye and T.J. Bemfey (1986) : The effects of stress on plasma ACTH,  $\alpha$ -MSH and cortisol level in salmonid fishes. General and Comparative Endocrinology, 62 : 377 - 385.
- Song, Y.L. and Y.T. Hsieh (1994) : Immunostimulan of tiger shrimp *Penaeus monodon* hemocyte for generation of microbial substances : Analysis of reactive oxygen species. Develop and Comp Immunol 18:201-209.



- Sung, H.H., G.H.Kou, Y.L. Song (1994) : Vibriosis resistance induce by glucan treatment in tiger shrimp *Penaeus monodon*. Fish Pathol., 29:11-17.
- Sung, H.H., Y.L.Yans, Y.L.J. Song (1996) : Enhancement of microbial activity in the tiger shrimp *Penaeus monodon* via immunostimulation. J. Crustacean Biol 16:278-284.
- Soderhall, K. and L. Cerenius (1992) : Crustacean Immunity. Ann rev fish Dis 2:3-23.
- Soderhall, K. (1982) : Prophenoloxidase activating system and melanization- a recognition system of arthropods. A review. Develop.Comp.Immunol 6:601-611.
- Soderhall, K. (1992) : Biochemical and molecular aspects of cellular communication in arthropods. Boll.Zool 59:141-151.
- Soderhall, K., A. Aspan, B. Duvic (1990) : The proPO system and associated protein – Role in cellular communication in arthropods. Res Immunol 141: 896-907.
- Soderhall, K. W. Rogener, I. Soderhall, R.P.Newton , N.A. Ratcliffe (1988) : The properties and purification of a *Blaberus craniifer* plasma protein which enhances the activation of hemocyte prophenoloxidase by  $\beta$ -1, 3-glucan. Insect Biochem. 18:323-330.
- Soderhall, K., L.cerrenius, M.W.Johansen (1994) : The prophenoloxidase activating system and its role in intervertebrate defense. Ann NY Acad Sci 712:155-161.
- Tanaka, S., K. Mori, M. Arimoto and T.Nakai (2001) : Protective immunity of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis. J.Fish.Dis. 24 : 75-85.
- Tanaka, S., K. Mori, M. Arimoto, T. Iwamoto, T. Nakai (2001) : Protective immunity of sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* Thurnberg, against experimental viral nervous necrosis. J. Fish Dis., 8 : 15-22.
- Takahasi, Y., T. Itami and M. Kondo (1995) : Immunodefense system of crustacea. Fish Pathology, 30 : 141 - 150.

- Takahashi, Y., T. Itami, M. Maeda and M. Kondo (1998) : Bacterial and viral disease of kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan. Fish Pathol., 33 : 357 - 365.
- Takano, R., T.Nishizawa, M.Arimoto and K.Muroga (2000) : Isolation of viral haemorrhagic septicemia virus (VHS) from wild Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Bull.Eur.Ass Pathol., 20 (5) :186-192.
- Takano, R., K. Mori, T.Nishizawa, M.Arimoto and K.Muroga (2001) : Isolation of viruses from wild Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish Pathol., 36 : 153-160.
- Tang, L., C.S. Lin, N.K. Krisna, M. Yeager, A. Schneemann and J. E. Johnson (2002) : Virus like-particles of fish nodavirus display a capsid subunit domain organization different from that of insect nodavirus, J. Virol. 76 : 6370-6375.
- Thiery, R., J.Cozien, J. Cabon, F. Lamour, M. Baud and A. Schneemann (2006) : Induction of protective immune response against Viral Nervous Necrosis in the European Sea bass *Dicentrarchus labrax* by using Betanodavirus-like particles. J.Virol., 80 : 10201-10207.
- Thorburn, M.A. and E.Jansson (1988) : The effects of booster vaccination and fish size on survival and antibody production following *Vibrio* infection of bath-vaccinated rainbow trout *Salmo gairdneri*. Aquaculture 71: 285 - 291.
- Towbin, H., T.Staehelin and J. Gourdon (1979) : Electrophoresis transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad.Sci. USA, 76 : 4350 - 4354.
- Towbin, H., T.Staehelin and J. Gourdon (1979) : Electrophoresis transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad.Sci. USA, 76 : 4350 - 4354.
- Valle, D.L., E. Negrisola, L. Patarnello, L. Zanella, C. Maltese, G. Bovo and L. Colombo (2001) : Sequence comparison and

- phylogenetic analysis of fish nodavirus base on the coat protein gene. *Arch. Virol.* 146 : 1125-1137.
- Vargas-Albores, F (1995) : The defense system of brown shrimp *Penaeus californiensis* : Humoral recognition cellular responses. *J.mar Biotechnol* 3: 153-156.
- Vargas-Albores, F., A Guzman Murillo, J.L.Ochoa (1993) : A lipopolysaccharide-binding protein agglutinin isolated from brown shrimp *Penaeus californiensis* HOLMES haemolymph. *Comp Biochem Physiol* 194A: 407-413.
- Whyte, S.K., L.H. Chappel and C.J. Secombes (1989) : Cytotoxic reaction of rainbow trout macrophage for larvae of the eye fluke *Diplostomum spathaceum* (Digenea). *J.Fish Biol.*, 35 : 333-345.
- Weppe, M., J.R. Bonami, D.V.Lightner (1992) : Demostracion de las altas cualidades de la cepa de *P. stylirostris* (AQUACORP 43) resistente al virus IHHNV. In "Proceeding of the "Primero Congreso Equatorino de Acuicultura" (ed by J.Calderon and L.Shartz, October 19-23, 1992, Guayaquil, Ecuador, pp 229-232.
- Yoshikoshi, K. and K. Inoue (1990) : Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juvenile of Japanese parrotfish *Opelgnathus fasciatus* (Themminck and Schlegel). *J.Fish.Dis.* 13 : 69-77.
- Zafran, T. Harada, I. Kusharyani, K.Yuasa and K. Hatai (1998) : Indonesian hatchery reared seabass larvae *Lates carcarifer*, associated with viral nervous necrosis (VNN). *Indon.Fish.Res. J.* 4 : 19-22.
- Zafran, I. Kusharyani, F. Jhonny, T. Harada, K.Yuasa and K. Hatai (1998) : Viral nervous necrosis in humpback grouper *Epinephelus fuscoguttatus* larvae and juvenile in Indonesian. *Fish Pathol.*, 35 : 95-96.