

**EFEKTIFITAS METODA VAKSINASI *FLEXIBACTER* PADA
BENIH IKAN KERAPU MACAN, *Epinephelus fuscoguttatus* DI HATCHERI
[The effectiveness of the method vaccination *Flexibacter* on tiger grouper,
Epinephelus fuscoguttatus seed at hatchery]**

Fris Johnny^{*}, Des Roza dan Zafran

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Budidaya Laut
Banjar Dinas Gondol, Desa Penyabangan, Kecamatan Gerokgak,
Kabupaten Buleleng, Bali 81155
email: frisjravael@yahoo.com

ABSTRACT

Vaccination is one of the approaches against infectious diseases in cultured marine fish. The purpose of this study was to evaluate the effectiveness of *Flexibacter* vaccine in juvenile of tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*). Nine hundred of tiger grouper with total length of 7-8 cm reared in nine concrete tanks. For each three tanks, fishes were vaccinated with injection, immersion, and without vaccination as control. Booster was delivered at 10 and 30 days after first vaccination. Challenge test with live *Flexibacter* bacteria was performed 90 days post vaccination. Observations were made on clinical symptoms and survival rates which presented in relative percentage survival (RPS). The experiments were performed in completely randomized design with three replicates. The data then analyzed with ANOVA. The results showed that the antibody titer values of vaccinated fish were higher than unvaccinated fish, namely 128 for injection, 64 for bathing and 4 for control. Survival rates of vaccinated fish following challenged test were higher than control and significantly different ($P < 0.05$), i.e. 88.67% (with RPS of 60%) for injection and 83.33% (with RPS of 50%) for immersion and 66.67% for controls. It is suggested that *Flexibacter* vaccine administered through injection and bathing are effective to increase immunity of tiger grouper against *Flexibacter* infection.

Keywords: *Epinephelus fuscoguttatus*, *Flexibacter*, vaccine

ABSTRAK

Vaksinasi merupakan salah satu pendekatan dalam upaya penanggulangan penyakit infeksi pada ikan laut budidaya. Banyak keluhan pembudidaya ikan yang mengalami ekor buntung akibat serangan bakteri *Flexibacter*. Oleh karena itu, pengembangan vaksin untuk kelompok patogen ini perlu dilakukan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan teknik penggunaan vaksin bakteri *Flexibacter* dan menguji efektivitas teknik tersebut pada ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) ukuran 7-8 cm sebanyak 900 ekor pada sembilan bak beton. Setiap tiga bak beton diterapkan perlakuan vaksinasi *Flexibacter* melalui penyuntikan, perendaman dan kontrol. Booster dilakukan setelah 10 dan 30 hari vaksinasi. Uji tantangan dilakukan setelah 90 hari percobaan menggunakan bakteri *Flexibacter* dengan bak fiber. Pengamatan dilakukan terhadap gejala klinis dan jumlah kematian, sehingga pada akhir percobaan dilakukan penghitungan sintasan dan Relative Percentage Survival (RPS). Percobaan dilakukan dengan rancangan acak tiga ulangan dan dianalisa dengan Anova. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai titer antibodi adalah 128 kali dengan penyuntikan, 64 kali dengan perendaman dan kontrol 4 kali. Hasil uji tantangan memberikan hasil sintasan lebih baik pada perlakuan penyuntikan (88,67%) diikuti perendaman (83,33%) dan kontrol (66,67%) serta masing-masing perlakuan berbeda nyata. RPS pada penyuntikan diperoleh sebesar 60% dan perendaman sebesar 50%. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa vaksin *Flexibacter* yang digunakan secara penyuntikan memberikan nilai titer antibodi, sintasan dan RPS yang lebih baik dibandingkan dengan cara perendaman dan kontrol.

Kata Kunci: *Epinephelus fuscoguttatus*, *Flexibacter*, vaksin.

PENDAHULUAN

Perkembangan usaha budidaya ikan kerapu diikuti oleh berjangkitnya berbagai jenis penyakit, baik yang disebabkan oleh infeksi virus, bakteri, parasit maupun oleh penyakit non-infeksi seperti malnutrisi dan deformiti. Infeksi virus yang sudah dilaporkan sangat mematikan pada ikan laut budidaya adalah viral nervous necrosis/VNN dan iridovirus (Owen, 1993; Mahardika *et al.*, 2004).

Dari kelompok bakteri umumnya adalah dari genus *Vibrio*, *Flexibacter* dan *Streptococcus*. Johnny *et al.* (2002) melaporkan bahwa sudah terjadi penyakit infeksi bakteri *Flexibacter* pada ikan kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus* yang dibudidayakan di keramba jaring apung di Teluk Ekas, Desa Batunampar, Kabupaten Lombok Timur, NTB. Ikan kerapu macan yang diserang bakteri *Flexibacter* tersebut sudah berukuran bobot badan

*Diterima: 19 Januari 2014 - Disetujui: 28 Mei 2014

antara 200 s/d 300 gram dengan gejala klinis sirip ekor busuk dan bahkan sudah ada ikan kerapu macan mengalami ekor buntung. Sedangkan dari kelompok parasit yang sering jadi masalah adalah Monogenea Trematoda seperti *Haliotrema*, *Pseudorhabdosynochus*, *Diplectanum*, *Benedenia*, *Neobenedenia*, dan berbagai jenis protozoa seperti *Cryptocaryon irritans* dan *Trichodina* (Zafran *et al.*, 1998; Koesharyani *et al.*, 2001).

Banyak keluhan pembudidaya ikan yang mengalami ekor buntung akibat serangan bakteri *Flexibacter*. Oleh karena itu, pengembangan vaksin untuk kelompok patogen ini perlu dilakukan. Vaksinasi merupakan salah satu pendekatan dalam upaya penanggulangan penyakit infeksi pada ikan laut budidaya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kekebalan spesifik ikan kerapu terhadap penyakit infeksi bakteri dapat ditingkatkan melalui pemberian vaksin bakteri *Vibrio* polivalen. (Zafran *et al.*, 2011).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan teknik penggunaan vaksin bakteri *Flexibacter* dan untuk menguji efektivitas teknik tersebut pada ikan kerapu.

BAHAN DAN CARA KERJA

Identifikasi spesies bakteri *Flexibacter* dilakukan dengan membandingkan profil pita DNA A dan B. A menggunakan pasangan primer FP2VF500 dan BP2VF900; sedangkan B menggunakan pasangan primer FP1VF328 and BP1VF816. Karakterisasi molekuler di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Denpasar.

Ekstraksi DNA bakteri dilakukan dengan menggunakan larutan chelex 10%, larutan ekstraksi disimpan dalam suhu 4 °C sampai digunakan untuk amplifikasi. Reaksi PCR tersebut sebanyak 25µl, komponen tersebut terdiri dari 14,5 µl ddH₂O; 2,5 µl 10X PCR Buffer (PE-II) (*Applied Biosystem*); 2,5 µl dNTPs (8 mM) (*Applied Biosystem*); 2 µl MgCl₂ (25 mM) (*Applied Biosystem*); 1,25 µl forward primer (10 µM); 1,25 µl

backward primer (10 µM); 0.125 µl of PE Ampli-taq® (5 units/µl) (*Applied Biosystem*), dan 1 µl DNA template hasil ekstraksi. Semua komponen yang telah dimasukkan ke dalam tabung eppendorf, tabung dimasukkan ke dalam mesin penyiklus DNA (*Thermocycler*). Di dalam *Thermocycler* (*Bio-Rad*) suhu sudah diprogram yang diawali dengan suhu 80 °C selama 10 detik. Dilanjutkan dengan suhu 94 °C selama 15 detik yaitu merupakan proses *predenaturasi* yaitu proses perubahan DNA dari serat ganda menjadi serat tunggal. Selanjutnya 94 °C selama 30 detik merupakan proses *Denaturasi* yaitu serat ganda yang pelepasannya belum sempurna dipecah lagi agar menjadi serat tunggal. Pada suhu 45 °C selama 30 detik merupakan proses *Annealing* yaitu proses penempelan primer dengan serat DNA template. Proses ekstensinya pada suhu 72 °C selama 45 detik yaitu proses pemanjangan primer sehingga memperpanjang rantai DNA, yang berperan disini adalah enzim polymerase (*Taq Polymerase*) semua proses diatas diulang sebanyak 35 kali siklus. Terakhir pada suhu 72 °C selama 5 menit merupakan proses penyempurnaan aktivitas enzim dan dilanjutkan pada suhu 24 °C yaitu suhu penyimpanan (Walsh *et al.*, 1991).

Vaksin bakteri *Flexibacter* dibuat dengan mengkultur secara massal pada media TSA + 2% NaCl selama 48 jam pada suhu 27 °C. Bakteri dipanen dan dimatikan dengan formalin 0,01%, dicuci sebanyak tiga kali melalui sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3.200 rpm untuk menghilangkan formalin. Kepadatan bakteri diatur 10¹⁰ CFU/ml, vaksin anti bakteri *Flexibacter* siap untuk dikemas. Perlakuan penggunaan vaksin dilakukan dengan dua perlakuan secara Injeksi intraperitoneal (IP) dan Perendaman selama 60 menit, serta Tanpa perlakuan (kontrol).

Aplikasi dilakukan pada benih ikan kerapu macan ukuran 7-8 cm sebanyak 900 ekor pada sembilan bak beton ukuran 150 X 50 x 80 cm, setiap tiga bak beton dilakukan vaksinasi *Flexibacter* melalui penyuntikan intraperitoneal (IP), perendaman 60 menit dan kontrol. Booster dilakukan sete-

lah hari ke 10 dan ke-30 setelah vaksinasi, perlakuan booster sebagai penguat imunitas benih ikan kerapu. Percobaan dilakukan selama 90 hari dengan rancangan acak lengkap (RAL) tiga ulangan dan hasil percobaan dianalisa menggunakan ANOVA.

Pengujian titer antibodi dilakukan pada hari ke -30, hari ke-60 dan hari ke-90, berpedoman pada Tizard (1988) dan Roberson (1993). Uji tantang dilakukan setelah 90 hari percobaan menggunakan bakteri *Flexibacter* dengan bak fiber volume 100 L sebanyak sembilan buah berisikan air laut sebanyak 80 L, masing-masing bak berisikan ikan uji sebanyak 20 ekor, bak diaerasi, diberi pakan pelet pada pagi dan sore hari, bak dibersihkan dengan

penyiponan setiap pagi hari, hasil penyiponan ditampung pada bak fiber volume 500 L dan diklorin selama 24 jam, lalu dibuang ke saluran pembuangan. Pengamatan dilakukan terhadap gejala kilinis dan jumlah kematian, sehingga pada akhir percobaan dilakukan penghitungan sintasan dan Relative Percentage Survival (RPS).

HASIL

Hasil identifikasi spesies bakteri *Flexibacter* dilakukan dengan pendekatan molekuler di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Denpasar disajikan pada Tabel 1.

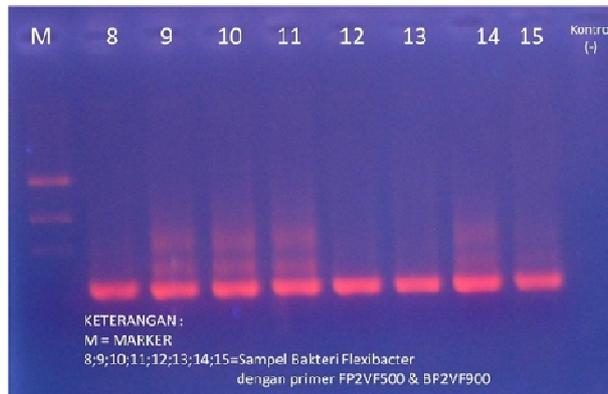
Tabel 1. Hasil uji *Polymerase Chain Reaction (PCR)* bakteri *Flexibacter* spp. (*Test results Polymerase Chain Reaction (PCR) of Flexibacter spp.*)

No	Kode (Code)	Hasil (Results)	Genus
1	FPG-0813	-	-
2	FPG-0913	+	<i>Flexibacter</i>
3	FPG-1013	+	<i>Flexibacter</i>
4	FPG-1113	+	<i>Flexibacter</i>
5	FPG-1213	-	-
6	FPG-1313	-	-
7	FPG-1413	+	<i>Flexibacter</i>
8	FPG-1513	-	-

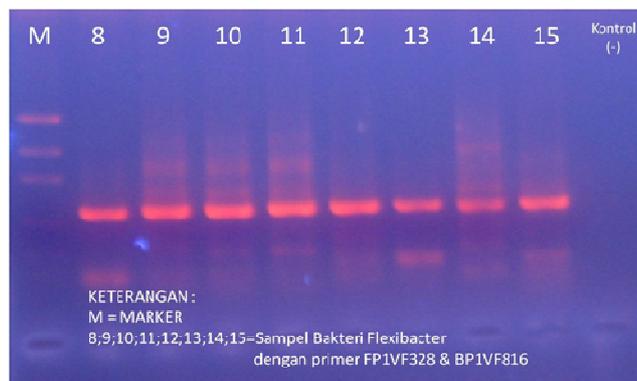
Dari delapan isolat yang dilakukan pengujian dengan PCR, ternyata hanya empat isolat yang positif *Flexibacter* yaitu isolat nomor 09 (FPG-0913), 10 (FPG-1013), 11 (FPG-1113) dan 14 (FPG-1413) (Tabel 1) dengan panjang genom spesies bakteri *Flexibacter maritimus* 3,32 Mb.

Hasil PCR ditampilkan pada Gambar 1 dan 2, pada Gambar 1 terlihat hasil pengujian PCR menggunakan gen target 16s rDNA dengan pasangan primer A. FP2VF500 dan BP2VF900

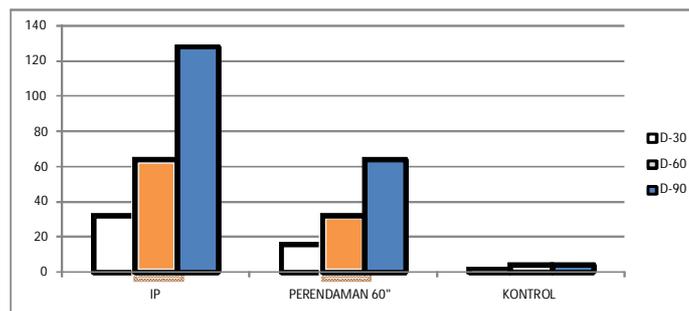
mempunyai panjang rantai basa 400 bp positif *Flexibacter* pada sampel nomor 9 (FPG-0913), 10 (FPG-1013), 11 (FPG-1113) dan 14 (FPG-1413). Sebagai pembanding pada Gambar 2 dilakukan pula pengujian PCR dengan menggunakan pasangan primer B. FP1VF328 dan BP1VF816 dengan panjang rantai basa 400 bp menunjukkan hasil yang sama pada Gambar 1. Selanjutnya hasil amplikasi PCR tersebut dipersiapkan untuk dilakukan uji sequencing DNA.



Gambar 1. Elektroferogram produk PCR menggunakan primer FP2VF500 dan BP2VF900 (*Electropherogram of PCR product using FP2VF500 and BP2VF900 primers*)



Gambar 2. Elektroferogram produk PCR menggunakan primer FP1VF328 dan BP1VF816 (*Electropherogram of PCR product using FP1VF328 and BP1VF816 primers*)



Gambar 3. Nilai titer antibodi darah ikan kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus* yang divaksin dengan vaksin *Flexibacter* selama 3 bulan pemeliharaan (*The value of the blood antibody titer of tiger grouper, Epinephelus fuscoguttatus vaccinated with the Flexibacter vaccine for 3 months rear-*

Peningkatan nilai titer antibodi pada ikan yang diberi perlakuan vaksinasi dengan vaksin *Flexibacter* terlihat jelas pada hasil penelitian ini. Peningkatan tertinggi diberikan oleh perlakuan

vaksinasi dengan cara injeksi IP diikuti oleh perendaman selama 60 menit, sedangkan pada kontrol tidak terjadi peningkatan (Gambar 3).

Tabel 2. Sintasan antar perlakuan injeksi intraperitoneal (IP), perendaman selama 60 menit dan kontrol benih ikan kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus* setelah ujiantang dengan bakteri *Flexibacter* sp. (*Survival Rate among treatments intraperitoneal injection (IP), soaking for 60 minutes and the control seeds tiger grouper, Epinephelus fuscoguttatus after bacterial challenge test with Flexibacter sp.*).

Perlakuan (Treatment)	Sintasan (Survival Rate) (%)	RPS
Injeksi Intra Peritoneal (Injection Intra Peritoneal) (IP)	86.67 ^c	60
Perendaman 60 menit (Dipping)	83.33 ^b	50
Kontrol (Control)	66.67 ^a	

Keterangan : Angka dalam baris dan kolom yang diikuti huruf sama tidak berbeda nyata ($P < 0,05$) (Values in column followed by the same superscripts are not significantly different $P < 0,05$)

Hasil ujiantang menunjukkan bahwa vaksin *Flexibacter* yang digunakan terbukti bersifat imunogenik bagi ikan kerapu terhadap infeksi bakteri *Flexibacter* yang ditunjukkan oleh data sintasan yang lebih tinggi. Nilai RPS yang diperoleh cukup tinggi, yaitu 60% untuk vaksin yang diberikan melalui penyuntikan IP dan 50% untuk vaksin yang diberikan melalui perendaman selama 60 menit (Tabel 2).

PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini memberikan alternatif pada pembudidaya ikan bahwa infeksi bakteri *Flexibacter* dapat dicegah dengan penggunaan vaksin *Flexibacter* dan cara penggunaannya bisa melalui penyuntikan maupun melalui cara perendaman. Penyuntikan intraperitoneal (IP) dalam percobaan ini memberikan hasil sintasan yang terbaik (86,67%) dibandingkan dengan perendaman (83,33%) dan kontrol (66,67%) dan secara statistik berbeda nyata antar perlakuan ($P < 0,05$). Vaksinasi melalui penyuntikan IP lebih efektif karena vaksin langsung diserap oleh pembuluh darah kapiler di peritoneum, sedangkan dengan perendaman vaksin akan masuk terlebih dahulu ke saluran pencernaan, kemudian baru terjadi proses penyerapan oleh pembuluh darah dan disalurkan ke seluruh tubuh. Bagi ikan yang besar kemungkinan aplikasinya tidaklah serumit ikan yang kecil, karena teknisi hatchery atau keramba jaring apung mampu melakukannya. Akan tetapi, untuk ikan dengan ukuran yang kecil,

teknisi akan kesulitan untuk melakukan penyuntikan apalagi dalam jumlah yang banyak. Untuk ikan kecil, disarankan aplikasi vaksinasi dengan cara perendaman.

Dalam percobaan ini dilakukan dua perlakuan yaitu perlakuan penyuntikan IP dan perendaman untuk memberikan suatu alternatif bagi pembudidaya ikan bahwa selain dengan cara penyuntikan, vaksinasi juga dapat dilakukan dengan perendaman. Walau hasil pengujian menunjukkan vaksinasi dengan penyuntikan lebih baik hasilnya daripada dengan perendaman. Resiko penggunaan antibiotik yang selama ini jadi pilihan para pembudidaya dalam pengendalian penyakit infeksi bakteri dapat dihindari. Dengan penggunaan vaksin diharapkan produksi dan pendapatan para pembudidaya ikan laut akan meningkat dan ketergantungan para pembudidaya ikan laut terhadap obat/antibiotik akan dapat diatasi.

Bakteri *Flexibacter* diketahui sebagai bakteri yang sangat ganas dan berbahaya pada ikan kerapu macan karena dapat bertindak sebagai patogen primer dan sekunder. Sebagai patogen primer bakteri masuk tubuh ikan melalui kontak langsung, sedangkan sebagai patogen sekunder bakteri menginfeksi ikan yang telah terserang penyakit lain seperti parasit (Post, 1987). Vaksin bakteri *Flexibacter* memberikan kekebalan lebih baik karena outer membran mengandung protein yang penting dalam faktor virulensi dan LPS, keduanya merupakan stimulator respon kekebalan

yang kuat. Selain itu, imunogenisitas berkaitan dengan ukuran molekul, dengan berat molekul yang lebih tinggi cenderung lebih imunogen. Salah satu faktor yang mempengaruhi imunogenisitas protein adalah berat molekulnya dan imunogen yang terbaik cenderung mempunyai berat molekul 100 kDa (Kuby, 1992).

Ikan kerapu di alam merupakan ikan karang dengan habitat asli di daerah terumbu karang di laut dalam yang jernih dan bersih. Berkembangnya bakteri *Flexibacter* di suatu perairan merupakan indikator perairan yang kurang menguntungkan bagi ikan dengan kandungan nutrisi yang tinggi. Penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri *Flexibacter* juga merupakan masalah yang sangat serius dan umum menyerang ikan-ikan laut budidaya mulai dari hatchery, sampai di tambak dan KJA. Penularannya dapat melalui air atau kontak langsung antar ikan dan menyebar sangat cepat pada ikan-ikan yang dipelihara pada kepadatan tinggi. Bakteri *Flexibacter* menyerang ikan kerapu mulai pada benih di hatchery sampai yang telah dibudidayakan di tambak dan KJA dengan gejala klinis lendir yang berlebihan, bintik-bintik merah pada bagian perut, sirip dan gripis sampai busuk serta menyebabkan ekor buntung (Koesharyani *et al.*, 2001) demikian pula pada benih ikan cobia, *Rachycentron canadum* yang dipelihara di hatchery (Johnny *et al.*, 2008).

Hasil penelitian memegang peran strategis untuk pengembangan budidaya ikan laut ke depan. Vaksin merupakan pilihan yang sangat menjanjikan sebagai salah satu aspek penunjang keberhasilan budidaya perikanan laut karena punya beberapa keuntungan dibanding obat-obatan/antibiotik, antara lain vaksin memberikan perlindungan jangka panjang terhadap penyakit, tidak membentuk patogen jadi resisten terhadap obat/antibiotik, tidak menimbulkan residu pada tubuh ikan, dan tidak mencemari lingkungan budidaya, serta aman untuk manusia. (Johnny *et al.*, ; 2010; 2012, Johnny dan Roza, 2012; Roza dan Johnny, 2007; Roza *et al.*, 2010; Zafran *et al.*, 2008; 2011; 2012^a; 2012^b).

Penggunaan vaksin berkorelasi positif terhadap perbaikan lingkungan disatu sisi, peningkatan keuntungan pembudidaya disisi lain sebagai efek turunya kejadian penyakit. Dalam menghadapi era budidaya ikan secara intensif maka vaksinasi merupakan salah satu unsur yang harus dimasukkan dalam paket budidaya untuk mendukung keberhasilan usaha budidaya ikan. Pilihan tersebut sangat tepat karena vaksinasi punya banyak keuntungan bila dibandingkan dengan metode lain seperti pemakaian bahan kimia/ antibiotik yang sudah banyak dilaporkan berdampak negatif (Evelyn, 2002). Untuk pengendalian penyakit infeksi secara non-spesifik banyak menggunakan imunostimulan pada ikan kerapu di hatchery, tambak dan KJA dengan hasil yang cukup efektif dan efisien (Johnny *et al.*, 2009^a; 2009^b; 2010). Vaksin yang paling ideal adalah vaksin polivalen yang mengandung semua patogen pada ikan. Tentu saja perlu penelitian untuk bisa memproduksi vaksin polivalen tersebut karena belum tentu vaksin-vaksin tersebut bersifat sinergistik, mungkin saja diantara patogen-patogen tersebut bersifat saling melemahkan (antagonistik) bila dicampurkan dalam satu vaksin polivalen. Pada penelitian sebelumnya (Zafran *et al.*, 2012^a) dilaporkan bahwa vaksin polivalen yang terdiri dari tiga spesies *Vibrio* (*Va jelas.vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus*, dan *V. alginolyticus*) efektif meningkatkan kekebalan ikan kerapu terhadap infeksi bakteri. Lin *et al.* (2006) melaporkan bahwa kombinasi tiga spesies bakteri (*Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, dan *Photobacterium damsela subsp. piscicida*) efektif meningkatkan kekebalan ikan cobia, *Rachycentron canadum*. Untuk penggunaan vaksin pada usaha budidaya ikan kerapu telah dilaporkan di Gondol (Johnny *et al.*, 2009^a, 2009^b; 2009^c; Johnny dan Roza, 2012; Roza dan Johnny, 2007; Roza *et al.*, 2010; Zafran *et al.*, 2008; 2011; 2012^a; 2012^b).

KESIMPULAN

Hasil penelitian vaksin *Flexibacter* diperoleh bahwa penggunaan vaksin dengan cara

penyuntikan intra peritoneal (IP) memberikan nilai titer antibodi dan RPS yang lebih baik dibandingkan dengan perendaman dan kontrol. Dari ujiantang diperoleh hasil sintasan yang lebih baik pada perlakuan injeksi intraperitoneal dan berbeda nyata dibandingkan perlakuan perendaman dan kontrol.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kami ucapkan kepada Prof. Dr. Drh. I Gusti Kadek Mahardika dan Drh. Ni Made Ritha Krisna Dewi, S. KH., M. Si. dari Laboratorium Bioteknologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana dan Teknisi Laboratorium Patologi Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Budidaya Laut, Gondol atas semua bantuannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Evelyn TPT. 2002.** Finfish immunology and its use in preventing infectious diseases in cultured finfish. In *Diseases in Asian Aquaculture IV*. C.R. Lavilla-Pitogo dan E.R. Cruz-Lacierda (eds.), 303-324. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.
- Johnny F, Prisdimmingo dan D Roza. 2002.** Kasus penyakit infeksi bakteri pada ikan kerapu di keramba jaring apung Teluk Ekas, Kabupaten Lombok Timur, Nusa Tenggara Barat. *Prosiding Seminar Nasional Peningkatan Pendapatan Petani Melalui Pemanfaatan Sumber Daya Pertanian dan Penerapan Teknologi Tepat Guna*, Mataram, 20-21 Nopember 2002. Baharuddin, K Puspadi, H Suheri, Mashur, Dahlanuddin dan D Praptomo (Penyunting), 175-180. Balai Pengkajian Teknologi Pertanian NTB.
- Johnny F, D Roza dan A Priyono. 2008.** Kasus infeksi bakteri *Flexibacter maritimus* pada benih ikan cobia, *Rachycentron canadum* di hatchery. *Prosiding Seminar Nasional Kelautan IV Optimalisasi pembangunan kelautan berbasis IPTEK dalam rangka peningkatan kesejahteraan masyarakat maritim*. Surabaya, 24 April 2008. D Hardianto dan M Taufiqurrohman (Penyunting), II.51-II.55. Universitas Hang Tuah.
- Johnny F, Zafran dan D Roza. 2009^a.** Aplikasi vaksin anti bakteri polivalen pada budidaya ikan kerapu pasir, *Epinephelus corallicola* di keramba jaring apung. *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur 2009*. Hotel Majapahit Surabaya, 23-25 Juni 2009. A Sudrajat, H Supriyadi, A Hanafi, AH Kristanto, Chumaidi, A Mustafa, Imron dan I Insan (Penyunting), 967-971. Pusat Riset Perikanan Budidaya.
- Johnny F, Roza D dan Priyono A. 2009^b.** Peningkatan imunitas benih ikan kerapu lumpur, *Epinephelus coioides* terhadap infeksi virus irido dengan aplikasi vitamin C dan bakterin. *Jurnal Perikanan UGMX(2)*. 149 – 157.
- Johnny F, Roza D dan Zafran. 2009^c.** Aplikasi dan efektivitas vaksin anti parasit pada pembenihan ikan kerapu pasir, *Epinephelus corallicola* di hatchery. *Jurnal Riset Akuakultur*3(2), 233-240.
- Johnny F, D Roza dan I Mastuti. 2010.** Aplikasi imunostimulan untuk meningkatkan imunitas non-spesifik ikan kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus* terhadap penyakit infeksi di hatchery. *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur 2010*. Novotel Lampung, 20-23 April 2010. A Sudrajat, Rachmansyah, A Hanafi, ZI Azwar, Imron, AH Kristanto, Chumaidi dan I Insan (Penyunting), 945-949. Pusat Riset Perikanan Budidaya
- Johnny F dan D Roza. 2012.** Penyakit Infeksi Vibriosis pada Calon Induk Ikan Kerapu Sunu, *Plectropomus leopardus* di Hatchery. *Prosiding Seminar Nasional XXI Perhimpunan Biologi Indonesia "Peran Biologi dalam Mengantisipasi Dampak Pemanasan Global Melalui Pelestarian Keanekaragaman Hayati"*. Univ. Syiah Kuala, Banda Aceh, 26-27 November 2011. Samingan, Djufri, Suwarno, Abdullah, M Ali, Z Thomy, A Fitri, Khairil, Mudatsir, C Nurmaliah, Asiah dan S Kamal (Penyunting), 185-187. Perhimpunan Biologi Indonesia.
- Koesharyani I, Roza D, Mahardika K, Johnny F, Zafran dan Yuasa K. 2001.** *Manual for fish disease diagnosis II*, 49. Gondol Research Institute for Mariculture and Japan International Cooperation Agency.
- Kuby J. 1992.** *Immunology*, 585 . W.H. Freeman and Company. New York.
- Lin JH, Chen TY, Chen MS, Chen HE, Chou RL, Chen TI, Shu MS and Yang HE. 2006.** Vaccination with three inactivated pathogens of cobia (*Rachycentron canadum*) stimulates protective immunity. *Aquaculture*, 255, 125-132.
- Mahardika K, Zafran, Yamamoto A and Miyazaki T. 2004.** Susceptibility of juvenile humpback grouper *Cromileptes altivelis* to grouper sleepy disease iridovirus (GSDIV). *Disease Aquatic Organisme* 9,1-9.
- Owen L. 1993.** *Report on sleepy grouper disease*, 4811 . Dept. of Biomedical and Tropical Veterinary Science, James Cook Univ. of North Queensland, Townville, Australia..
- Post G. 1987.** *Textbook of fish health*, 30-80. T.F.H. Publication. USA.
- Roberson BS. 1993.** *Bacterial Agglutination*, 81-87. Techniques in fish immunology. SOS Publication. Fair Haven USA.
- Roza D dan F Johnny. 2007.** Kasus penyakit ekor busuk pada benih ikan kerapu lumpur, *Epinephelus coioides* di panti benih. *Prosiding Aquaculture Indonesia 2007 Menuju industri akuakultur Indonesia berkeadilan inovatif dan kompetitif dalam era global*. Purnomo, M Fadjar, D Yaniharto, M Febriani dan A Sudaryono (Penyunting). Hotel Equator, Surabaya, 4-7 Juni 2007, 68-72. Masyarakat Akuakultur Indonesia.
- Roza D, F Johnny dan Zafran. 2010.** Pengembangan vaksin bakteri untuk meningkatkan imunitas ikan kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus* terhadap penyakit infeksi. *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur 2010*. Novotel Lampung, 20-23 April 2010. A Sudrajat, Rachmansyah, A Hanafi, ZI Azwar, Imron, AH Kristanto, Chumaidi dan I Insan (Penyunting), 939-944. Pusat Riset Perikanan Budidaya.
- Tizard. 1988.** *Pengantar Imunologi Veteriner*, 497 . Airlangga University Press.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. 1991.** *Chelex-100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR Based Typing from Forensic Material*. *Biotechniques*10, 506-513

- Zafran, Roza D, Koesharyani I, Johnny F and Yuasa K 1998.** *Manual for Fish Disease Diagnosis ; Marine Fish and Crustacean Diseases in Indonesia*, 44. Gondol Research Station for Coastal Fisheries and Japan International Cooperation Agency.
- Zafran, F Johnny dan D Roza. 2008.** Peningkatan imunitas benih ikan kerapu pasir, *Epinephelus corallicola* melalui penggunaan vaksin bakteri polivalen. *Prosiding Seminar Nasional Biodiversitas II Biodiversitas untuk pembangunan berkelanjutan*. , Surabaya, 19 Juli 2008. Soegianto A, W Darmanto, SW Manuhara, Ni'matuzahroh, HH Purnobasuki, A Hayati dan Rosmanida (Penyunting), 203-206. Universitas Airlangga Surabaya
- Zafran, D Roza dan F Johnny. 2011.** Uji aplikasi vaksin bakteri vibrio polivalen pada larva ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* di hatchery. *Prosiding Seminar Nasional Tahunan VIII Hasil Penelitian Perikanan dan Kelautan Tahun 2011. Jilid I : Budidaya Perikanan*. Yogyakarta, 16 Juli 2011. Isnansetyo, A., Isnansetyo, Rustadi dan SB Priyono, PL-17 (1 – 5). Universitas Gajah Mada.
- Zafran, D Roza dan F Johnny. 2012^a.** Respon Juvenil Ikan Kerapu Bebek, *Cromileptes altivelis* terhadap Vaksin Vibrio Polivalen yang diberikan melalui Perendaman. *Prosiding Seminar Nasional XXI Perhimpunan Biologi Indonesia “Peran Biologi dalam Mengantisipasi Dampak Pemanasan Global Melalui Pelestarian Keanekaragaman Hayati”*. Univ. Syiah Kuala Banda Aceh, 26-27 November 2011. Samingan, Djufri, Suwarno, Abdullah, M Ali, Z Thomy, A Fitri, Khairil, Mudatsir, C Nurmaliah, Asiah dan S Kamal (Penyunting), 222-224. Perhimpunan Biologi Indonesia.