

IMUNOGENISITAS VAKSIN INAKTIF WHOLE CELL *Aeromonas salmonicida* PADA IKAN MAS (*Cyprinus carpio*)

Agus Setyawan¹ · Siti Hudaidah¹ · Zulfikar Zafeskan Ronapati² · Sumino³

Ringkasan The aims of this research was to determine the immunogenicity of inactivated vaccine *A. salmonicida* whole cell in common carp and the best method in vaccine administration. Vaccine was produced by inactivated *A. salmonicida* with adding 1 ppm (v/v) formaldehyde and incubated for 24h in room temperature. Ten juvenil of carp (Vaccine was administrated in each 10 fish by injection intraperitoneally (107 cfu/fish), orally (107 cfu/fish), immersion (107 cfu/ml for 30 minute) and control (fish with no vaccination). Booster was conducted 7 days after first vaccination with same dossage and method. Titer antibody was evaluated in three times i.e. before vaccination, 7th days after first vaccination, and 7th days after booster. Water quality such as dissolved oxygen, pH, and water temperature was measured as a supported parameters. Results showed that titer antibodi for all treatment before vaccination was 1/6. However, titer antibody after vaccination and booster increased to 1/58.67 and 1/85.33 for i.p injection, 1/42.67 and 1/64 for oral, 1/24 and 42.67 for immerse, respectively. Whereas, there was no significantly increasing of titer anti-

body in control that was 1/9.33 and 1/18.67 for vaccination and bosster, respectively. Vaccine adminsitration method by injection i.p. was the best method for obtain the best immunogenicity of vaccine. Water quality parameters along this experiment still in optimum range for common carp living.

Keywords *Aeromonas salmonicida*, common carp, inactivated vaccine, titer antibody

PENDAHULUAN

Aeromonas salmonicida merupakan salah satu bakteri patogen dalam budidaya ikan. Bakteri tersebut merupakan penyebab utama penyakit *furunculosis* dan *carp erythrodermatitis* [1]. Bakteri ini diduga pernah mewabah di Jawa Barat dan menyebabkan kematian masal pada ikan mas dengan kerugian mencapai 4 miliar rupiah [2]. Vaksinasi merupakan salah satu tindakan preventif dalam menanggulangi penyakit ikan. Penggunaan obat-obatan dan bahan kimia untuk pengobatan ikan sudah mulai ditinggalkan. Hal ini disebabkan karena dampak negatif yang ditimbulkan seperti pencemaran lingkungan, residu dalam tubuh ikan, dan resistensi bakteri terhadap jenis antibiotik tertentu [3]. Ada beberapa jenis vaksin yang telah berhasil

¹)Dosen Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung²) Alumni Mahasiswa Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung³) Stasiun Karantina Ikan dan Pengkajian Mutu Hasil Perikanan Tk I Panjang, Bandar Lampung E-mail: agussu.san@gmail.com

dikembangkan untuk penanggulangan penyakit furunculosis antara lain pada ikan karper [4], coho salmon [5], rainbow trout [6] [7]. Namun sejauh ini belum ada pengembangan vaksin untuk *A. salmonicida* dari strain lokal untuk pencegahan penyakit yang disebabkan oleh bakteri tersebut. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi imunogenisitas vaksin inaktif *A. salmonicida* pada ikan mas.

MATERI DAN METODE

Penyediaan bahan

Isolat bakteri *A. salmonicida* didapatkan dari Stasiun Karantina Ikan dan Penjaminan Mutu Hasil Perikanan Kelas I Panjang, Bandarlampung. Sedangkan ikan mas sebagai ikan uji diperoleh dari petani ikan di Kecamatan Pagelaran, Kabupaten Pringsewu.

Pembuatan vaksin

Pembuatan vaksin inaktif mengacu pada [8] dengan sedikit perubahan. Pembuatan vaksin inaktif secara lengkap yaitu bakteri *A. salmonicida* dikultur dalam medium TSB selama 24 jam dalam suhu ruang. Inokulum bakteri selanjutnya dikultur dengan cara dituang pada medium TSA di cawan petri dan diinkubasi selama 24 jam dalam suhu ruang. Inokulum bakteri dipanen ke dalam erlenmeyer kemudian dilakukan inaktivasi bakteri dengan cara menambahkan larutan formalin hingga mencapai konsentrasi 1,5% (v/v) dari volume inokulum dan diinkubasi selama 24 jam dalam suhu ruang. Untuk menghilangkan formalin dalam inokulum, dilakukan pencucian dengan menggunakan larutan *phospat buffer saline* (PBS) dengan cara mensentrifus pada kecepatan 4000 rpm selama 30 menit sebanyak tiga kali. Untuk memastikan bakteri sudah inaktif, dilakukan uji viabilitas dengan cara mengkultur inokulum yang sudah diinaktivasi ke dalam medium GSP dan diinkubasi 24 jam dalam suhu ruang hingga bakteri sudah tidak tumbuh lagi.

Vaksinasi

Sebelum dilakukan vaksinasi, vaksin dihitung kepadatannya dengan menggunakan UV-spektrofotometer ($\lambda=625$ nm) dengan mengacu larutan standar Mc Farland. Vaksinasi ikan dilakukan dengan tiga metode pemberian yaitu suntik (107 cfu/ikan), rendam (107 cfu/ml) dan oral (107 cfu/ikan) serta kontrol (tanpa vaksinasi). Tujuh hari setelah vaksinasi pertama, dilakukan penguatan (booster) vaksinasi dengan metode dan dosis yang sama. Selama vaksinasi, ikan dipelihara dalam akuarium dan diberi makan secara ad libitum dengan frekuensi pemberian pakan dua kali sehari. Kualitas air selama pemeliharaan dijaga agar masih dalam kisaran normal untuk budidaya ikan mas. 2.4. Uji Aglutinasi Titer antibodi menggunakan metode standar mikro aglutinasi [9] dengan sedikit modifikasi. Serum didapatkan dengan mengambil darah ikan melalui venacaudal dengan spuit 1 ml 26G dan disentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Serum yang tercampur dalam plasma darah berada di bagian permukaan berupa cairan. Serum diambil untuk digunakan dalam uji aglutinasi. Titer antibodi dilakukan dengan menggunakan microdilution plate 96 sumuran. Sumur 1 dan 2 diisi dengan serum masing-masing 25 μ l. Serum pada sumur ke-2 diencerkan secara berseri (2n) menggunakan larutan PBS hingga pada sumur ke-10 (2⁹). Sumur ke-12 dijadikan sebagai kontrol negatif yang diisi dengan larutan PBS. Semua sumur (1-12) ditambahkan antigen (Ag) dari vaksin yang diuji masing-masing 25 μ l. Microplate digoyang-goyangkan selama 3 menit untuk homogenisasi larutan dan selanjutnya diinkubasi selama 1 jam dalam suhu ruang dan disimpan dalam refrigerator selama satu malam. Reaksi aglutinasi antigen dan antibodi ditandai dengan munculnya semacam titik menyebar di dasar sumuran. Sedangkan jika tidak terjadi aglutinasi ditandai dengan munculnya titik yang terpusat di tengah-tengah dasar sumuran (dibandingkan kontrol positif dan kontrol negatif). Uji titer antibodi dilakukan selama 3 periode yaitu sebelum vaksinasi

Tabel 1 Titer rata-rata antibodi

Perlakuan	Rata-rata Titer antibodi		
	Prevaksin	Vaksin I	Vaksin II
Suntik	5.33	58.67	85.33
Rendam	5.33	42.67	64.00
Oral	5.33	24.00	42.67
Kontrol	5.33	9.33	18.67

nasi, tujuh hari setelah vaksinasi, dan tujuh hari setelah booster. 2.5. Pengamatan Kualitas Air Pemeliharaan Selama penelitian, kualitas air pemeliharaan ikan uji terus dipantau dan diukur beberapa parameter kritis untuk budidaya ikan mas meliputi kadar oksigen terlarut (*dissolved oxygen*, DO), pH, dan suhu.

HASIL DAN PEMBAHASAN

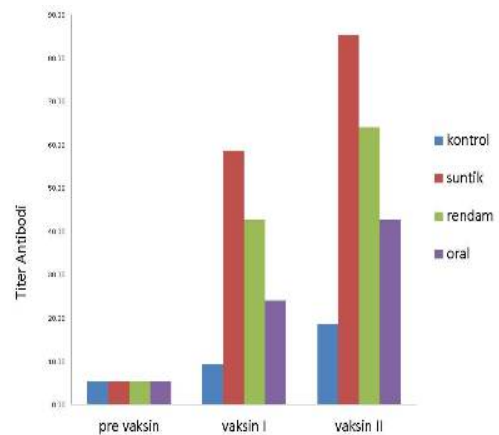
Pembuatan vaksin

Inaktivasi bakteri *A. salmonicida* dengan formalin 1,5 % efektif membuat bakteri *A. salmonicida* sudah inaktif yang ditandai dengan tidak ada koloni pada medium GSP dari hasil kultur 24 jam. Hasil pengukuran kepadatan vaksin dengan spektrofotometer menunjukkan kepadatan vaksin adalah $3,2 \times 10^{10}$ cfu/ml.

Titer antibodi

Hasil titer antibodi sebelum dan sesudah vaksinasi dan booster disajikan dalam Tabel 1. dan Gambar 1.

Hasil titer antibodi tersebut menunjukkan adanya peningkatan titer antibodi dari sebelum vaksin (pre vaksin), setelah vaksinasi I, dan setelah vaksinasi II (booster) untuk semua perlakuan, baik suntik, rendam, oral, maupun kontrol. Namun, ikan yang divaksin memiliki peningkatan titer antibodi yang sangat signifikan dibandingkan dengan kontrol. Peningkatan titer antibodi tertinggi terjadi pada perlakuan suntik yaitu dari 5,33 sebelum vaksinasi menjadi 85,33 setelah booster, kemudian dilanjutkan dengan perlakuan rendam (5,33 menjadi 64,00), oral (5,33 menjadi 42,67) dan kontrol (5,33 menjadi 18,67).



Gambar 1 Peningkatan rata-rata titer antibodi ikan yang divaksin dan kontrol

Parameter Kualitas Air

Selama kegiatan penelitian, kualitas air untuk pemeliharaan ikan mas masih dalam kisaran hidup normal ikan mas. Secara lengkap parameter kualitas air disajikan dalam Tabel 2.

Pembahasan

Peningkatan titer antibodi pada ikan yang divaksin mengindikasikan adanya pengaktifan respon imun spesifik terhadap antigen (*whole cell A. salmonicida*). Berdasarkan dari respon imun terhadap antigen, antigen dibedakan menjadi dua jenis yaitu antigen ekstraseluler dan antigen intraseluler. Antigen ekstraseluler merupakan antigen yang masuk ke dalam tubuh inang tetapi tidak sampai masuk ke dalam sel, hanya berada di luar sel. Secara alamiah antigen ekstraseluler terjadi pada infeksi bakteri pada umumnya, parasit, dan jamur. Sedangkan antigen intraseluler merupakan antigen yang mampu menginfeksi sampai ke dalam sel seperti pada infeksi virus dan beberapa bakteri yang mampu menginfeksi ke dalam sel. Antigen ekstraseluler yang masuk ke dalam tubuh pertama kali akan direspon oleh sel-sel APC (*antigen presenting cells*) yang terdiri dari makrofag, sel-sel dendrit, dan sel limfosit B. Antigen akan dipecah menjadi framen-framen yang lebih kecil (epitop) kemudi-

Tabel 2 Parameter Kualitas Air

Perlakuan	Parameter					
	Pagi			Sore		
	DO (ppm)	Suhu(°C)	pH	DO(ppm)	Suhu(°C)	pH
Suntik	6.35	25 -26	7.5	5.45	25 -26	7.8
Rendam	6.85	25 -26	7.7	6.15	25 -26	7.8
Oral	6.49	25 -26	7.8	5.30	25 -26	7.8
Kontrol	6.76	25 -26	7.6	5.23	25 -26	7.8
BakuMutu (khairuman, 2008)	>3	25 -30	6 - 8	>3	25 -30	6 - 8

an oleh sel-sel APC fragmen-fragmen antigen tersebut akan dipresentasikan kepada sel limfosit T melalui molekul major *histocompatibility complex* kelas II (MHC kelas II). Sel T menangkap antigen tersebut melalui TCR (*T-cell receptor*). Sel T yang teraktivasi akan mensekresikan sitokin-sitokin (seperti interleukin 2 atau IL-2, IL-4, dan IL-6) untuk memicu pengaktifan sel B. Sel B yang teraktivasi akan berproliferasi dan mengalami diferensiasi menjadi sel B plasma dan sel B memory. Sel plasma akan mensekresi antibodi-antibodi yang sangat spesifik terhadap antigen yang ditangkap oleh APC, sedangkan sel memory berfungsi untuk mengingat antigen sehingga ketika ada infeksi kedua (*booster*) maka sel-sel imun akan merespon dengan lebih cepat [10]. Perlakuan vaksinasi dengan metode suntik menunjukkan memiliki titer antibodi yang paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Hasil ini juga sesuai dengan beberapa penelitian lainnya seperti pada vaksin polivalen vibrio [11] dan vaksin *A. hydrophila* [12]. Hal tersebut disebabkan karena antigen lebih efektif masuk ke dalam tubuh dan akan mudah direspon oleh sel-sel imun. Berbeda dengan perlakuan rendam dimana antigen masuk melalui pori-pori tubuh ikan seperti linea lateralis atau metode oral dimana sebagian antigen ada yang terdegradasi oleh enzim-enzim pencernaan di saluran pencernaan seperti protease, amilase, dan lipase. Secara umum, vaksin inaktif *A. salmonicida* bersifat imunogenik yaitu mampu merespon sel-sel imun pada ikan mas. imunogenisitas suatu antigen dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain ukuran, kompleksitas, dan bentuk antigen. Ukuran

antigen merupakan faktor yang paling penting dalam imunogenisitas antigen. Kebanyakan antigen yang imunogenik (imunogen) memiliki berat molekul 10 kDa atau lebih. Dilihat dari kompleksitasnya, protein merupakan imunogen karena protein merupakan polimer kompleks yang tidak berulang-ulang. Bentuk antigen juga mempengaruhi imunogenisitas antigen. Antigen yang tidak mudah larut air lebih imunogenik dibanding antigen yang mudah larut air karena antigen yang tidak larut air akan siap ditangkap oleh makrofag sebagai sel yang bertugas memperkenalkan antigen (*antigen presenting cells*, APC) kepada sel T [13].

Acknowledgements Kami memberikan apresiasi yang sangat besar kepada Stasiun Karantina Ikan Kelas I Panjang atas segala bantuan dan kerjsamanya dalam penelitian ini. Kami juga ucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian Universitas Lampung atas bantuan dana penelitian dalam bentuk DIPA UNILA.

PUSTAKA

1. Austin, B. and D.A. Austin. 2007. *Bacterial Fish Pathgen, Disease of Farm and Wild Fish fourth edition*. Springer-Praxis Publishing, UK. 552p.
2. Anonim, 2007. *Penyakit Ikan Karantina Golongan Bakteri*. Pusat Karantina Ikan.
3. Zhou, Y.C., Hui H., Jun W., Ben Z., dan Yong Q. S. 2002. Vaccination of The Grouper, *Epinephelus awoara*, againsts Vibriosis Using The Ultrasonic Technique. *Aquaculture* 203: 229-238.
4. Evenberg, D., P. de Graff, B. Lugtenberg, W.B. Van Muiswinkel. 1988. Vaccine-induced protective immunity against *Aeromonas salmonicida* tested in experimental carp erythroderma-

- titis. *Journal of Fish Disease* Vol 11, Issue 4: 337-350
5. Nikl., L., L.J Albright, T.P.T. Evelyn. 1991. Influence of seven immunostimulants on the immune response of coho salmon to *Aeromonas salmonicida*. *Dis. Aquat. Org.* vol 12: 7-12
 6. Marsden, M.J., L. M. Vaughan, T.J. Foster, and C.J. Secombes. 1996. A Live (DaroA) *Aeromonas salmonicida* Vaccine for furunculosis Preferentially Stimulates T-Cell Responses Relative to B-Cell Responses in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Infection and Immunity*, Vol 64: 3863-3869
 7. Kollner, B. and G. Kotterba. 2002. Temperature dependent activation of leucocyte populations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after intraperitoneal immunisation with *Aeromonas salmonicida*. *Fish & Shellfish Immunology* Vol 12, Issue 1: 35-48
 8. Kamiso H.N. dan Triyanto. 1992. Vaksinasi monovalen dan polivalen vaksin untuk mengatasi serangan *Aeromonas hydrophilla* pada ikan lele (*Clarias* sp). *Jurnal Ilmu Pertanian* (Agriculture Science). 4 (8) : 447-464.
 9. Roberson, B.S., 1990. Bacterial agglutination. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S., dan van Muiswinkel, J. (Eds.), *Techniques in Fish Immunology*. SOS Publications, Fair Haven, NJ; pp.81-86.
 10. Abbas, A.K. and A. H. Lichtman. 2005. Cellular and Molecular Immunology, Fifth Edition, Updated Edition. Elsevier Saunders. Pennsylvania. 564p.
 11. Kamiso H.N., A. Isnansetyo, Triyanto, dan M. Murdjani, dan L. Sholichah. 2005. Efektivitas vaksin polivalen untuk mengendalikan vibriosis pada kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*). *J. Fish. Sci.* VII(2): 95-100.
 12. Mulia, D.S., C. Purbomartono, A. Isnansetyo, dan Murwantoko. 2010. *Uji Lapang Penggunaan Vaksin Polivalen Aeromonas hydrophilla Pada Gurami (Osphronemus gouramy Lac.)*. Prosiding Seminar Nasional Tahunan VII Hasil Penelitian Perikanan dan Kelautan, Jurusan Perikanan, Fakultas Pertanian UGM-Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Yogyakarta 24 Juli 2010.
 13. Madigan, M.T., J.M. Martinko, dan J. Parker. 2003. *Brock Biology of Microorganisms*, Tenth edition. Prentice Hall, Pearson education, Inc., New Jersey. 1019p.

