

PENGARUH INTERVAL BOOSTER TERHADAP PRODUKSI ANTIBODI PADA LELE DUMBO (*CLARIAS GARIEPINUS*) YANG DIVAKSIN DEBRIS *AEROMONAS HYDROPHILA*

The effect of booster intervals on antibody production in African catfish (Clarias gariepinus) vaccinated by debris of Aeromonas hydrophila

Awik Puji Dyah Nurhayati¹, Rarastoeti Pratiwi² dan Triyanto³

Program Studi Biologi
Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada

ABSTRACT

Vaccination is the one method to control disease of *Motile Aeromonas Septicemia* on African catfish (*Clarias gariepinus*). The aim of this research was to determine the effect of booster intervals using *Aeromonas hydrophila* debris on immune response of African catfish.

The research was constructed as CRD, c.i. 95 %. Firstly, thirty five catfish were reinfected and reisolated (three times) with *A. hydrophila*. The virulent *A. hydrophila* was broken by sonication into debris. Thirty catfish were divided into six treated groups, i.e.(1) control [K₁]; (2) placebo control [K₂] with debris vaccination; (3) without booster [P₁]; (4) once booster [P₂]; (5) twice boosters [P₃]; (6) three times boosters [P₄]. Booster interval was once a week. Data were taken for ten weeks. The parameter assessed was antibody titer were analyzed by ANOVA and Duncan's Multiple Range Test.

The research showed that the highest antibody titer was reached on the 2nd - 3rd week, and significant differences among all treatments and controls. The vaccination could increase the adaptive response immunity through the increase of antibody titer. Debris vaccine with three times boosters [P₄] was the most effective vaccination.

Key words: *Aeromonas hydrophila*, antibody, booster, debris.

¹ Fakultas MIPA ITS Surabaya

² Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

³ Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

PENGANTAR

Penanggulangan penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) yang disebabkan oleh *Aeromonas hydrophila* pada saat ini masih tertumpu pada penggunaan obat-obat dan antibiotik. Penggunaan antibiotik yang secara terus menerus akan menimbulkan residu dalam daging ikan (Sunaryo *et al.*, 1982), pencemaran lingkungan dan dapat membunuh organisme bukan sasaran (Wu, 1981). Beberapa cara lain yang lebih aman untuk pencegahan penyakit adalah dengan sanitasi lingkungan (Roberts, 1993; Kokarkin & Sumartono, 1990), meningkatkan nutrisi yang diberikan maupun dengan vaksinasi (Nitimulyo dan Triyanto, 1990). Vaksinasi untuk mencegah penyakit MAS menurut Plumb (1984) mempunyai prospek yang baik, meskipun masih terdapat masalah aplikasi di lapangan (Pasaribu dkk., 1990), jenis dan kualitas vaksin, cara vaksinasi, konsentrasi bakteri, lama waktu vaksinasi (Taufik, 1982) dan heterogenitas antigenik (Nitimulyo dkk., 1997).

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu pembentukan antibodi pada ikan sangat bervariasi, penelitian Nitimulyo dkk., (1990), Isabel and Pauley (1983) dan Pyle and Dawe (1985) menyatakan bahwa puncak titer antibodi dicapai pada minggu kedua dan ketiga setelah vaksinasi. Namun demikian antibodi tetap terdeteksi selama 6 minggu berturut-turut. Sedangkan Burrell *et al.*, (2001) mendapatkan titer antibodi yang tertinggi dicapai pada minggu kelima. Penelitian dengan injeksi *sheep red blood cells* (SRBC) dan *horse red blood cells* (HRBC) dalam interval waktu satu bulan pada ikan karper didapatkan titer antibodi paling tinggi pada hari ke-17.

Hasil vaksinasi sangat dipengaruhi oleh *booster* dan sampai sekarang belum diketahui *booster* yang paling tepat untuk mendapatkan antibodi yang tinggi dan lama waktu, sehingga dapat melindungi ikan selama masa pemeliharaan (3 bulan). Bakteri *A. hydrophila* tersusun oleh komponen-komponen yang bersifat immunogenik, terutama protein membran sel dan lipopolisakarida yang dapat dikenali oleh makrofag.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh *booster* (1-3 kali) vaksin *debris sel A. hydrophila* dengan interval waktu satu minggu terhadap pembentukan titer antibodi pada lele dumbo (*Clarias gariepinus*).

METODE PENELITIAN

Peningkatan virulensi bakteri *A. hydrophila*

Bakteri *A. hydrophila* sebelum digunakan untuk pembuatan vaksin, ditingkatkan virulensinya terlebih dahulu melalui metode reinfeksi. Reinfeksi dilakukan dengan cara suntikan intramuskular pada lele dumbo (8-10 g/ekor) dan dilakukan sebanyak tiga kali. Sebanyak 0,1 ml suspensi bakteri *A. hydrophila* hasil kultur pada media TSB (*Trypticase Soya Broth*) diinjeksikan pada lele dumbo dan selanjutnya diamati gejala yang timbul. Lele dumbo yang menunjukkan gejala penyakit MAS selanjutnya dilakukan isolasi bakteri *A. hydrophila* pada media GSP agar. Hasil isolasi yang merupakan bakteri *A. hydrophila* selanjutnya digunakan untuk reinfeksi kedua dan seterusnya. Bakteri *A. hydrophila* yang sudah ditingkatkan virulensinya disimpan atau dikultur dalam media yang sesuai untuk pembuatan vaksin.

Preparasi antigen *debris sel A. hydrophila*

Bakteri *A. hydrophila* yang virulen hasil kultur pada media padat, dicuci dengan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) pH 7,4 dengan cara sentrifugasi 3000 rpm selama 15 menit. Selanjutnya sel bakteri yang telah dicuci dilarutkan ke dalam PBS pH 7,4 sebanyak 4 ml dan disentrifus pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Kemudian sel bakteri tersebut dipecah dengan sonikasi selama 60 detik sebanyak empat kali. *Debris* dipisahkan dari sitoplasma dengan menggunakan sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit. Selanjutnya konsentrasi protein diukur dengan menggunakan metode *Bio-red Protein Assay* sesuai dengan prosedur yang dikeluarkan oleh pabrik dengan standart protein BSA (*Bovine Serum Albumin*).

Vaksinasi lele dumbo (*C. gariepinus*) dengan *debris sel A. hydrophila*

Vaksinasi lele dumbo dilakukan secara intramuskular dengan dosis 5 µg/ekor. Tiga puluh ekor lele dumbo (100g/ekor) dibagi dalam enam kelompok perlakuan yaitu (1) kontrol [K₁]; (2) kontrol disuntik PBS steril [K₂]; (3) vaksin dengan *debris* tanpa *booster* [P₁]; (4) *booster* 1 kali [P₂]; (5) *booster* 2 kali [P₃]; (6) *booster* 3 kali [P₄]. Ikan yang divaksin selanjutnya dipelihara dalam bak volume 144 liter dan selama penelitian ikan uji diberi pakan pelet dengan kadar protein sebanyak 30% secara *ad libitum* pada pagi dan sore hari. Air

pemeliharaan dilakukan pergantian setiap 2 hari sekali dengan cara memberi aliran air dengan debit 1,5 liter/menit selama 96 menit.

Pengamatan

Dalam penelitian ini data yang dikumpulkan meliputi titer antibodi lele dumbo dan kualitas air yang meliputi oksigen terlarut (DO) metode Winkler, karbondioksida (CO₂) bebas metode Winkler, pH dan suhu air dengan termometer yang dilakukan setiap minggu selama 10 minggu.

Pengambilan darah (0,2 ml/ekor) dilakukan dengan spuit dan jarum ukuran 2,5 ml pada *vena caudalis*. Selanjutnya darah disimpan dalam refrigerator semalam dan hari berikutnya disentrifus pada kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan antiserum dengan sel darah. Antiserum yang dihasilkan selanjutnya digunakan untuk uji titer antibodi dengan menggunakan metode mikrotiter.

Data hasil penelitian (titer antibodi) dianalisis varian dan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) dengan tingkat kepercayaan 95%. Disamping itu data titer antibodi juga dilakukan analisis polinomial untuk melihat kecenderungan (trends). Sedang data kualitas air dilakukan secara deskriptif.

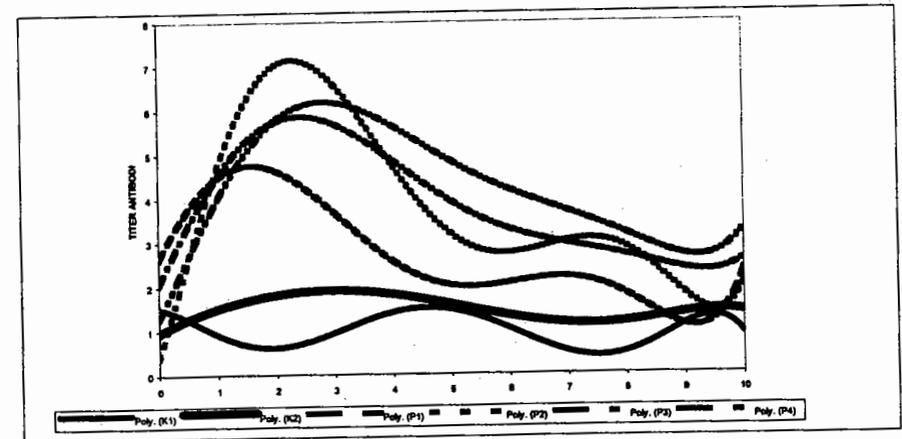
HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan analisis polinomial (Gambar 1.) tampak bahwa setelah pemberian vaksin *debris A. hydrophila* pada semua perlakuan (kecuali kontrol K₁) titer antibodinya cenderung meningkat dan mulai terjadi penurunan pada minggu 4-10. Peningkatan titer antibodi paling tinggi terjadi pada minggu kedua kecuali pada P₁ justru terjadi penurunan (Tabel 1.). Perbedaan ini terjadi karena pada P₁ tidak dilakukan *booster*.

Tabel 1. Pengaruh vaksin *debris A. hydrophila* terhadap titer antibodi lele dumbo (*C. gariepinus*)

No	Perlakuan	Sebelum divaksin	Rerata minggu 1-5	Rerata minggu 6-10	Perubahan minggu 1-10
1	K1 Kontrol	22	21,07a	20,73a	2-0,34
2	K2 Kontrol disuntik PBS steril	21	21,67a	21,33ab	2-0,34
3	P1 Vaksin <i>debris A. hydrophila</i> tanpa <i>booster</i>	22	23,60b	21,87bc	2-1,73
4	P2 Vaksin <i>debris A. hydrophila</i> <i>booster</i> 1 kali	20	25,33c	22,47cd	2-2,86
5	P3 Vaksin <i>debris A. hydrophila</i> <i>booster</i> 2 kali	22	25,00c	22,73de	2-2,27
6	P4 Vaksin <i>debris A. hydrophila</i> <i>booster</i> 3 kali	21	25,40c	23,33e	2-2,07

Keterangan : Rerata yang diikuti huruf superscript yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji DMRT dengan taraf uji 5%



Poly. K1 : Kontrol	$y = -0.0005x^6 + 0.0179x^5 - 0.2307x^4 + 1.3809x^3 - 3.8261x^2 + 4.1609x$	$R^2 = 0.2349$
Poly. K2 : Kontrol disuntik dengan PBS steril	$y = -5E-05x^6 + 0.0016x^5 - 0.0173x^4 + 0.0937x^3 - 0.3814x^2 + 1.2562x$	$R^2 = 0.584$
Poly. P1 : Divaksin dengan <i>debris A. hydrophila</i> tanpa <i>booster</i>	$y = 0.0006x^6 - 0.0177x^5 + 0.2053x^4 - 0.998x^3 + 1.4324x^2 + 1.9875x$	$R^2 = 0.7902$
Poly. P2 : Divaksin dengan <i>debris A. hydrophila</i> <i>booster</i> 1 kali	$y = 0.0011x^6 - 0.0405x^5 + 0.5405x^4 - 3.3139x^3 + 8.6849x^2 - 5.4802x$	$R^2 = 0.9722$
Poly. P3 : Divaksin dengan <i>debris A. hydrophila</i> <i>booster</i> 2 kali	$y = 0.0003x^6 - 0.0118x^5 + 0.1593x^4 - 0.9591x^3 + 2.1336x^2 + 0.7253x$	$R^2 = 0.9406$
Poly. P4 : Divaksin dengan <i>debris A. hydrophila</i> <i>booster</i> 3 kali	$y = 0.0004x^6 - 0.0149x^5 + 0.2035x^4 - 1.2882x^3 + 3.3847x^2 - 1.0233x$	$R^2 = 0.8942$

Gambar 1. Perubahan titer antibodi pada lele dumbo yang divaksin dengan *debris Aeromonas hydrophila*.

Rata-rata titer antibodi perlakuan P₂ pada minggu kedua dan ketiga paling tinggi yaitu sebesar 2^{6,66} dibandingkan dengan perlakuan lain, namun pada minggu keempat mulai terjadi penurunan sampai minggu kesepuluh. Sedang rata-rata titer antibodi pada perlakuan P₃ dan P₄ yang tinggi dan berlangsung lebih lama yaitu sampai minggu kelima, lebih lama dibandingkan dengan perlakuan lain. Hal ini disebabkan waktu paruh imunoglobulin pada Teleostei adalah 12-16 hari. Setelah pemberian vaksin pada ikan akan terjadi periode laten, kemudian disusul periode biosintesis antibodi. Pada minggu kedua dan ketiga merupakan fase logaritmik pembentukan antibodi sehingga dalam jumlah besar karena pertambahan sel plasmasit sebagai hasil pembelahan terulang limfosit B. Oleh karena itu pada 2-3 minggu setelah vaksinasi akan terjadi puncak produksi antibodi (Gambar 1.). Hasil serupa juga diperoleh Pyle and Dawe (1985). Dalam penelitian tersebut vaksin protein sel *Tetrahymena pyriformis* pada *Channel catfish* secara suntikan intramuskular mendapatkan puncak titer antibodi pada minggu ketiga dan tetap ada selama 6 minggu.

Lama waktu pemberian dan frekuensi *booster* dapat mempengaruhi pembentukan respon imun pada ikan. Hal ini terlihat pada perlakuan yang *dibooster* tiga kali menunjukkan rata-rata titer antibodi lebih tinggi. Hal ini diduga sel limfosit B dalam perjalanan kontak dengan antigen dapat terdeferensiasi menjadi sel plasma yang memproduksi antibodi dan sentroblas yang akhirnya menjadi sel memori. Sel memori ini mampu memberikan respon yang lebih cepat dan efisien terhadap stimulasi ulang dari antigen yang sama (Ellis, 1988). Meskipun demikian pemberian *booster* tidak akan memberi efek yang optimal apabila diberikan pada saat yang tidak tepat. Menurut Ellis (1988) pemberian *booster* yang tepat adalah pada saat produksi antibodi sudah mulai menurun. Oleh karena itu pemberian *booster* yang terlalu cepat, yaitu pada saat antibodi belum mencapai puncak, maka *booster* tersebut tidak akan memicu respon imun yang optimal.

Pemberian *booster* dapat meningkatkan pembentukan antibodi, hal ini terlihat adanya perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) pada perlakuan P₃, P₂ dan P₄. Pada uji lanjut perlakuan dari minggu keenam sampai kesepuluh tidak berbeda dengan minggu pertama sampai kelima. Pada perlakuan P₃ dan P₄ tidak menunjukkan beda nyata ($P > 0,05$). Pada minggu pertama sampai kelima perlakuan P₂ tidak beda nyata dengan perlakuan P₄, tetapi pada minggu keenam sampai kesepuluh perlakuan P₂ menunjukkan beda nyata dengan perlakuan

P₄ ($P > 0,05$). Hal ini berarti bahwa perlakuan P₄ merupakan cara vaksinasi yang paling baik.

Dalam penelitian ini kualitas air masih dalam kondisi normal untuk kehidupan lele dumbo. Kisaran suhu adalah 24-27^o C, kadar oksigen terlarut 1-6,5 ppm, kandungan CO₂ 0-5 ppm dan pH 6,9-7,2.

Vaksin *debris* sel bakteri *A. hydrophila* yang diberikan pada lele dumbo dapat merangsang respon imun humoral berupa pembentukan antibodi. Hal ini disebabkan vaksin *debris* sel bakteri *A. hydrophila* mengandung lipopolisakarida serta beberapa protein. Jenis molekul tersebut bersifat imunogenik tanpa melibatkan limfosit T (*Thymus independent antigen*). Antigen tersebut dapat memicu secara langsung limfosit B yang kemudian menghasilkan antibodi. Antibodi yang dihasilkan oleh antigen tak-tergantungan timus sebagian besar adalah bentuk IgM (Subowo, 1993). Sedang efektifitas vaksin sangat tergantung pada jenis vaksin. Hal ini diduga *debris* sel terdiri dari dinding sel bakteri yang tersusun oleh peptidoglikan, lipoprotein, lipopolisakarida (LPS), fosfolipid dan protein sisik luar lapisan peptidoglikan, merupakan fraksi antigen yang dapat merangsang tubuh untuk menghasilkan antibodi.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa vaksin *debris* sel *A. hydrophila* yang *dibooster* 1-3 kali dengan interval waktu satu minggu meningkatkan titer antibodi lele dumbo (*C. gariepinus*). Dari penelitian ini diketahui bahwa vaksinasi dengan *booster* 3 kali merupakan cara vaksinasi yang paling baik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Dirjen Dikti RI, yang telah memberi kesempatan untuk mengikuti pendidikan S2 melalui beasiswa BPPS di Program Pascasarjana UGM Yogyakarta. Disamping itu penulis juga mengucapkan terima kasih kepada rekan-rekan di Laboratorium Hama dan Penyakit Ikan Jurusan Perikanan Fakultas Pertanian UGM atas bantuan dan kerjasamanya yang tidak mengenal lelah.

DAFTAR PUSTAKA

- Burrels, C., Williams, P.D., Southgate, P.J., Wadsworth, S.L., 2001. Dietary nucleotides : a novel supplement in fish feeds. 2. Effects physiology of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 199 : 171-184.
- Ellis, A.E. 1988. Optimizing Factor for Fish Vaccination. In. Ellis, A.E (edit) *Fish Vaccination*. Academic Press Ltd., London. P.32 - 46.
- Ger, T., and Pauley, B., 1983. Characterization of Immunoglobulins from The Brown Bullhead (*Ictalurus nebulosus*) Produced Against a Naturally Occuring Bacterial Pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Developmental and Comparative Immunology*. 7 : 473-482.
- Isabel, G., and Pauley, B., 1983. Characterization of Immunoglobulins from The Brown Bullhead (*Ictalurus nebulosus*) Produced Against A Naturally Occuring Bacterial Pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Developmental and Comparative Immunology*. 7 : 400-573.
- Kokarkin, C. dan Sumartono, B. 1990. Upaya Pencegahan Penyakit Pada Pembenihan Udang. *Prosiding Seminar Nasional II Penyakit Ikan Dan Udang 16-18 Januari*. Badan Penelitian Dan Pengembangan Pertanian. Hal 175-190
- Nitimulyo, K.H., and Triyanto. 1990. Pembuatan Monovalen dan Polivalen Vaksin Untuk Mengatasi Serangan *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Lele (*Clarias gariepinus*). *Jurnal Ilmu Petanian*, 4(8): 447 - 464.
- Nitimulyo, K.H., 1997. Uji Lapang Penggunaan Vaksin *Aeromonas hydrophila* pada Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*). *Jurnal Perikanan UGM*. I (2) : 17-24.
- Pasaribu, F.H, Dalimunthe, N. dan Poeloengan. 1990 Pengobatan Dan Pencegahan Penyakit Ikan Bercak Merah. *Prosiding Seminar Nasional II Penyakit Ikan Dan Udang 16-18 Januari*. Badan Penelitian Dan Pengembangan Pertanian. Hal 143-152
- Plumb, J.A., 1984. Immunization of warm water fish against five important pathogens. *Symposium on Fish Vaccination*, O.I.E., Paris. 199-222.
- Pyle, S.W., and Dawe, D.L. 1985. Immune response of Channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque to Bacterial and Protozoan Antigen Administered by Three Routes. *Aquaculture*, 46: 1-10.
- Roberts. R.J. 1993. Motile *Aeromonas septicemia*. *Bacterial Disease of Fish*. Inglis. V.,R.J. Robert and N.R. Bromage. Blackwell Scientific Publication. Hal : 312
- Subowo, 1993. *Immunobiologi*. Penerbit Angkasa Bandung.
- Sunarya, Achmad K.S., Santoso dan Fitrianti. 1982. Pengamatan Residu Antibiotik (Oksitetrasiklin) Pada Udang Tambak. *Prosiding Seminar Nasional II Penyakit Ikan Dan Udang 16-18 Januari 1990*. Hal 73-80.
- Taufik, P. 1982. Penyakit Bakterial pada Ikan. *Buletin Warta Mina*. 3 : 18 - 20
- Wu, J., H. Lin, L. Jan, Y. Hsu and Chang. 1981. Biological Control of Fish Bacterial Pathogen *Aeromonas hydrophila* by Bacteriophage AH I. *Fish Pathology*. 15(3/4) : 271-276.