



**THE EFFICACATION OF BLACK CUMMIN (*Nigella sativa*) AS
IMMUNOSTIMULANT IN HUMPBACK GROUPEP (*Cromileptes altivelis*)
AGAINTS VNN (VIRAL NERVOUS NECROSIS) INFECTION**

Tarsim ,Agus Setyawan, , Esti Harpen¹ dan Asry Retno Pratiwi

¹)Department of Aquaculture, Faculty of Agriculture, University of Lampung
Surel : tarsim@gmail.com

ABSTRACT

Black cummin (*N. sativa*) was known as immunostimulant in human and animals. This research aims to know the efficacy of black cummin as immunostimulant in humpback grouper (*C. altivelis*) againts VNN infection. The humpback grouper (± 9 cm) was grupeped in four treatments based on black cummin concentration i.e. 0%, 2,5%, 5%, and 7,5% in fish feed (v/v). Fish was cultivated in tank (50x50x50 cm³) with continous aeration and fed 4% ABW (average body weight) with commersial feed twice daily. Challenge assay was conducted with infected VNN extract that collected from VNN-infection fish from Situbondo, East Java. Relative percent survival (RPS) fish was calculated between black cummin stimulated-fish and control that infected with VNN five days post infection. Result showed that adding 7,5% (v/v) black cummin in fish feed was the best treatment that protect humpback grouper from VNN infection with RPS value 100%.

Keywords : black cummin, humpback grouper, VNN, immunostimulant, RPS

PENDAHULUAN

VNN merupakan salah satu penyakit infeksi mematikan pada ikan-ikan jenis kakap dan kerapu yang disebabkan oleh virus NNV. Virus tersebut mampu menyebabkan kematian massal hingga 100% dalam waktu singkat. Hal ini disebabkan karena NNV menyerang sistem saraf dan penglihatan ikan. Oleh karena itu, VNN termasuk dalam salah satu daftar penyakit penting OIE (*Office International des Epizooties*) dan keberadaannya telah mewabah hampir di seluruh dunia (Maeno *et al.*, 2007).

Hingga saat ini, infeksi VNN masih sering muncul di sentra budidaya kerapu di Indonesia, termasuk di antaranya adalah di wilayah Provinsi Lampung. Data hasil pemantauan Hama Penyakit Ikan Karantina (HPIK) oleh Stasiun Karantina Ikan, Pengendalian Mutu, dan Keamanan Hasil Perikanan (SKIPMHP) Kelas I Lampung

selama tahun 2011- 2013, menunjukkan bahwa VNN masih sering ditemukan di sentra-sentra budidaya kerapu tikus khususnya di Kabupaten Lampung Selatan dan Pesawaran (Anonim, 2011; Anonim 2013).

Sejauh ini belum ditemukan obat untuk penyakit yang disebabkan oleh virus pada ikan. Pendekatan dengan pencegahan munculnya penyakit menjadi salah satu cara yang paling efektif untuk meminimalkan terjadinya wabah penyakit VNN. Beberapa upaya telah ditemukan dengan memicu respon imun ikan kerapu terhadap infeksi VNN antara lain vaksin protein yang mirip VNN (*VNN-like protein*) (Thiery *et al.*, 2006) dan induksi peptida reseptor imunogenik terhadap VNN (Setyawan *et al.*, 2010). Upaya-upaya tersebut secara uji *in vitro* terbukti efektif memicu respon imun ikan kerapu terhadap infeksi VNN. Namun, untuk aplikasi di lapangan dan dalam skala massal, bahan-bahan yang berbasis peptida tersebut memiliki beberapa kelemahan antara lain mudah rusak terutama pada suhu tinggi, kurang efisien dalam pemberian kepada ikan karena peptida akan terdegradasi oleh enzim-enzim pencernaan jika diberikan secara oral atau melalui pakan, dan produksi bahan-bahan peptida membutuhkan biaya yang relatif mahal.

Pemanfaatan jintan hitam sebagai imunostimulan merupakan salah satu alternatif pencegahan terhadap infeksi virus VNN pada ikan kerapu. Jintan hitam terbukti mampu memicu respon imun inangnya baik bagi manusia maupun hewan seperti ayam broiler (Durrani *et al.*, 2007), dan ikan rainbow trout (Dorucu *et al.*, 2009). Pemanfaatan jintan hitam dalam mencegah infeksi VNN memiliki beberapa keunggulan antara lain (1) imunostimulan bersifat universal, mampu mencegah infeksi tidak hanya satu jenis virus tapi oleh agen infeksi lainnya seperti bakteri, parasit, dan jamur; (2) tidak mudah rusak sehingga mudah dalam penyimpanan dan tahan lama; (3) memiliki harga yang relatif lebih murah dibandingkan dengan produksi peptida anti-VNN. Oleh karena itu, penting dilakukan kajian tentang efektivitas pemanfaatan jintan hitam sebagai imunostimulator untuk mencegah infeksi VNN pada ikan kerapu tikus. Penelitian ini secara khusus bertujuan untuk mengetahui respon imun *innate* ikan kerapu tikus yang diinduksi dengan pemberian jintan hitam dan Persen perlindungan relatif (RPS) jintan hitam terhadap infeksi VNN pada ikan kerapu tikus.



METODE DAN BAHAN

Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei-November 2013 di Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan, Balai Besar Pengembangan Budidaya Laut (BBPBL) Lampung di Hanura, Padang Cermin.

Persiapan Ikan Uji

Ikan kerapu tikus (ukuran 10 cm) didapatkan dari Laboratorium Benih, BBPBL Lampung. Ikan dimasukkan dalam empat bak ukuran 60x40x40 cm³ dengan kepadatan 10 ekor/bak. Ikan dipelihara dengan pemberian pakan dua kali sehari pada waktu pagi dan sore hari dengan jumlah pakan sebanyak 4% ABW (*average body weight*).

Pemberian jintan hitam

Jintan hitam diperoleh dari toko herbal dalam bentuk serbuk dalam kapsul dengan kandungan jintan hitam 100%. Jintan hitam dicampurkan dalam pakan dengan konsentrasi 0%, 2,5%, 5%, dan 7,5% (m/m) dalam pakan ikan. Untuk meningkatkan daya rekat, dalam pencampuran jintan hitam ditambahkan putih telur kemudian dikeringanginkan. Pakan yang sudah tercampur dengan jintan hitam dengan masing-masing konsentrasi dimasukkan dalam plastik sesuai dengan berat pakan yang akan diberikan ke ikan (4% ABW). Pemberian jintan hitam dilakukan selama 30 hari pemeliharaan.

Ekstraksi Virus

Ikan yang positif terinfeksi VNN dikoleksi dari Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan, Balai Budidaya Air Payau (BBAP) Situbondo dan Laboratorium Ilmu-ilmu Perairan dan Bioteknologi, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan (FPIK) Universitas Brawijaya, Malang. Untuk memastikan ikan terinfeksi virus, dilakukan uji PCR terlebih dahulu. Ikan terinfeksi VNN homogenasi dengan menggunakan mortar dengan menambahkan buffer ekstrak. Homogenat kemudian difilter dengan menggunakan filter millipore 0,45 µm. Filtrat disimpan dalam freezer -40⁰C hingga digunakan untuk ujiantang.

Uji Tantang

Uji tantang dilakukan dengan menginfeksi ikan uji dengan ekstrak VNN sebanyak 0,1 ml/ikan. Ekstrak VNN diinfeksi dengan injeksi intra peritoneal (i.p) dengan menggunakan syringe 26G, ½” (Therumo). Setelah infeksi, ikan dipelihara seperti biasanya selama lima hari dan diamati gejala sakit dan jumlah kematian.

Waktu Rerata Kematian

Waktu rerata kematian (*mean time to death*, MTD) diukur dengan menghitung waktu rata-rata yang dibutuhkan virus untuk membunuh ikan kerapu tikus. Perhitungan MTD dilakukan sesuai dengan rumus baku;

$$MTD = \frac{\sum_{i=1}^n aibi}{\sum_{i=1}^n bi}$$

Keterangan :

a : waktu kematian pada hari ke-*i*

b : jumlah ikan yang mati pada hari ke-*i* (ekor)

Persen Kehidupan Relatif (*Relative Percent Survival*, RPS)

RPS dihitung setelah lima hari infeksi VNN untuk mengetahui tingkat perlindungan jantan hitam terhadap infeksi VNN pada ikan kerapu tikus. RPS dihitung berdasarkan rumus:

$$RPS = \left(1 - \frac{\% \text{ kematian ikan yang divak sin}}{\% \text{ kematian ikan yang tidak divak sin}} \right) \times 100\%$$

Kualitas Air

Selama penelitian berlangsung kualitas air pemeliharaan ikan yang meliputi oksigen terlarut (*dissolved oxygen*, DO), pH, salinitas, suhu, dan amonia diukur seminggu sekali. Hasil pengukuran kualitas air dibandingkan dengan baku mutu untuk kehidupan normal ikan kerapu tikus.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji PCR

Ikan kerapu tikus yang diduga terinfeksi VNN diuji dengan metode PCR untuk meyakinkan positif tidaknya adanya infeksi VNN. Hasil uji PCR menunjukkan ikan sampel merupakan ikan yang terinfeksi VNN yang ditunjukkan dengan munculnya pita (*band*) 430 bp.

N O.	PARAMETER <i>Parameters</i>	HASIL <i>Test Result</i>		SPESIFIKASI <i>METODE METHOD SPESIFICATION</i>
		Gambar	Keterangan	
1.	VNN		Lane-1 : Marker Lane-2 : Kontrol Negatif Lane-3 : Kontrol Positif Lane-5: Sampel positif terdeteksi VNN	(<i>Polymerase Chain Reaction-OIE</i>)

Gambar 1. Hasil uji PCR ikan sampel (BBAP Situbondo)

Ekstraksi VNN

Hasil ekstraksi ikan yang terinfeksi VNN didapatkan filtrat sebanyak 10 mikrotube (1,5 ml) yang siap diinfeksi ke ikan uji.



Gambar 2. Homogenat VNN

MTD dan RPS

Hasil perhitungan MTD menunjukkan VNN mampu membunuh ikan kontrol dengan rata-rata waktu kematian 1 hari setelah infeksi. Sedangkan untuk ikan yang distimulasi dengan jintan hitam menunjukkan rerata waktu kematian pada hari ke-4 setelah infeksi (hanya dihitung ikan dari yang mati sampai hari ke-5). Hasil perhitungan RPS menunjukkan bahwa pemberian jintan hitam pada ikan kerapu tikus mampu melindungi ikan kerapu tikus dari infeksi VNN dengan nilai RPS mencapai 100% (semua ikan kontrol mati).

Tabel 1. Nilai SR, RPS, dan MTD

No	Perlakuan	SR (%)	RPS (%)	MTD (hari)
1.	Kontrol	30	-	1
2.	2,5%	70	57,14	3,3
3.	5%	60	42,86	4,5
4.	7,5%	100	100	-

Pembahasan

VNN merupakan salah satu virus yang keberadaannya sangat dikhawatirkan bagi budidaya ikan laut, termasuk kerapu tikus. Serangan VNN dapat membunuh ikan kerapu hingga 100% dalam waktu singkat (Yuasa *et al.*, 2000). Pendeteksian infeksi VNN pada ikan dapat dilakukan dengan metode PCR. Hasil uji PCR menunjukkan bahwa ikan sampel telah terinfeksi VNN yang diindikasikan dengan munculnya pita 430 bp (Nishizawa *et al.* 1994).

Penambahan jintan hitam dalam pakan ikan kerapu tikus mampu memberi perlindungan ikan kerapu tikus dari infeksi VNN. Hal ini ditunjukkan dari nilai RPS



dan MTD ikan kerapu tikus yang diberi imunostimulan jintan hitam relatif tahan terhadap infeksi VNN dibandingkan dengan ikan kontrol (tanpa pemberian jintan hitam).

Kemampuan jintan hitam dalam meningkatkan ketahanan ikan kerapu tikus terhadap infeksi VNN tidak terlepas dari kemampuan jintan hitam dalam meningkatkan respon imun kerapu tikus. Jintan hitam telah diketahui memiliki kemampuan untuk meningkatkan respon imun pada ikan rainbow trout (Dorucu *et al.*, 2009). Jauh sebelum itu, kajian pada manusia (Salem, 2005) dan beberapa spesies hewan antara lain seperti ayam broiler (Guler *et al.*, 2005; Shewita *et al.*, 2011), dan tikus (Boseila and Messalam, 2011).

Efikasi jintan hitam dalam melindungi ikan kerapu tikus ditunjukkan dalam nilai RPS ikan yang diberi jintan hitam 7,5% (m/m) dalam pakan mencapai 100%. Selama lima hari pemeliharaan, ikan kerapu tikus yang diberi 7,5% jintan hitam dalam pakan juga masih hidup semua. Berbeda dengan ikan kontrol yang sudah mati 7 ekor (70%). Hal ini juga dapat disimpulkan bahwa pemberian jintan hitam 7,5% (m/m) merupakan perlakuan terbaik untuk melindungi ikan kerapu tikus dari infeksi VNN.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada ibu Yani Lestari (BBAP Situbondo) atas kesediannya menyediakan isolat VNN dan kepada Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan, BBPBL Lampung atas ijin penggunaan laboratorium basah untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2011. *Pemaparan Hasil Pemantauan HPI/HPIK Propinsi Lampung Tahun 2011*. Bahan Seminar Lokal Stasiun Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Lampung, Bandar Lampung, 20 Oktober 2011.
- _____, 2013. *Pemaparan Hasil Pemantauan HPI/HPIK Propinsi Lampung Tahun 2013*. Bahan Seminar Lokal Stasiun Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Lampung, Bandar Lampung. 7 Oktober 2013



- Boseila, A.A.H. and A.A.H. Messalam. 2011. *Immunostimulant effect of different fractions of Nigella sativa L. Seeds against Rabies Vaccine*. Nature and Science 9 (2) : 90-96
- Dorucu, M., Colak, S.O., Ispir, U., Altinterim, B. dan Celayir, Y. 2009. *The effect of black cumin seeds, Nigella sativa, on the immune response of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss*. Mediterranean Aquaculture Journal. 2: 1-7.
- Durrani, F.R. N. Chand, K. Zaka, A. Sultan, F.M. Khattak, dan Z. Durrani. *Effect of Different Levels of Feed Added Black Seed (Nigella sativa L.) on the Performance of Broiler Chicks*. Pakistan Journal of Biological Sciences 10 (22): 4164-4167
- Guler, T., Dalkihc, B., Ertas, O.N. dan Ciftci, M. 2006. *The effect of dietary black cumin seeds (Nigella sativa L.) on the performance of broilers*. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 19: 425-430.
- Nishizawa, T., K. Mori, T. Nakai, I. Furusawa and K. Muroga. 1994. *Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV)*. Dis. Aquat. Org., 18: 103-107
- Salem, M.L. 2005. *Immunomodulatory and therapeutic properties of the Nigella sativa L. Seed (Rev.)*. International Immunopharmacology 5: 1749 – 1770.
- Setyawan, A., E. Gusman., dan U. Yanuhar. 2010. Ekspresi molekul interleukin 6 (IL-6) pada ikan kerapu tikus *Cromileptes altivelis* yang diinduksi protein imunogenik 40 kDa *Vibrio anguillarum*. *Prosiding Seminar Tahunan VII Hasil Penelitian Perikanan dan Kelautan tahun 2010*, Jurusan Perikanan UGM-BRKP, Yogyakarta.
- Shewita, R.S. and A.E. Taha. 2011. *Effect of Dietary supplementation of different levels of black seed (Nigella sativa L.) on growth performance, immunological, hematological and carcass parameters of broiler chicks*. World Academy of Science, Engineering and Technology 77: 788-794.
- Yuasa, K., Des Roza, I. Koesharyani, F. Johnny dan K. Mahardika, 2000. *General Remarks On Fish Disease Diagnosis*. Pp. 5-18. Textbook for the Training Course on Fish Disease Diagnosis. Lolitkanta-JICA Booklet No. 12.