



## Efektifitas *Nannochloropsis* sp. terhadap sistem imun non-spesifik ikan mas *Cyprinus carpio* yang diinfeksi Virus Herpes

### *Effectiveness Nannochloropsis sp. on non-specific immun system of the common carp Cyprinus carpio infected by Herpesvirus*

**Arafik Lamadi**

Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Negeri Gorontalo, Jl. Jenderal Sudirman No. 6 Kota Gorontalo 96128, Indonesia; Email Korespondensi : arafik\_lamadi@ung.ac.id

**Abstract.** *The aim of this research was to determine the effect of Nannochloropsis sp. against the common carp (Cyprinus carpio) leukocyte profile, infected with Koi Herpesvirus (KHV). The descriptive observational method was used in this study. This research was conducted for 4 weeks, using common carp length  $12 \pm 0,3$  cm as many as 7 fish. The tested experiment was P1: without infested by Nannochloropsis sp. and KHV; P2: Infested by Nannochloropsis sp. and without KHV infected; P3: Infested by Nannochloropsis sp. and KHV; P4: Not infested by Nannochloropsis sp. and infected by KHV. Every treatment in three replications. The results showed that the highest total leukocyte was obtained in P3 (37.600 cells/ml), followed by P4 (29.650 cells / ml), P2 (28.500 cells / ml) and P1 (21.150 cells / ml). Leukocyte differentiation test on P1 (neutrophil 6.2%, lymphocyte 68.0%, monocyte 17.0%), P2 (neutrophil 6.6%, lymphocyte 72.3%, monocyte 18.3%), P3 (neutrophil 7.9%, lymphocyte 66.1%, monocytes 24.3%), P4 (neutrophils 11.2%, lymphocytes 57.6%, monocytes 37.6%). The higher survival rate was recorded in P2 (100%). It is concluded that Nannochloropsis sp. can enhance the common carp immune system.*

**Keywords:** Common carp, Nannochloropsis sp., Koi Herpesvirus

**Abstrak.** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian *Nannochloropsis* sp. terhadap profil leukosit ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang terinfeksi *Koi Herpes Virus* (KHV). Penelitian ini menggunakan metode deskriptif observasional dengan membandingkan hasil pada perlakuan 1) P1: (tanpa pemberian *Nannochloropsis* sp. dan tidak diinfeksi KHV), 2) P2 (diberikan *Nannochloropsis* sp dan tanpa diinfeksi KHV), 3) P3 (diberikan *Nannochloropsis* sp dan diinfeksi KHV), 4) P4 (tanpa pemberian *Nannochloropsis* sp. dan diinfeksi KHV), masing-masing perlakuan 3 kali ulangan. Penelitian ini dilakukan selama 4 minggu dengan menggunakan Ikan mas berukuran  $12 \pm 0,3$  cm sebanyak 120 ekor. Hasil perhitungan total leukosit tertinggi diperoleh pada P3 (37.600 sel/ml), selanjutnya berturut-turut P4 (29.650 sel/ml), P2 (28.500 sel/ml) dan P1 (21.150 sel/ml). Hasil uji diferensiasi leukosit pada P1 (neutrofil 6.2%, limfosit 68.0%, monosit 17.0%), P2 (neutrofil 6.6%, limfosit 72.3%, monosit 18.3%), P3 (neutrofil 7.9%, limfosit 66.1%, monosit 24.3%), P4 (neutrofil 11.2%, limfosit 57.6%, monosit 37.6%). Kelangsungan hidup tertinggi diperoleh pada perlakuan P2 (100%). Dapat disimpulkan bahwa *Nannochloropsis* sp. dapat digunakan untuk meningkatkan kekebalan tubuh ikan mas.

**Kata kunci:** Ikan mas, *Nannochloropsis* sp., Koi Herpes Virus

### Pendahuluan

Beberapa dekade terakhir ini, berbagai penyakit baru muncul akibat adanya perubahan iklim secara global. Salah satu penyakit yang sering menyerang ikan mas dalam kegiatan budidaya adalah *Koi Herpes Virus* (KHV). Virus Herpes pada ikan mas pertama kali dilaporkan pada tahun 1995, tetapi baru diketahui pada tahun 2006 setelah teknik analisisnya ditemukan (Goodwin, 2012). Serangan KHV dapat menyebabkan kematian masal dan bersifat sporadis pada ikan koi dan mas (Hedrick *et al.*, 2000).

Gejala klinis ikan yang terserang KHV adanya pendarahan pada insang, mata cekung dan pergerakan ikan gelisah (kadang tidak aktif berubah menjadi sangat aktif atau sebaliknya)



(OATA, 2001). KHV menyerang seluruh stadia ikan, namun studi kohabitasi menunjukkan bahwa stadia benih lebih mudah terserang dibandingkan ikan dewasa (Perelberg *et al.*, 2003).

Penanggulangan KHV sudah banyak dilakukan dengan menggunakan berbagai macam bahan obat-obatan dan bahan kimia. Penanggulangan dengan cara ini tidak efisien dan efektif sebab tingginya biaya yang dikeluarkan tidak dapat mengatasi serangan KHV bahkan hanya dapat mengatasi infeksi sekunder yang disebabkan oleh bakteri, parasit dan jamur. Oleh karenanya perlu diupayakan alternatif untuk dapat mengatasi permasalahan tersebut.

*Nannochloropsis* sp. dapat digunakan sebagai bahan alternatif untuk mengatasi infeksi KHV, sebab *Nannochloropsis* sp. mengandung *peridinin* yang diketahui dapat meningkatkan sistem pertahanan tubuh ikan. Kusuma (2013) menyatakan *peridinin* dapat meningkatkan sistem imun ikan yang terinfeksi virus. *Nannochloropsis* sp. mudah dibudidayakan dan dapat digunakan sebagai pakan alami ikan.

## **Bahan dan Metode**

### **Tempat dan waktu**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Universitas Negeri Gorontalo dan Balai Benih Ikan Air Tawar Kota Gorontalo pada bulan April sampai dengan Agustus 2017.

### **Persiapan wadah dan ikan uji**

Wadah yang digunakan dalam penelitian ini adalah akuarium kaca berukuran 50 x 30 x 30 cm. Ikan mas yang digunakan berukuran  $12 \pm 0,3$  cm sebanyak sebanyak 120 ekor, dibagi menjadi 4 perlakuan dengan masing-masing 3 kali ulangan. Ikan diaklimatisasi terlebih dahulu selama 7 hari dan diuji dengan perlakuan sebagai berikut:

P1: tanpa pemberian *Nannochloropsis* sp. dan tidak diinfeksi KHV (kontrol negatif)

P2: dengan pemberian *Nannochloropsis* sp. dan tanpa diinfeksi KHV

P3: dengan pemberian *Nannochloropsis* sp. dan diinfeksi KHV

P4: tanpa pemberian *Nannochloropsis* sp. dan diinfeksi KHV (kontrol positif)

### **Isolasi peridinin *Nannochloropsis* sp.**

Prosedure analisis mengikuti Kusuma (2013) sebagai berikut; *Nannochloropsis* sp. dalam bentuk pasta sebanyak 50 gram, diletakkan di mortar dan digerus selama 1 jam, kemudian ditambahkan nitrogen cair dan digerus lagi selama 30 menit. Selanjutnya ditambahkan buffer resuspensi Glysin+ KCL sebanyak 8 ml. Kemudian sampel ditimbang sebanyak 2 gram dan dimasukkan dalam tabung ependof, kemudian disentrifuse dingin 4 °C, 17000 rpm selama 60 menit. Supernatan diambil dan diletakkan pada tabung ependof steril. Supernatan ditambahkan dengan larutan solid amonium sulfat (SAS) 30% dari supernatan. Setrifuse 15000 rpm ; 4 °C ; 30 menit. Pindahkan supernatan pada ependof steril.

### **Pembuatan suspensi KHV**

Prosedure pembuatan suspensi KHV mengikuti Hameed *et al.* (1997) sebagai berikut; Ikan yang positif terinfeksi KHV diambil insangnya diletakan di mortar dan digerus sampai halus kemudian disuspensikan dengan 8 ml larutan fisiologis. Hasil suspensi organ disaring dengan kain kasa kemudian disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit, kemudian disentrifuge lagi dengan kecepatan 8000 rpm selama 5 menit. Pindahkan supernatan pada ependof steril.

### **Parameter**

#### *Kelangsungan hidup ikan*

Pengamatan kelangsungan hidup ikan dimulai pada saat awal ikan diberi perlakuan sampai akhir penelitian. Kelangsungan hidup ikan dihitung dengan persamaan menurut Muchlisin *et al.* (2016):

$$SR = [(N_0 - N_t) / N_0] \times 100$$

Dimana, SR adalah tingkat kelangsungan hidup (%),  $N_t$  adalah jumlah ikan yang mati selama penelitian (ekor) dan  $N_0$  adalah jumlah ikan yang hidup pada awal pengamatan (ekor)

### Perhitungan leukosit

Prosedur perhitungan leukosit mengikuti Klontz (1994). Perhitungan leukosit dimulai dengan membilas tabung eppendorf dengan natrium sitrat untuk menghindari pembekuan darah. Darah diambil dari vena caudal, ikan disuntik dari belakang anal samapai menyentuh tulang vertebrae, kemudian dihisap perlahan dan dimasukkan ke dalam eppendorf.

Sampel darah diambil dengan menggunakan alat hisap leukosit kemudian dimasukkan kedalam haemocytometer dan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Leukosit dihitung dengan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Total Leukosit} = \sum n \times 50 \text{ sel/ml}$$

Dimana,  $\sum n$  adalah jumlah total leukosit pada 4 lapang pandang dan 50 sel/ml adalah faktor pengenceran pembuatan preparat ulasan darah

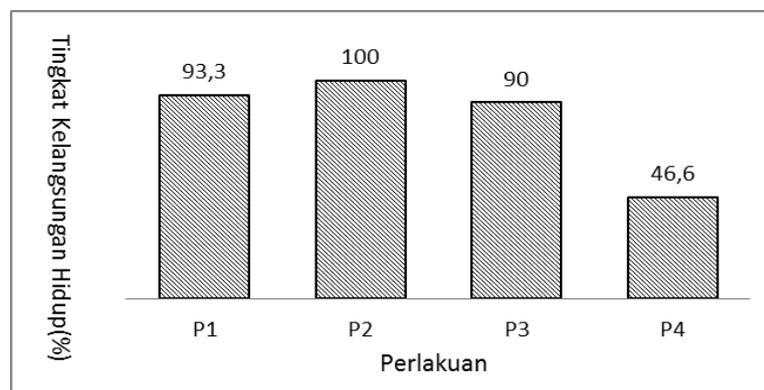
### Pembuatan preparat ulasan darah

Pembuatan preparat ulasan darah mengikuti Svobodova dan Vyukusova, (1991), sebagai berikut; sampel darah diteteskan pada objek glass kemudian diratakan dan dikering udarakan, setelah itu difiksasi dengan metanol. Slanjutnya dibilas dengan akuades, dikerigkan kemudian diwarnai dengan giemsa. Kelebihan warna dicuci dengan menggunakan air mengalir.

## Hasil dan Pembahasan

### Kelangsungan hidup

Nilai kelangsungan hidup tertinggi diperoleh pada P2 yaitu mencapai 100%. Pemberian Peridinin *Nannochloropsis* sp. diduga dapat meningkatkan kesehatan ikan. Dahoklory *et al.*, (2014) menyatakan, bahwa pemberian peridinin dapat meningkatkan daya tahan tubuh dan kesehatan ikan. Tingkat kelangsungan hidup dapat dilihat pada Gambar 1. Hasil yang berbeda didapatkan pada P1 (93,3%), perlakuan ini tanpa diberi peridinin sehingga hasil yang diperoleh lebih rendah jika dibandingkan dengan P2 yang diberi peridinin, hal ini diduga karena ikan yang dipelihara tanpa asupan imunostimulan, tingkat kelangsungan hidupnya relatif lebih rendah jika dibandingkan dengan ikan yang diberi imunostimulan, hal ini sesuai dengna penelitian Rudyanti dan Ekasari (2009) yang menyatakan tingkat kelangsungan hidup ikan mas tanpa diberi imunostimulan adalah kurang dari 95%.



Gambar 1. Tingkat kelangsungan hidup ikan mas setelah perlakuan

Perhitungan tingkat kelangsungan hidup pada P3 adalah 90%. Pemberian peridinin *Nannochloropsis* sp. diduga dapat meningkatkan sistem pertahanan tubuh ikan mas terhadap serangan KHV. Sesuai dengan hasil penelitian Dahoklory *et al.*, (2014) yang menyatakan bahwa pemberian peridinin dapat meningkatkan sistem imun sehingga dapat mempertahankan tubuh ikan dari serangan virus. *Nannochloropsis* sp. mengandung beberapa bahan aktif yang salah satunya adalah terpenoid. Terpenoid adalah fraksi minyak esensial yang

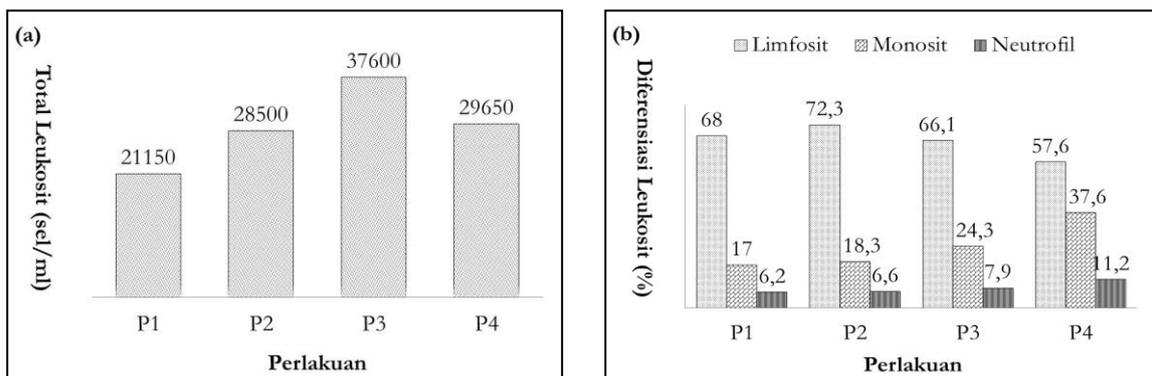
merupakan metabolit sekunder yang kaya akan senyawa dengan struktur isoprene dan mengandung elemen tambahan biasanya oksigen. Terpen atau terpenoid aktif terhadap bakteri, fungi, virus, dan protozoa (Masitoh, 2009).

Tingkat kelangsungan hidup terendah diperoleh pada P4 yaitu 46,6 %, penyebabnya diduga karena serangan KHV yang bersifat ganas dan dapat menyebabkan kematian masal. Sesuai dengan hasil penelitian Mustahal dan Kirana (2006) yang menyatakan ikan mas yang terinfeksi KHV hanya dapat bertahan hidup sekitar 20-60%. Ikan yang mati pada P3 dan P4 memiliki ciri fisik ikan yang terserang KHV, seperti produksi lendir berlebihan, insang berwarna, terjadi *hemorrhage* di sekitar pangkal dan ujung sirip serta permukaan tubuh lainnya, adanya kulit melepuh, hati dan ginjal berwarna pucat (Setyorini *et al.*, 2008)

### Leukosit

Leukosit sering disebut sel darah putih yaitu darah yang mengandung inti (Fujaya, 2008). Leukosit merupakan komponen darah yang berperan dalam sistem imun tubuh. Leukosit berperan untuk mengatasi tubuh dari serangan benda asing serta patogen dengan respon imun yang dimiliki (Moyle dan Cech, 2004). Hasil pengamatan leukosit darah ikan mas pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 2. Total leukosit tertinggi didapatkan pada P3 (37.600 sel/ml), hasil ini diduga karena pemberian *Nannochloropsis* sp. dapat meningkatkan sistem imun sehingga produksi sel leukosit didalam tubuh dapat meningkat. Total leukosit pada P4 (29.650 sel/ml), perlakuan ini merupakan total leukosit tertinggi ke dua, hal ini diduga karena kedua perlakuan ini (P3 dan P4) dilakukan infeksi KHV sehingga produksi leukosit meningkat, hal ini sesuai dengan penelitian Moyle dan Cech (2004) yang menyatakan, ikan yang terinfeksi penyakit akan memproduksi leukosit dengan jumlah yang lebih banyak untuk melakukan fagositosis dan mensintesis antibodi.

Total leukosit pada P2 (28.500 sel/ml), hasil ini lebih tinggi dari P1 (21.150 sel/ml). Hasil yang lebih tinggi ini karena adanya pemberian imunsotimulan berupa *Nannochloropsis* sp. dapat meningkatkan produksi leukosit, sehingga sistem imun ikan akan lebih siap apabila ada serangan antigen asing (Widyaningrum *et al.*, 2017)



Gambar 2. Hasil pengamatan leukosit darah ikan mas (a) total leukosit (sel/ml) (b) diferensiasi leukosit (%)

Diferensiasi leukosit yang diamati adalah persentasi neutrofil, limfosit dan monosit. Persentasi limfosit tertinggi didapatkan pada P2 (72,3%). Nilai ini didapatkan sebab *Nannochloropsis* sp. mengandung beberapa jenis nutrisi diantaranya adalah protein asam lemak, fikobilin, karoten, enzim, sterol, vitamin dan polisakarida (Harun *et al.*, 2010). Polisakarida dapat meningkatkan sistem imun dengan menginduksi sel-sel pembentuk leukosit sehingga tubuh akan memproduksi lebih banyak leukosit yang salah satu jenisnya adalah limfosit (Widyaningrum, 2017)



Limfosit terendah didapatkan pada P4 (57,6 %), nilai ini didapat sebab serangan adanya infeksi KHV pada perlakuan ini. Fujaya (2008) menyatakan serangan penyakit dapat menurunkan konsentrasi antibodi sehingga menyebabkan ikan kekurangan limfosit. Persentasi monosit P4 (37,6 %) dan P3 (24,3 %), pada kedua perlakuan ini ikan diinfeksi KHV sehingga menghasilkan persentasi monosit tertinggi, hal ini dikarenakan tubuh ikan melakukan respon terhadap infeksi KHV yang dalam hal ini dilakukan oleh monosit yang berfungsi sebagai antiviral (Baratawidjaja dan Iris, 2010). Sedangkan presentasi monosit pada P1 (17 %) dan P2 (18,3 %) lebih rendah karena pada perlakuan ini tidak dilakukan infeksi KHV.

Persentasi neutrofil tertinggi didapatkan pada P4 (11,2 %) dan P3 (7,9 %), karena pada perlakuan ini dilakukan infeksi KHV. Neutrofil adalah sel pertama yang dikerahkan tubuh untuk mengatasi antigen asing (Baratawidjaja dan Iris, 2010). Sedangkan nilai yang lebih rendah didapatkan pada P1 (6,2 %) dan P2 (6,6 %), yaitu perlakuan yang tidak diinfeksi KHV. Monosit dan neutrofil memiliki peran sebagai fagosit kuat. Diketahui satu neutrofil dapat memfagosit 20 antigen sedangkan monosit mampu memfagosit hingga 100 antigen sebelum sel tersebut menjadi tidak aktif (Fujaya, 2008). Persentasi monosit dan neutrofil relatif lebih sedikit jika dibandingkan dengan limfosit sebab monosit dan neutrofil merupakan sel yang berumur pendek sehingga jumlah sel tersebut di dalam darah lebih sedikit (Setiawan *et al.*, 2012)

### **Kesimpulan**

Pemberian peridinin *Nannochloropsis* sp. dapat meningkatkan total leukosit dan berpengaruh terhadap diferensiasi leukosit yaitu limfosit, monosit dan neutrofil pada ikan mas *Cyprinus carpio* yang diinfeksi *Koi Hepes Virus* (KHV). Peridinin *Nannochloropsis* sp. dapat diaplikasikan dalam kegiatan budidaya untuk meningkatkan sistem imun ikan mas.

### **Daftar Pustaka**

- Ornamental Aquatic Trade Association. 2001. Koi herpesvirus. OATA, United Kingdom:10-16.
- Baratawidjaja, K.G., R. Iris. 2010. Imunologi dasar. Balai Penerbit FKUI, Jakarta.
- Dahoklory, N., Y. Uun, Sukoso, S. Permana. 2014. The profile of gill expression of humpback grouper (*Cromileptes altivelis*) injection with Per-Cp of *Halimeda opuntia* and Viral Nervous Necrosis. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 8 (10): 145-151.
- Fujaya, Y. 2008. Fisiologi ikan. Rineka Cipta, Jakarta
- Goodard, S. 1996. Feed manajement in intensive aquaculture. Chapman and Hall, New York.
- Goodwin, A. 2012. Herpesviruses in fish. Southern Regional Aquaculture Center Publication No. 4710. May 2012:1-7.
- Hameed, A.S.S., M.L. Anikuma, S. Raj, K. Jayaraman. 1997. Studies on the pathogenicity of systemic octodermal and mesodermal baculovirus and its detection on shrimp by immunological methods. Aquaculture, 160: 31-35.
- Harun, R., M. Singh, G.M. Forde, and M.K. Danquah. 2010. Bioprocess Engineering of Microalgae to Produce a Variety of Consumer Products. Renewable and Sustainable Energy Reviews. Vol. 14: 1037-1047
- Hedrick, R.P., O. Gilad, S. Yun, J.V. Spangenberg, G.D. Marty, R.W. Nordhausen, M.J. Kebus, H. Barcovier, A. Eldar. 2000. A Herpesvirus associated with mass mortality of juveniles and adult koi, a strain of common carp. Journal of Aquaculture and Animal Health, 12: 44-57.
- Kusuma, R.O. 2013. Ekspresi protein P56 pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) sebagai respon anti viral vnn dengan pemberian PCP (Peridinin Clorofil Protein). Tesis, Universitas Brawijaya, Malang.



- Klontz, G.W. 1994. Fish hematology. Departemen of Fish and Wildliferesource, University of Idaho, Idaho.
- Masitoh, M.M. 2009. Pengaruh pemberian bahan aktif ekstrak *Nannochloropsis oculata* sebagai antioksidan pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) yang terinfeksi bakteri *Vibrio alginolyticus*. Skripsi, Universitas Brawijaya, Malang.
- Moyle, P.P., J.J. Cech. 2004. Fishes: an introduction to ichthyology, Fifth Edition. Prentice Hall, New Jersey.
- Muchlisin, Z. A., A.A. Arisa, A.A. Muhammadar, N. Fadli, I.I. Arisa, M.N. Siti-Azizah. 2016. Growth performance and feed utilization of keureling (*Tor tambra*) fingerlings fed a formulated diet with different doses of vitamin E (alpha-tocopherol). Archives of Polish Fisheries, 23: 47-52.
- Mustahal, M., C. Kirana. 2006. Pengujian penyakit *Koi Herpes Virus (KHV)* pada beberapa ikan budidaya. Jurnal Ilmu-ilmu Perairan dan Perikanan Indonesia, 13(1): 21-26.
- Perelberg A, M. Smirnov, M. Hutoran, A. Diamant, Y. Bejerano, M. Kotler. 2003. Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured *Cyprinus carpio* in Israel. Israel Journal of Aquaculture Bamidgeh, 55: 5-12.
- Rudiyanti, S., D.E. Asri. 2009. Pertumbuhan dan survival rate ikan mas (*Cyprinus carpio*) pada berbagai konsentrasi reagent 0,3 g. Jurnal Saintek Perikanan, 5(1): 49-54.
- Setiawan, R.B., D. Iriana, Rosidah. 2012. Efektivitas vaksin dari bakteri (*Mycrobacterium furuitum*) yang diinaktifasi dengan pemanasan untuk pencegahan penyakit *Mycrobacterium* pada ikan gurame *Ospronemus gouramy*. Jurnal Perikanan dan Kelautan, 3 (1): 25-40.
- Setyorini, N., K. Asmaul, W. Lilia. 2008. kelangsungan hidup ikan koi (*Cyprinus carpio*) yang terinfeksi Koi Herpes Virus. Berkala Ilmiah Perikanan, 3(1): 57-65.
- Svobodova, Z., B. Vyukusova. 1991. Diganostik, prevention and therapy of fish disease and intoxicant. Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology Vodnany Czechoslovakia. <http://www.fao.org/fi/website/firetriveaction.do?dom=topic&fid=16064&lang=en>. Akses tanggal 20 Juli 2017.
- Widyaningrum, H., I.S.S. Basar, S. Priyo. 2017. Diferensiasi leukosit ikan gurami (*ospronemus gouramy* Lac.) dengan perbedaan level suplementasi *Spirulina platensis* dalam pakan. Scripta Biologica, 4(1): 37-40.

Recieved: 23 August 2017

Accepted: 15 November 2017

*How to cite this paper:*

Lamadi, A. 2017. Efektifitas *Nannochloropsis* sp. terhadap sistem imun nonspesifik ikan mas *Cyprinus carpio* yang diinfeksi Virus Herpes. Depik, 6(3): 259-264.