

17

LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING  
TAHUN ANGGARAN 2007 DAN PROPOSAL TAHUN 2008



EVALUASI LAMA PROTEKSI KERAPU  
*Chromileptes altivelis* SETELAH VAKSINASI  
DENGAN VAKSIN RIBOSOMAL *Vibrio*  
*alginolyticus* DAN DIPELIHARA SAMPAI  
UKURAN FINGERLING

Ketua Peneliti  
Ir. Sudarno, M.Kes.

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan  
Nasional Republik Indonesia

Kontrak Nomor : 016/SP2H/PP/DP2M/III/2007  
Tanggal 29 Maret 2007

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN MASYARAKAT  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
Desember 2007

19 - 141/08

17

LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING  
TAHUN ANGGARAN 2007 DAN PROPOSAL TAHUN 2008



EVALUASI LAMA PROTEKSI KERAPU  
*Chromileptes altivelis* SETELAH VAKSINASI  
DENGAN VAKSIN RIBOSOMAL *Vibrio*  
*alginolyticus* DAN DIPELIHARA SAMPAI  
UKURAN FINGERLING

Ketua Peneliti  
Ir. Sudarno, M.Kes.

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan  
Nasional Republik Indonesia

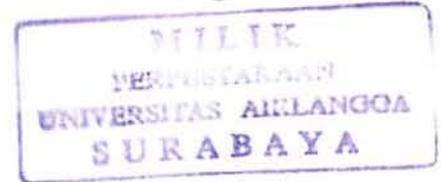
Kontrak Nomor : 016/SP2H/PP/DP2M/III/2007  
Tanggal 29 Maret 2007

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN MASYARAKAT  
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Desember 2007

19 - 141/08

LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING  
TAHUN ANGGARAN 2007 DAN PROPOSAL TAHUN 2008



EVALUASI LAMA PROTEKSI KERAPU  
*Chromileptes altivelis* SETELAH VAKSINASI  
DENGAN VAKSIN RIBOSOMAL *Vibrio*  
*alginolyticus* DAN DIPELIHARA SAMPAI  
UKURAN FINGERLING

**Ketua Peneliti**  
**Ir. Sudarno, M.Kes.**

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan  
Nasional Republik Indonesia  
Kontrak Nomor : 036/SPPP/PP-PM/DP3M/IV/2006  
Tanggal 11 April 2006

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN MASYARAKAT**  
**UNIVERSITAS AIRLANGGA**  
Desember 2007

## HALAMAN PENGESAHAN

### Evaluasi Lama Proteksi Kerapu *Chromileptes altivelis* Setelah Vaksinasi Dengan Vaksin Ribosomal *Vibrio alginolyticus* Dan Dipelihara Sampai Ukuran Fingerling

#### Ketua Peneliti

Nama Lengkap/Gelar : Ir.Sudarno, M.Kes.  
Jabatan : Lektor  
Bidang Keahlian : Penyakit Ikan  
Unit Kerja : Fakultas Kedokteran Hewan  
Alamat Surat : Jl. Mulyorejo Kampus C, Surabaya 60115  
E-mail :  
Tel/fax : 031-599-2785 (K)

#### Tim Peneliti Utama

Nama dan Gelar Akademik	Pangkat/ Golongan	Bidang Keahlian	Instansi	Alokasi waktu (Jam/Minggu)
Ir.Sudarno, M.Kes.	Penata /IIC	Mikrobiologi	FKH Unair	20
Dr.Ir. M. Murdjani, M.Sc.	Pembina/IVC	Penyakit Ikan	BBAP Jepara	15

Biaya yang diterima dari DIKTI untuk tahun 2007 : Rp 35.000.000,-

Mengetahui  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Airlangga



Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D, Drh  
NIP 130 867 305

Surabaya, 1 November 2007  
Peneliti Utama

Ir. Sudarno, M.Kes.  
NIP 131 570 350

Mengetahui  
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Unair



Prof. Dr. H. Sarmanu, M.S., Drh.  
NIP. 130 701 125

## RINGKASAN

Evaluasi Lama Proteksi Kerapu *Chromileptes altivelis* Setelah Vaksinasi Dengan Vaksin Ribosomal *Vibrio alginolyticus* Dan Dipelihara Sampai Ukuran Fingerling

Sudarno, 2007, 43 halaman

---

Kedua bakteri ini *Vibrio alginolyticus* dan *V. anguillarum* adalah penyebab kerugian budidaya kerapu di Indonesia, kematian terjadi pada stadium larva, karena larva yang terinfeksi *Vibrio* hanya bertahan 12 jam. *V. alginolyticus* adalah penyebab kematian utama kemudian diikuti oleh *V. anguillarum*. Vaksin dibuat dari bakteri di atas beserta turunannya ialah polyvalent Ribosomal (Rib), Formalin Killed Cells (FKC), Intracellular Components (ICC), Lipopolisakarida (LPS) dan Outer Membrane Protein (OMP). Ribosomal dan antigen lainnya dicampur dengan kedua bakteri di atas diberikan dengan suntikan kepada ikan. Hasil yang didapatkan dari vaksinasi polyvalent dengan kelima antigen di atas adalah rata-rata sintasan diatas 60 persen. Kandungan proteinnya dari kelima antigen polyvalent adalah FKC 3.5, ICC 3.1, OMP 0.8 dan LPS 0.95 mg/ml. Phagocytic Index meningkat secara nyata dan hampir semuanya di atas 7.5. Peningkatan tersebut seiring dengan naiknya titer antibody lebih dari 1024 sesudah 2 minggu. Tetapi karena kurang sempurnanya ekstraksi LPS, kadang bekas suntikan menyebabkan luka pada ikan. Kerapu yang mati ditandai dengan exophthalmia (pembengkakan mata), pendarahan pada pangkal sirip dada, pendarahan ekor dan mulut, ikan berenang tidak terkontrol dan mulut ikan luka memerah. Tujuan penelitian adalah membuat vaksin polyvalent dari *Vibrio alginolyticus* dan *V. anguillarum* yang terdiri dari Rib, FKC, ICC, LPS dan OMP untuk menanggulangi kematian ikan kerapu *Chromipeltes altivelis*.

## SUMMARY

Evaluation of duration protection of *Chromileptes altivelis* administrated with polyvalent ribosomal vaccine of *Vibrio alginolyticus* and reared until fingerling size

Sudarno, 2007, 43 pages

---

These two of bacterial *Vibrio alginolyticus* and *V. anguillarum* are causative agent of high mortality in grouper industry in Indonesia, the mortality were occurred in larvae stadium because the infected larvae only withstand for 12 h. *V.alginolyticus* is the most virulent *Vibrio* in the grouper seed production and followed by *V. anguillarum*. Polyvalent vaccine were produced from those bacterial and its products namely polyvalent Ribosomal (Rib), Formalin Killed Cells (FKC), Intracellular Components (ICC), Lipopolysaccharide (LPS) dan Outer Membrane Protein (OMP). Ribosomal polyvalent administrated alone by injection while the other antigens were mixed with Ribosomal

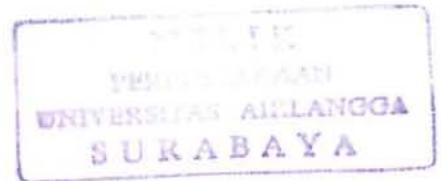
The vaccination revealed that 5 antigens given the survival rate more than 80 percent. Protein contents polyvalent vaccine of FKC 3.5, ICC 3.1, OMP 0.8 and LPS 0.95 mg/ml. Phagocytic Index increased significantly to more than 7.5, it was also occurred in antibody production in fish which were more than 1024 after 14 days treatment.

Due to improper LPS extraction, the smell of gasoline was left in LPS formulae feed, therefore fish doesn't fed well. The dead fish exhibited clinical signs such as exophthalmia, hemorrhage in base pectoral fin, tail and the mouth, showing the spiral movement and the mouth to be red in color.

## KATA PENGANTAR

Industri perikanan sebenarnya bisa mensejahterakan rakyat Indonesia karena 75 % luas Indonesia terdiri dari laut. Industri perikanan bisa menjadi lumbung pangan Indonesia karena luasnya dan suburannya lahan yang dimiliki. Banyak sekali ikan ekonomis oneting yang mulai bisa dibudidayakan oleh para petani/nelayan dalam kurun beberapa tahun kedepan perikanan merupakan industri raksasa bagi ekonomi Indonesia, selain hal tersebut sektor perikanan mempunyai peran yang sangat besar dalam penyediaan pangan nasional. Sumberdaya perikanan laut merupakan kekayaan alam yang bisa diperbaharui, dan banyak yang dicuri oleh nnelayan asing, sehingga banyak menyebabkan kerugian bagi pemerintah Indonesia. Tetapi industri penangkapan ikan sampai saat ini sudah dalam keadaan jenuh, karena kecepatan berkembang biak ikan lebih cepat dari penangkapannya. Penelitian perikanan di Indonesia tertinggal jauh dibandingkan dengan sktor pertanian lainnya apalgi jika dibandingkan dengan luar negeri. Kendala teknis budidaya, penyakit baaru yang timbul serta permasalahan sosial tidak kalah peliknya dan sangat sukar dipecahkan. Kegagalan pembenihan kerapu, udang dan beberapa organisme air lain sering disebabkan oleh masalah penyakit dan pelanggaran kaidah budidaya. Kerapu tikus *Chromileptes altivelis* adalah ikan tak terpisahkan dari ekologi laut sehingga gangguan kualitas air sedikit saja mengakibatkan ikan mati. Penelitian tentang vaksinasi kerapu ini adalah sebagian kecil dari problema diatas, kasus infeksi penyakit tersebut sering terjadi di berbagai tempat di Indonesia dan bahkan sering terjadi di Jawa Timur, terutama di panti pembenihan dan kolam pembesaran.

Harapan kami, penelitian vaksinasi kerapu ini dapat dilanjutkan pada vaksinasi lapangan untuk mengatasi problema penyakit kerapu dan mendapatkan data yang akurat karena kemungkinan hasilnya bisa berbeda.



## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	ii
DAFTAR ISI	iii
1. PENDAHULUAN	1
2. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	3
3. TINJAUAN PUSTAKA	4
4. METODE PENELITIAN	14
5. HASIL DAN PEMBAHASAN	22
6. KEPUSTAKAAN	37
LAMPIRAN	
1. PROPOSAL PENELITIAN TAHUN 2008	44
2. RENCANA ANGGARAN PENELITIAN TAHUN KEDUA	49
3. DUKUNGAN TERHADAP PELAKSANAAN PENELITIAN	53
3. SARANA DAN PRASARANA	53
5. JADWAL PENELITIAN	54

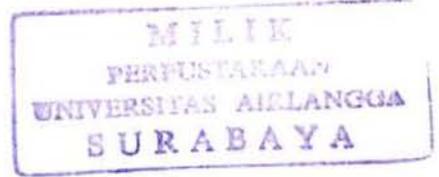
## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Priority aquaculture vaccine needs in each country or continents.....	6
Tabel 2. Current list of vaccines licensed for aquaculture world wide .....	7
Tabel 3. Toksisitas dari Extracellular products (ECP) dan Intracellular components (ICC) <i>V. anguillarum</i> dan <i>V. alginolyticus</i> terhadap kerapu....	25
Tabel 4. Proteksi ribosomal dari <i>V. alginolyticus</i> dan <i>V. anguillarum</i> .....	26
Tabel 5. Proteksi FKC dan ribosomal dari <i>V. alginolyticus</i> dan <i>V. anguillarum</i> .....	27
Tabel 6. Proteksi ICC dan ribosomal dari <i>V. anguillarum</i> dan <i>V. alginolyticus</i> .....	28
Tabel 7. Proteksi LPS dan ribosomal dari <i>V. anguillarum</i> dan <i>V. alginolyticus</i> .....	29
Tabel 8. Proteksi OMP dan ribosomal dari <i>V. anguillarum</i> dan <i>V. alginolyticus</i> .....	30
Tabel 9. Kinerja macrophage ikan kerapu yang telah divaksin dengan berbagai macam vaksin <i>V. anguillarum</i> dan <i>V. alginolyticus</i> .....	31
Tabel 10. Produksi antibody kerapu yang divaksin dengan Ribosomal, FKC, ICC, LPS, dan OMP.....	32

## DAFTAR GAMBAR

- Gambar 1. Elektrophoresis dari 5 vaksin *V. anguillarum* dan *V. alginolyticus*.....33
- Gambar 2. Kandungan protein dari beberapa komposisi vaksin kerapu .....34

## I. PENDAHULUAN



### 1.1. Latar Belakang Pentingnya Penelitian

Sampai saat ini penyediaan benih kerapu menjadi permasalahan utama didalam industri kerapu. Salah satu permasalahan yang dihadapi didalam produksi benih adalah sintasan benih yang sangat rendah sekitar 2-3 persen. Telah diketahui penyebab kematian tersebut adalah bakteri *Vibrio alginolyticus* dan *Vibrio anguillarum* didalam panti pembenihan (Murdjani, 2004) dan disebabkan oleh Virus Nervous Necrosis (VNN). Ikan kerapu yang ukuran 4-6 g kematiannya berlangsung sangat cepat, tidak lebih dari 12 jam sesudah infeksi. *V. alginolyticus* adalah spesies yang paling ganas kemudian diikuti oleh *V. anguillarum* sedangkan beberapa spesies *Vibrio* sp. tidak menyebabkan kematian yang signifikan. Kematian yang diakibatkan oleh kedua bakteri diatas dapat mencapai 97-98 persen dari total populasi ikan, suatu kematian yang sangat tinggi dan hanya menyisakan ikan yang hidup sekitar 2-3 persen. Pencegahan infeksi dan pengobatan telah dilakukan tetapi menghadap kendala ukuran ikan yang masih kecil. Selain hal tersebut ikan yang masih kecil belum bisa makan bervariasi, karena sampai usia 30 hari ikan masih diberi pakan berupa ikan rucah dan belum bisa makan pellet komersial yang ada dipasar. Vaksinasi bisa dilakukan dengan suntik, tetapi vaksinasi yang ideal adalah secara oral. Pada penelitian lain dicobakan vaksinasi oral pada ikan dengan pertimbangan bahwa lewat pakan sesuatu keniscayaan untuk ikan yang masih sangat kecil.

Sekarang vaksinasi akan diberikan lewat suntikan dengan harapan jika lewat suntik bisa memberikan proteksi yang tinggi, pada masa yang akan datang akan dicobakan lewat oral misalnya lewat pakan. Jika lewat pakan permasalahan yang dihadapi adalah palatabilitas dari pakan yang telah dicampuri vaksin dan kelarutan substansi vaksin didalam air. Pakan kemungkinan tidak menjadi terasa enak, bahkan pakan bisa terasa pahit, asam atau manis. Karena berharga mahal kerapu banyak dibudidayakan sehingga penyakit ini jika tidak cepat ditangani dikawatirkan pola penyebarannya mirip penyakit pada udang sehingga semakin sulit ditangani.

Rentetan permasalahan diatas akan mengakibatkan menurunnya perolehan devisa negara, kesejahteraan petani serta kebutuhan gizi masyarakat.

## **1.2. Permasalahan Budidaya Ikan Kerapu**

Sampai saat ini SR kerapu hanya sekitar 2-3% di panti pembenihan sehingga untuk mencukupi kebutuhan benih masih sangat kurang. Kematian kerapu ukuran 4-6 g berlangsung sangat cepat, tidak lebih dari 12 jam sesudah infeksi. *V.alginolitycus* adalah spesies yang paling virulent kemudian diikuti oleh *V. anguillarum* sedangkan beberapa spesies *Vibrio* sp tidak menyebabkan kematian yang tinggi. Pada ukuran tersebut vaksinasi layaknya diberikan secara oral, karena untuk penyuntikan vaksin masih terlalu kecil, minimal berat ikan adalah 15 g. Jika sudah siap untuk dipindahkan ke jarring apung vaksinasi bisa dilakukan dengan penyuntikan. Tetapi sampai berapa lama vaksin tersebut bisa memberikan proteksi pada ikan belum diketahui sepenuhnya dengan pasti. Karena pemberian booster selain menyebabkan ikan stres juga ongkos produksi menjadi mahal serta karkas yang dihasilkan tidak bagus. Kerapu banyak dibudidayakan oleh petani ikan sehingga penyakit ini jika tidak cepat ditangani dikawatirkan pola penyebarannya mirip penyakit pada udang sehingga semakin sulit ditangani jika sudah terjadi wabah yang sangat luas.

## II. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

### 2.1. Tujuan Penelitian

1. Membuat vaksin vibriosis ribosomal polyvalent untuk menanggulangi penyakit ikan kerapu dan untuk menekan kerugian yang sangat besar.
2. Membuat vaksin vibriosis polyvalent yang bisa memberikan proteksi tinggi dan lama atau paling tidak sampai usia komersial .
3. Mencegah kerugian yang besar dan menjaga kontinuitas ekspor ikan kerapu ke mancanegara dan didalam negeri.
4. Budidaya yang berhasil akan memberikan lapangan kerja yang banyak bagi masyarakat luas

### 2.2. Manfaat Penelitian

1. Vaksin monovalent dan polyvalent yang baik (memberikan proteksi tinggi) diharapkan bisa menanggulangi penyakit kerapu di panti pembenihan atau kolam pembesaran yang disebabkan oleh *Vibrio*.
2. Menyebarkan metode penanggulangan penyakit kerapu yang disebabkan oleh *Vibrio* sp. terhadap pelaku industri perikanan
3. Mencegah kerugian yang besar dari industri kerapu dan menjaga kontinuitas ekspor ikan kerapu ke manca-negara dan didalam negeri.
4. Menciptakan lapangan kerja bagi masyarakat luas, tidak hanya petani ikan tetapi banyak industri yang terkait dengan industri perikanan.

### III. STUDI PUSTAKA

#### 3.1. Indonesia Produsen Kerapu Terbesar di Dunia

Panjang pantai Indonesia adalah nomor dua sesudah Kanada sepanjang 81.000 km, telah diusahakan untuk budidaya laut mencapai 89.025 Ha. Hingga tahun 1995 dari potensi yang ada telah dimanfaatkan 0.3 % masing-masing untuk ikan 0.5 % (5.120 ton), kerang-kerangan 0.04 % (19.3 ton) dan rumput laut 0.28 % (139.400 ton). Beberapa jenis ikan yang perlu dibudidayakan untuk keperluan ekspor adalah ikan kerapu *Chromileptis altivellis*, kakap merah *Lutjanus* sp, kerapu *Epinephelus* sp, kakap putih *Lates calcarifer*, beronang *Siganus* sp, napoleon *Chelius undulus* (Dit-Jen Perikanan, 1997). Potensi laut Indonesia dan perairan darat Indonesia masih sangat potensial untuk dikembangkan mengingat kebutuhan pangan dunia semakin meningkat setiap tahunnya. Sejak tahun 1992 7.5 juta ton (MT) ikan yang mempunyai kerapui ekonomis tinggi dibudidayakan di dunia, lebih dari 90 persen dihasilkan oleh benua Asia (Main and Rosenfeld, 1994).

Ikan kerapu *Chromileptes altivelis* termasuk *warmwater fish* dengan suhu pemeliharaan optimal 20 - 30°C bisa hidup pada air payau dan laut. Indonesia adalah negara produsen kerapu terbesar didunia dengan produksi 13,94 persen atau 41.000 MT pada tahun 1995. Atau 90 persen hasil tersebut dari tangkapan di alam dan ini harus disertai dengan produksi buatan. Bobot ikan konsumsi adalah 0.5 – 2 kg/ekor dan berharga sangat mahal. Sekarang ikan kerapu telah diekspor sehingga kelangsungan pengiriman ikan harus dijaga, oleh sebab itu kegagalan budidaya yang disebabkan oleh penyakit harus dicegah. Jika *Vibrio* sp. menimbulkan penyakit pada kerapu, kemungkinan disebabkan defense mechanism menurun, karena dalam keadaan stress produksi antibody dan aktifitas phagocytosis terganggu. Salah satu cara untuk mendapatkan panen kerapu yang banyak dalam jangka waktu yang singkat adalah memakai teknik budidaya intensif walaupun banyak kendalanya. Karena semakin tinggi padat penebaran yang digunakan menyebabkan stress pada ikan yang akhirnya menyulut terjadinya penyakit.

### 3.2. Komersial Vaksin dan Komposisinya

Vaksin yang baik adalah yang mampu memberikan proteksi terhadap ikan selama minimal 2 tahun, misalnya untuk *A. salmonicida* (Hasting, 1988) dan harus efektif bisa membunuh bakteri atau mikroorganisme lain. Dengan membunuh patogen, kematian yang disebabkan oleh beberapa mikroorganisme bisa dikurangi. Yang sangat ideal vaksin bisa diberikan dengan biaya yang murah serta efektif untuk vaksinasi dalam jumlah ikan yang besar. Beberapa vaksin yang sudah bisa diproduksi secara komersial adalah Vaksin Furunculosis yang disebabkan oleh *A. salmonicida*, Enteric Redmouth diseases disebabkan *Y. ruckeri* dan *Vibriosis* (Austin and Austin, 1988). Beberapa macam vaksin yang sering digunakan dalam perikanan:

*Whole killed atau disrupted cells bacterins* : Dengan penemuan A layer telah membangkitkan penelitian vaksin didasarkan pada sel utuh (whole cells), khususnya untuk oral, injeksi dan pencelupan dari virulent strain. Beberapa vaksin dibuat dari sel utuh, sedangkan yang lain sel pecah dengan sonikasi atau dengan EDTA. Vaksin yang dibuat dari virulent strain mempunyai beberapa antigen tambahan yang tidak diketemukan pada avirulent strain.

*Extra Cellular Products (ECP) dan ECP-toxoids* : Beberapa komponent dari ECP toksik untuk ikan, kadang berbahaya untuk immunisasi dengan crude ECP tetapi dapat diinaktifkan atau di toxoids kan. Inaktifasi ECP dapat dengan pemanasan atau memakai zat lain, tetapi jika tanpa inaktifasi sangat sulit untuk mendapatkan dosis yang tepat.

*Whole cells dengan ECP* : Vaksin dari sel utuh dan ECP mungkin mengandung antigen yang berbeda. Berbagai macam kombinasi ini telah banyak diteliti. Pada vaksin dari *A. salmonicida*, ECP diinaktifkan dengan chloroform dan diberikan dengan pencelupan.

*Live attenuated vaccines* : Live vaccine mendapat perhatian yang kecil, karena permasalahan keselamatan di lapangan. Vaksin tersebut dipersiapkan dengan menum-buhkan agglutinating virulent strain di laboratorium dalam waktu yang panjang sampai menjadi non agglutinating dan avirulent.

*Antigen murni* : Tiga macam antigen yang telah dicoba ialah protease, lipopolysaccharide (LPS) dan glycoprotein. Ketiga macam antigen tersebut telah diteliti, tetapi belum bisa diproduksi secara komersial.

*Pasif immunisasi* : ikan diimmunisasi dengan antiserum yang didapatkan dari beberapa mamalia misalnya rabbit. Immunisasi ini dapat memberikan proteksi pada ikan.

Dari beberapa hasil penelitian bahwa immunisasi dengan dinding sel bakteri (outer membrane protein/OMP) atau lipopolysaccharide (LPS) menghasilkan proteksi dan titer antibody yang tinggi (Egidius and Anderson, 1979 ; Agius *et al.*, 1983 ; Thorburn and Janson, 1979 ; Salati *et al.*, 1989). Pada umumnya vaksin tersebut berupa monovalent dan masih sedikit yang berupa polyvalent vaksin. Vaksin yang sangat diperlukan oleh berbagai negara disarikan pada Tabel 1 dibawah ini :

Tabel 1. Priority aquaculture vaccine needs in each country or continents

Vaccine needs	Asia	Australia	Europe	Canada	USA
<i>Aeromonas hydrophila</i> bacterin	x				
<i>Aeromonas punctata</i> bacterin	x				
Bacterial infection in penaeid shrimp					x
Bacterial kidney disease				x	x
Cold water disease					x
Columnaris disease	x				x
<i>Edwardsiella</i> species					x
Furunculosis (new form)					x
Iridovirus	x /Jpn				
Monogenean infestation	x				
Myxobacterial infections	x				
Protozoan infestations	x				x

Pseudotuberculosis	x /Jpn				
Rickettsia					x
Saprogleniasis					x
Sea lice infestation	x			x	x
Streptococcal infections	x /Jpn				
<i>Vibrio fluvialis</i> bacterin	x				
<i>Vibrio harveyi</i> infection in penaeid shrimp	x				
<i>Vibrio</i> infection	x				
Viral hemorrhagic septicemia	x				
Viral infection in fish	x			x	
Viral infection (WSBV, YHV, IHHNV) in shrimp	x				
Viral infections (IPN and IHN) in fish					x
Viral infections (SEMBV and Taura) in penaeid shrimp					x

(Referensi : R.A.Schnick et al (1997): World wide aquaculture drug and vaccine registration progress. Bull.Eur.Ass.Fish Pathol. 17 (6) :251-260)

Sedangkan pada Tabel 2, dibawah ini adalah beberapa vaksin yang telah dilisensi dan dibuat secara komersial di berbagai belahan dunia.

Tabel 2. Current list of vaccines licensed for aquaculture world wide

Vaccine needs	Asia	Aus- tralia	Europ e	Cana da	USA
<i>Aeromonas</i> bacterin			x		
<i>Aeromonas salmonicida</i> bacterin			x		
<i>Aeromonas salmonicida</i> bacterin				x	x
<i>Aeromonas salmonicida</i> bacterin				x	

<i>Aeromonas salomonicida</i> immersion vaccine				X	
<i>Aeromonas salomonicida</i> bacterin- <i>Vibrio</i> sp bacterin				X	
<i>Aeromonas salomonicida</i> - <i>Vibrio anguillarum</i> - <i>Salmonicida</i> bacterin				X	
<i>Aeromonas salomonicida</i> - <i>Vibrio anguillarum</i> - <i>Salmonicida</i> bacterin				X	X
Autogenous bacterin			X		
Autogenous bacterin					X
<i>Edwardsiella ictaluri</i> bacterin					X
Infectious Pancretic Necrosis			X		
<i>Pasteurella</i> sp bacterin			X		
<i>Streptococcus</i> sp bacterin	x(Jpn)				
<i>Vibrio</i> sp bacterin		x			
<i>Vibrio</i> sp bacterin (for ayu)	x(Jpn)				
<i>Vibrio</i> sp bacterin (for salmonids)	x(Jpn)				
<i>Vibrio</i> sp bacterin				X	
<i>Vibrio anguillarum</i> bacterin	x		X		
<i>Vibrio anguillarum</i> - <i>Ordalii</i> bacterin				X	X
<i>Vibrio anguillarum</i> - <i>salmonicida</i> bacterin					X
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> bacterin	x				
<i>Vibrio salmonicida</i> bacterin			X		
<i>Vibrio salmonicida</i> bacterin					X
<i>Vibrio anguillarum</i> - <i>Ordalii</i> - <i>Yersinia</i> bacterin					X
Viral haemorrhagic septicemia		-	X		
<i>Yersinia</i> sp bacterin			X		
<i>Yersinia ruckeri</i> bacterin				X	X

(Referensi : R.A.Schnick et al (1997): World wide aquaculture drug and vaccine registration progress. Bull.Eur.Ass.Fish Pathol. 17 (6) :251-260)

### 3.3. Stress Sebagai Pemicu Timbulnya Penyakit

Stress dialami ikan jika sudah tidak sanggup menyesuaikan diri dengan lingkungan (Ellis, 1989). Perubahan yang terjadi karena response terhadap lingkungan disebut General Adaptation Syndrome (GAS). Output-nya berupa adrenocorticotrophic hormone (ACTH) dan corticosteroid dan menghasilkan penyimpanan ion Na<sup>+</sup> dan Cl<sup>-</sup> sedangkan ion K<sup>+</sup> dibuang, akhirnya menyebabkan peningkatan blood glucose dan metabolisme nitrogen. Efek dosis kecil ACTH terhadap jumlah circulating leucocyte mirip efek yang ditimbulkan oleh cold shock. Level plasma cortisol dipakai secara umum sebagai index stress pada ikan salmon (Barton and Iwama, 1991). Level plasma cortisol pada ikan yang tidak stress sangat rendah (<5.0 ng ml<sup>-1</sup>) (Pickering and Pottinger, 1989) tetapi akan naik beratus fold dalam kondisi stress (Sumpter *et al.*, 1985). Kenaikan level cortisol menunjukkan stress-induce immunosuppression (Maule *et al.*, 1987), memperlambat pertumbuhan (Pickering, 1990) dan kerusakan system reproduksi (Carragher *et al.*, 1989; Pottinger and Pickering, 1990). Plasma glucose dan cortisol hanya menunjukkan acutes stress tetapi bukan kondisi yang kronis. Injeksi cortisone terhadap ikan menunjukkan keterlambatan infiltrasi leucocyte pada luka dan inhibisi proses penyembuhan luka.

Pada percobaan yang dilakukan oleh Mushiake *et al.* (1985) menyatakan bahwa kemampuan leucocyte dari belut Jepang *Anguilla japonica* yang distresskan dengan Copper menurun. Produksi Striped jack di Jepang pada tahun 1989 diatas 830 ribu tetapi pada tahun 1990 tidak berproduksi sama sekali karena overcrowding sehingga memicu Viral Necrosis Virus (VNN) (Arimoto, personal communication). Stress juga disebabkan oleh polusi perairan di perairan, yang mengakibatkan menurunnya jumlah leucocyte dan thrombocyte (McLeay and Gordon, 1977). Japanese eel yang distresskan dengan ferric ammonium citrate menjadikan eel sangat peka terhadap *Vibrio anguillarum* (Nakai *et al.*, 1987). Pada ikan kerapu

perubahan yang diakibatkan karena stress belum diketahui, apakah produksi antibody dan proses phagocytosis menjadi kacau jika ikan mengalami stress.

### 3.4. Virulensi *Vibrio* sp. Pada Kerapu

Genus *Vibrio* terdiri dari banyak spesies yang pathogen terhadap ikan kerapu adalah *V. alginolyticus* dan *V. parahaemolyticus* (Murjani, 2004). *V. anguillarum* telah banyak diketahui menyebabkan penyakit ikan diseluruh dunia. Bahkan bakteri tersebut telah lama diketahui sejak tahun 1883 menyebabkan penyakit belut di Mediteran. Selain bakteri diatas *V. ordalii* (Schiewe *et al.*, 1981) dan *V. salmonicida* (Egidius *et al.*, 1986). Bakteri *Vibrio* sp. hidup pada air laut sampai dengan air payau terutama air yang tidak megalir dan kaya akan zat organic. Di Indonesia juga telah diketahui bahwa dua jenis bakteri *Vibrio* yang menyerang udang udang ialah *Vibrio harveyi* dan *Vibrio splendidus* (Sunaryanto dan Mariam, 1986) sama dengan yang terjadi di Philipina (Lavilla-Pitogo, 1992). Sedangkan di Malyasia vibriosis disebabkan oleh bakteri *V. alginolyticus* dan *V. parahaemolyticus* (Anderson, 1988), sedangkan di Jepang *Vibrio* sp banyak dilaporkan menyerang udang *P. japonicus* (Takahashi *et al.*, 1985; Egusa *et al.*, 1988). Di China vibriosis dijumpai pada larva udang terutama disebabkan oleh *V. alginolyticus* dan *V. parahaemolyticus*. (Meng and Yu, 1982).

Bakteri *Vibrio* adalah normal flora pada hewan air, sedangkan opportunistic *Vibrio* spp adalah patogen pada udang. Mortalitas pada udang karena ada interaksi dengan bakteri lain, perubahan kualitas air, jeleknya nutrisi dan adanya luka (Lightner, 1988). Sumber kontaminasi vibriosis adalah dari isi perut yang dikeluarkan bersama faeces dan secara bergantian dengan masa pemijahan, sehingga air merupakan sumber utama vibriosis di hatchery. Histopathology udang yang terserang *Vibrio* adalah multifocal necrosis, hemocytic inflammation, adanya nodule pada lymphoid organ, hati, insang, hepatopaneas, antennal gland, cuticular epidermis dan subcutis dan beberapa connective tissue lainnya.

### 3.5. Sistem Pertahanan Seluler

Aktifitas macrophage terhadap bakteri adalah mekanisme yang penting didalam struktur sistem pertahanan tubuh ikan. Tetapi beberapa pathogen misalnya *Legionella pneumophila* mempunyai kemampuan untuk survive dalam proses phagocytosis oleh macrophage (Dowling *et al.*, 1992). Hasil penelitian Olivier *et al.* (1985, 1986) menunjukkan bahwa single injection dari Freund's Complete Adjuvant (FCA) menaikkan daya bunuh peritoneal macrophage ikan trout terhadap virulent *Aeromonas salmonicida*, menaikkan LD<sub>50</sub> 450 kali. Phagocytosis juga sangat dipengaruhi oleh pakan ikan. Pada penambahan vitamin C dengan 6 variasi, pada 0 mg/kg phagocytosis sangat rendah (Li and Lovell, 1985).

Biochemical pathway dari aktifitas bakteri macrophage sepenuhnya belum diketahui tetapi ada dua mekanisme ialah oxygen dependant system (Lowrie *et al.*, 1985) dan oxygen independent system (Gabig and Babior, 1981). Oxygen dependant system meliputi produksi reaktif oxygen misalnya O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan OH berasal dari non mitochondrial oxygen metabolism yang biasa disebut respiratory burst (Johnson, 1978). Macrophage dapat diaktifkan secara langsung dengan lactins tumbuhan atau mitogen-stimulated T lymphocytes. Bukti bahwa respiratory burst dapat ditimbulkan pada leucocyte ikan melalui studi chemiluminesce (CL) (Stave *et al.*, 1984) dan darah (Higson and Jone, 1984). Ada beberapa kemungkinan menurunnya macrophage dalam ingested partikel ialah kemungkinan tidak memproduksi reaktif oxygen atau aktifitas macrophage tertekan karena berbagai produk hormon karena stress.

Untuk menghitung bakteri yang survive didalam macrophage ada dua macam uji *in vitro* yang dapat dipakai ; uji langsung dengan plate count assay dan tidak secara langsung dengan MTT [3-(4,5-dimethylthiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bro-mide] juga disebut dengan uji colometric. Uji ini untuk mengukur jumlah bakteri yang hidup berdasar reduksi yellow dye dari MTT menjadi purple formazan oleh dehydrogenase enzyme dari bakteri yang hidup (Peck, 1985).

### 3.6. Sistem Pertahanan Humoral

Antibody adalah molekul immunoglobulin yang diproduksi secara langsung sebagai respon terhadap antigen, bisa berbentuk spesifik, non covalen dan reversible terhadap antigen yang menimbulkannya. Hanya ada satu immunoglobulin pada ikan yang telah diidentifikasi ialah IgM (Ellis, 1989). Mamalia IgM terdiri dari lima subunit, i.e. 10 ringan dan 10 heavy polypeptide serta karbohidrat dengan berat molekulnya 900.000 Da. Antibody terdeteksi didalam serum ikan salmon sesudah 6 minggu dari vaksinasi (Landolt, 1989). Pada channel catfish yang divaksinasi dengan *Edwardsiella ictaluri* FKC dengan dan tanpa vitamin C menunjukkan bahwa antibody level pada ikan yang pakannya diberi suplemen vitamin C sangat tinggi (Li and Lovell, 1985).

Antibody dapat dibagi dalam beberapa kategori berdasarkan aktifitasnya misalnya agglutination, precipitation dan virus neutralizing antibodies. Agglutinating antibody mampu mengaktifkan sistem komplemen yang bisa memecah ingested partikel. Precipitating antibody mampu menyebabkan precipitate soluble antigen yang sangat penting sebagai antitoksin dengan menetralkan toksisitas. Sedangkan virus neutralizing antibody dijumpai pula pada serum ikan. Antibody tersebut akan melekat pada permukaan virus partikel sehingga menyebabkan virus tidak bisa menginfeksi sel. Antibody dijumpai di serum, tissue fluid dan mucus (gut, skin and gill). Insang adalah tempat masuknya antigen dalam immersion vaccination (Alexander *et al.*, 1982 ; Smith, 1982).

Pembentukan antibodi pada ikan tergantung beberapa faktor misalnya suhu air dan behavior ikan. Warmwater fish, ikan mas tidak bisa memproduksi antibodi pada suhu air dibawah 12°C tetapi produksi antibody terdeteksi di serum pada suhu 25°C, sedangkan rainbow trout bisa pada suhu 5°C. Beberapa sifat yang mempengaruhi pembentukan antibodi misalnya sex ratio dalam suatu populasi dan beberapa faktor stress (handling, kepadatan, kecerahan, polutan). Dari beberapa hasil penelitian bahwa immunisasi dengan dinding sel bakteri atau lipopolysaccharide menghasilkan titer antibody yang tinggi dan proteksi (Egidius and Anderson, 1979 ; Agius *et al.*, 1983 ; Thorburn and Janson, 1979 ; Salati *et al.*, 1989).

ELISA adalah suatu metode yang sangat efektif dan sensitif untuk mengukur serum antibody. Bisa untuk mendeteksi pada ikan yang kecil sekalipun 10 - 20 gr dengan jumlah serum dari setiap ikan 10 - 30  $\mu$ l (Arkoosh and Kaattari, 1987). ELISA amat sensitif dibandingkan dengan uji immunoprecipitation, agglutination, dan light scattering. Sedangkan SDS-PAGE (Laemli, 1970) and Western blotting (Towbin, 1979) adalah sangat sensitif untuk visualisasi antibody band dari serum.

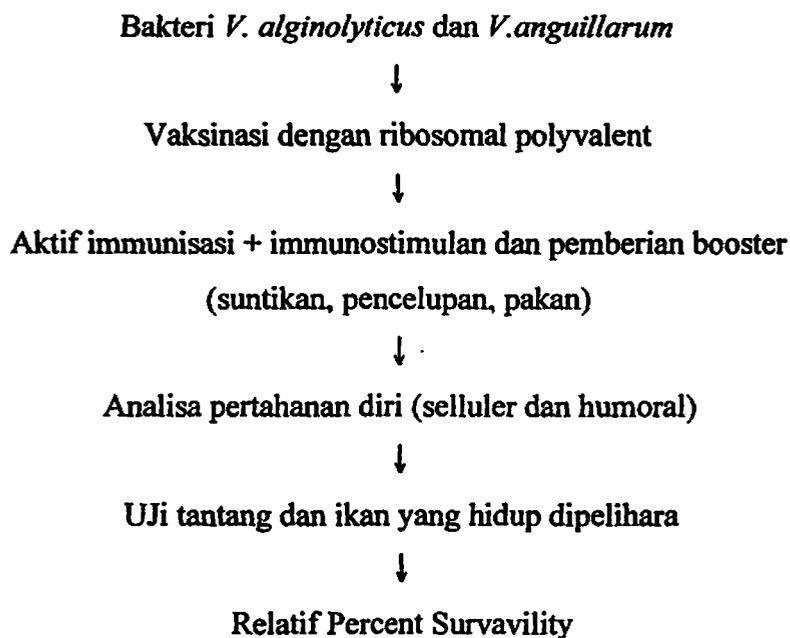


#### IV. METODE PENELITIAN

Penelitian direncanakan selama 3 tahun dilakukan pada Prodi Perikanan Universitas Airlangga, dan Tropical Disease Center di Surabaya dan Balai Budidaya Air Payau (BBAP) di Situbondo. Ikan kerapu yang sehat dibeli dari BBAP Situbondo dan diaklimatisasikan di laboratorium selama 7 hari. Sedangkan percobaan vaksinasi lapangan dilakukan di tambak PT Benur Puteri di Kabupaten Situbondo Jawa Timur. Pada tahun ketiga akan dilakukan vaksinasi di jarring apung/lapangan.

##### *Percobaan Tahun Kedua (2008)*

Imunisasi aktif dengan vaksin ribosomal polyvalent



## **Pembuatan beberapa macam vaksin**

### **Ribosomal vaksin**

*V. alginolyticus* dan *V. anguillarum* dikultur pada Brain Heart Infusion Agar (BHIA) yang mengandung 2% NaCl pada suhu 25°C selama 24 jam, kemudian sel bakteri dikumpulkan dan dicuci dengan Phosphate Buffered Saline (PBS , 0.01M pH 7.1) yang mengandung 2 % NaCl. Bakteri yang telah dicuci kemudian diencerkan pada Phosphate Buffer (PB 0.01M, pH 7.1) yang mengandung 0.01 m MgCl<sub>2</sub>, 0.25 % sodium dodecyl sulfat (SDS), 1µg ml<sup>-1</sup> deoxyribonuclease I dan 0.5 µg ml<sup>-1</sup> deoxyribonuclease II kemudian dipecah dengan homogenizer 0.2 mm glass beads. Bakteri yang telah pecah kemudian disentrifuse pada 27.000 x g selama 15 min. Supernatant yang terbentuk disentrifuse pada 45.000 x g selama 15 min dan 100.000 x g selama 3 jam. Endapan yang terbentuk dilarutkan pada PB yang mengandung 0.5 % SDS dan 0.01 M MgCl<sub>2</sub> pada suhu kamar selama 1 jam kemudian 4 °C selama semalam. Dilanjutkan dengan disentrifuse pada 23 x g selama 15 min, kemudian lapisan dua pertiga atas dikumpulkan. Sesudah sentrifugasi pada 64 x g selama 3 jam, endapannya dilarutkan pada PB yang mengandung 0.1 MgCl<sub>2</sub> dan dipakai sebagai Ribosomal Vaksin (RV).

### **Whole cells vaccine (WCV)**

Vaksin dibuat dari sel utuh yang dimatikan (whole cell vaccine), extracellular product (ECP), intracellular components (ICC) (Suprpto *et al.*, 1996). *Vibrio* sp. ditanam pada NA yang dilapisi cellophane selama 24 - 48 jam, kemudian dipanen, kedalam petri yang berisi bakteri ditambahkan 2 ml phosphate buffer saline (PBS), dicuci sebanyak 3 kali selama 10 menit. Separuh dari bakteri digunakan untuk membuat WCV sedangkan separuhnya untuk bahan *intra cellular component* (ICC) vaccine. Bakteri yang didapatkan dimatikan dengan 3 % formalin selama 72 jam. WCV yang didapatkan dicuci sebanyak 3 kali selama masing-masing 10 menit dengan sentrifugasi. Kepadatan bakteri dibuat sebanyak 50 mg/ml, kemudian disimpan didalam -4°C sampai digunakan.

### **Extracellular products (ECP) vaccine**

Supernatant yang dihasilkan diatas kemudian disaring dengan 0.45  $\mu\text{m}$  steril. Separuhnya diinaktifkan dengan pemanasan 70°C selama 30 menit, sedangkan yang lain tidak. Untuk cek sterilitas 100 $\mu\text{l}$  dari ECP tersebut ditanam pada NA diinkubasikan pada suhu 25°C selama 24-48 jam. ECP yang didapatkan disimpan pada suhu -4°C sampai digunakan.

### **Intracellular components vaccine (ICCV)**

Separuh bagian bakteri dicuci sebanyak 3 kali selama 10 menit. Bakteri yang sudah bersih dipecah dengan sonicator sampai 80-90 persen sel pecah. Pecahan sel bakteri disentrifuse dan supernatannya disaring dengan filter 0.45  $\mu\text{m}$  steril. Sterilitas dicek dengan menumbuhkan pada NA selama 24-48 jam pada suhu 25°C. ICCV yang didapatkan disimpan pada suhu -4°C sampai digunakan.

### **Ekstraksi Lipopolysaccharide (LPS)**

Ekstraksi LPS dilakukan dengan metode Hot phenol methods (Westphal and Jann, 1965) sebagai berikut. bakteri ditanama pada 20 ml broth culture selama 24-48 jam. Bakteri dipanen dengan sentrifugasi pada 6000 x g selama 10 min dan dicuci dengan PBS 10 menit sebanyak 3 kali. Pellet yang didapatkan ditambah PBS dengan konsentrasi akhir 5 % dipanaskan pada waterbath 68°C. Tambahkan dengan larutan ekstraksi pada suhu 68°C dan diaduk pada suhu 68°C selama 20 min. Bakteria dipisahkan dengan sentrifugasi pada 3000 x g selama 15 min. Supernatant yang didapatkan didialisa dengan tap water semalam dan dilyophilize. Lyophilize crude LPS dicampur sampai homogen dengan larutan ekstraksi B selama 2-5 min dalam suhu kamar. Pisahkan choloroform dan petroleum dengan rotary evaporator dan presipitasi dengn distilled water. Kumpulkan presipitasi yang didapatkan dengan sentrifugasi 100,000 x g selama 3 jam, pellet yang didapatkan dicuci dengan air dan pellet yang didapatkan dilyophilisasi.

### **Outer membrane protein vaccine**

Bakteri ditanam pada kultur broth 24 jam, kemudian dipanen dengan sentrifugasi 6000 x g selama 10 menit, dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali 10 menit. Tambahkan pada pellet bakteri 2 ml dari 10 mM EDTA dan diinkubasi selama 30 min pada suhu 45°C. Pecahkan sel bakteri dengan sonicasi selama 60 detik dan pisahkan sel dengan sentrifugasi 6000 x g selama 30 menit. Ambillah dengan haati-hati supernatant yang mengandung outer membrane protein dan didialisa dengan PBS.

### **Immunisasi kerapu**

Ikan yang telah divaksin dengan berbagai dosis LPS, OMP, WKC, ECP diuji tantang *Vibrio* sp. dengan dosis 6-9 x 10<sup>8</sup> cell/fish untuk mengetahui tingkat proteksi vaksin terhadap ikan. Ikan dipelihara dalam aquarium selama 14 hari dan dicatat mortalitasnya. Ikan yang mati diadakan reisolasi dari ginjal untuk memastikan bahwa kematian ikan disebabkan oleh *Vibrio* sp.

### **Pengukuran titer antibody**

Rabbit antiserum dan antiserum standard (kerapu antiserum) yang telah dibuat diatas dipergunakan untuk uji agglutinas. Antigen adalah bakteri *Vibrio* sp. yang telah dimatikan dengan formalin (FKC) dan dicuci dengan PBS. Pengukuran tersebut dilakukan sebagai berikut. Dua puluh lima microliter dari 0.01 M PBS dimasukkan kedalam setiap well. Diluter dipanaskan sampai merah menyala untuk mencegah kontaminasi. Antiserum dimasukkan dan diencerkan mulai dari well pertama sampai well terakhir. Konsentrasi antigen diukur pada spektrophotometer dengan panjang gelombang 530 nm dan abosrbance 0.5. Satu tetes antigen dimasukkan kedalam setiap well, kemudian well dikocok selama 5 menit dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 2 jam. Kontrol dilakukan sama dengan diatas, antiserum yang digunakan diganti dengan PBS. Kerapui agglutinas adalah sebagai beriku :

[4 (well kesatu), 8 (well kedua).....4496 (well kesebelas)]

### **ELISA untuk analisa produksi antibody**

Prosedur ELISA yang dipakai adalah menurut Leiro *et al.* (1993) dengan sedikit modifikasi. Seratus mililiter larutan bakteri ( $1 \times 10^4$  cells/ml PBS) dimasukkan kedalam microtiter plate yang telah dilapisi terlebih dahulu larutan 0.001 % Poly-L-Lysin sebanyak 100  $\mu$ l selama 2 jam pada suhu kamar. Sesudah inkubasi 2 jam pada suhu kamar, plate dicuci dengan PBS yang mengandung 0.05 % Tween-20 (T-PBS) sebanyak 5 kali, diblok dengan 25 % Block Ace dalam PBS dan kemudian 100  $\mu$ l serum kerapu diencerkan dengan PBS ditambahkan pada plate. Sesudah inkubasi 4°C semalam plate dicuci 5 kali dengan T-PBS, kemudian 100  $\mu$ l anti kerapu IgM rabbit IgG dilarutkan pada 1: 200 pada T-PBS ditambahkan pada setiap well dan plate diinkubasikan selama 2 jam pada suhu kamar. Kemudian 100  $\mu$ l horseradish peroxidase-labelled anti-rabbit IgG goat IgG diencerkan 1: 20.000 pada T-PBS ditambahkan pada setiap well. Sesudah inkubasi selama 2 jam pada suhu kamar dan dicuci, 100  $\mu$ l TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine free base tablets) ditambahkan pada setiap well. Reaksi distop dengan penambahan 50  $\mu$ l dari 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dan sesudah 20 menit dan optical density (OD) pada 450 nm diukur dengan Microplate reader.

Konsentrasi antibody diukur dari aktifitas antibody  $\mu$ l<sup>-1</sup> serum dan 4.36  $\mu$ l<sup>-1</sup> adalah sama seperti pada aktifitas standard serum. Pengetesan antiserum standar dilakukan pada plate untuk mengetahui titer individu sampel dengan membandingkan 50% endpoint. Unit antibody OD dari triplicate well dihitung dengan formula sebagai berikut :

$$\text{Aktifitas sampel} = \text{Aktifitas standard} \times \frac{50 \% \text{ standard volume}}{50 \% \text{ volume sample}}$$

### **SDS-PAGE (Laemli, 1970) dan Western blotting (Towbin *et al.*, 1979)**

Antibody didapatkan dari kerapu yang telah divaksin dengan *Vibrio* sp. FKC dan yang tidak divaksin (kontrol) dicampur dengan buffer 0.17 M Tris-HCl (pH 6.8) yang mengandung SDS (5.3%) dan 2-mercaptoethanol (13.2%). SDS-PAGE dilakukan pada 10 % gel dengan buffer Tris (0.025M) glycine (0.192M) yang mengandung 0.1M SDS dilakukan pada voltase 150 selama 1 jam. Protein band

yang terjadi divisualisasi dengan Coomassie brilliant blue. Sesudah SDS-PAGE, protein di gel ditransfer secara elektroforesis dengan nitrocellulose membrane filter. Membrane kemudian diblok dengan TBS buffer (20mM Tris HCl, pH 7.5, 0.5M NaCl) pada 2 % skim milk. Sesudah dicuci membrane direaksikan dengan rabbit anti *Vibrio* sp. serum diencerkan 1 : 500 dengan TBS buffer selama 1 jam, dicuci dengan buffer, dan direaksikan dengan alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit Ig swine Ig. Yang terakhir protein band divisualisasikan dengan 5-bromo-4-chloro-3-indoryl phosphate (x phosphate) dan 4-nitroblue tetrazolium chloride (NBT).

### **Isolasi macrophage**

Kerapu disuntik secara intraperitoneally dengan 1-2 ml glycogen untuk merangsang produksi macrophage. Sesudah 24 jam ikan dibiakkan dengan MS-222 dan darah diambil dari pangkal ekor agar macrophage tidak terkontaminasi darah merah. Dua mililiter Leibovitz medium (L-15) yang mengandung 2 % Fetal Bovine Serum (FBS) dan 10 unit/ml heparin disuntikkan kedalam intraperitoneal ikan kerapu, perut ikan diurut-urur dan kemudian macrophage dipanen dengan cara disedot dengan jarum suntik. Sisa macrophage kemudian dicuci dengan 2 ml lagi L-15. Sel macrophage kemudian disentrifuge pada 400xg selama 10 menit dan dilarutkan pada L-15. Viable cell (sel yang hidup) dilihat dan dihitung dengan pengecatan trypan blue, kemudian kepadatan sel dihitung  $2.5 \times 10^6$  cells/ml memakai haemocytometer.

### **Phagocytosis**

Bakteri dan macrophage (Vaksin dan kontrol) dicampur kemudian diinkubasikan pada 25°C selama 30 menit dengan shaking 25 rpm agar terjadi kontak antara macrophage dan bakteri, macrophage diambil untuk dibuat usapan pada slide glass yang telah dilapisi albumin dan diwarnai dengan May-Grunwald Giemsa dan phagocytosis dihitung dengan metode sbb :

$$\text{Phagocytic index} = \frac{\text{Jumlah bakteri yang dimakan oleh macrophage}}{\text{Jumlah macrophage yang memakan bakteri}}$$

$$\text{Phagocytic rate : } \frac{\text{Jumlah macrophage yang makan bakteri}}{\text{Jumlah macrophage yang diamati}}$$

### Uji Aktifitas Bakteri

Pengukuran daya bunuh macrophage terhadap bakteri dilakukan dengan metode Secombes (1993). Bakteri dikultur pada TSB selama 24 - 48 jam pada suhu 25°C, dicuci 3 kali dengan PBS (pH 7.0) dan jumlahnya disetel  $1.3 \times 10^4$  cells/ml pada TSB. Macrophage dicuci dengan L-15 tiga kali yang telah ditambah dengan 2 % FBS dan sodium heparin 10 unit/ml, kepadatan disetel pada  $10^6$  cells/ml kemudian didistribusikan di microtiter plate (100  $\mu$ l/well). H<sub>2</sub>S sebagai stressor dan PBS sebagai kontrol ditambahkan pada macrophage dalam well. Kemudian bakteri dimasukkan pada triplicate wells. Plate kemudian digoyang (shaking) selama 5 menit, kemudian diinkubasikan pada suhu 25°C selama 1, 3, 6 jam. Pada akhir inkubasi, supernatant dibuang dan Tween-20 (0.2%) dimasukkan kedalam well untuk mematikan macrophage. Seratus microliter dari Trypto Soya Broth (TSB) ditambahkan pada well dan diinkubasikan pada suhu 25°C selama 16 jam untuk menumbuhkan bakteria. Yang terakhir 5% larutan MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazoyl-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide] sebanyak 10  $\mu$ l ditambahkan pada well kemudian absorbance dibaca dengan spectrophotometer pada panjang gelombang 620 nm sesudah 15 menit.

Kerapui absorbance pada well dengan bakteri  
(1, 3 dan 6 jam)

$$\text{Bakteri survived dihitung : } \frac{\text{Kerapui absorbance pada 1 jam}}{\text{Kerapui absorbance pada 1 jam}}$$

### Uji plate count

Persiapan uji ini sama dengan uji MTT kecuali sesudah macrophage dibunuh dengan penambahan Tween-20, 5 menit kemudian 50  $\mu$ l dari Physiological Saline (PS) ditambahkan pada well. Dasar dari well discrap dengan hati-hati untuk mengambil semua benda yang menempel. Bakteri yang didapatkan kemudian diencerkan sepersepuluh (10 fold) kemudian ditanam pada media TSA. Jumlah

koloni (Colony Forming Unit/CFU) dihitung sesudah 24 jam inkubasi pada suhu 25°C. Hasilnya kemudian dihitung dengan formula sebagai berikut :

CFU terdeteksi dari macrophage pada X time

---

CFU dari lyscd macrophage pada 0 time

## V. HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampai saat ini penyakit yang disebabkan oleh *V. anguillarum* dan *V. alginolyticus* belum bisa ditanggulangi baik di panti pembenihan maupun di kolam pembesaran. Sintasan kerapu masih sangat rendah sekitar 2-3%, permasalahan inilah yang menghambat budidaya kerapu. Penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio* secara alamiah ditandai dengan gejala klinis pendarahan pada pangkal sirip dada, ekor dan kadang adanya gerakan berenang arah spiral atau gerakan melintir dan sesaat kemudian akan mati. Ikan yang rentan terhadap Vibriosis berusia antara 0-70 hari sedangkan yang dewasa sangat jarang ditemui kematian massal karena kemungkinan sistem imun yang berada didalam tubuh ikan telah berkembang dengan sempurna. Infeksi buatan tidak bisa memeberikan gejala klinis seperti pada infeksi alami, sedangkan infeksi buatan ditandai pendarahan daerah perut, pangkal ekor, mulut, berenang oleng dan mulut merah. Perbedaan mengapa gejala klinis pada infeksi alami tidak bisa diulang pada infeksi buatan kemungkinan karena infeksi buatan memerlukan waktu yang lama dan konsentrasi bakteri yang kecil. Apakah tidak timbulnya gejala klinis seperti infeksi alami disebabkan karena menurunnya patogenitas bakteri atau faktor lain dari bakteri belum diketahui dengan pasti. Tetapi jika kultur bakteri dilakukan secara terus menerus tanpa pernah dilakukan passage pada ikan akan menyebabkan bakteri akan kehilangan patogenitasnya. Pada uji tantang kerapu dengan *Vibrio* diatas rataan waktu kerapu untuk mati bervariasi antara 3 - 5 hari tergantung pada tingkat kesehatan ikan dan kualitas air. Kualitas air yang buruk menyebabkan ikan menjadi stress, tetapi pada penelitian ini kualitas air dijaga pada kondisi ideal untuk budidaya kerapu dengan cara diganti jika air menjadi kotor. Beberapa faktor lain misalnya kepadatan tinggi dan naiknya temperatur air serta jumlah metbolit dari ikan akan menyebabkan ikan menjadi lemah dan rentan terhadap infeksi bakteri maupun faktor penyebab penyakit lain misalnya virus, parasit. Lethal doses 50 percent (LD50) dari *V. alginolyticus* dan *V. anguillarum* pada ikan kerapu disajikan pada tabel 4 dibawah ini.

Sudah diketahui bahwa kedua bakteri *V. anguillarum* dan *V. alginolyticus* pathogen terhadap ikan kerapu (Murdjani, 2004) dan kematian akan lebih cepat jika lingkungan menjadi buruk. Bakteri diatas juga menyebabkan penyakit pada manusia, terutama pada negara Asia Timur misalnya Jepang karena suka makan ikan mentah, tetapi dengan bertambahnya kesadaran terhadap bahaya penyakit diatas sanitasi dan hygiene makanan dikontrol sangat prima di negara tersebut. ICC *Vibrio* bisa menyebabkan kematian ikan (Tabel 5). LD<sub>50</sub> (Tabel 4) kurang lebih sama dibandingkan dengan hasil penelitian Murdjani (2002) ialah  $2.3 \times 10^3$  CFU/fish sedangkan penelitian sekarang  $2.3 \times 10^{3-4}$  CFU/fish. Sedikit perbedaan tersebut kemungkinan disebabkan karena ukuran ikan atau faktor-faktor lain. Dibandingkan dengan udang, patogenitas *Vibrio* sp. mencapai  $10^2$  CFU/fish (de la Pena, 1996), ternyata udang lebih rentan terhadap infeksi *Vibrio* sp. dibandingkan dengan finfish.

Faktor lingkungan sangat berpengaruh kelangsungan hidup ikan, misalnya pada beberapa percobaan pendahuluan yang dilakukan di Laboratorium Perikanan Universitas Airlangga, ikan kerapu gampang sekali mati, hal ini disebabkan karena perbedaan kualitas air, karena setelah dipelihara ditempat asal ikan tidak mati. Kualitas air merupakan permasalahan utama didalam budidaya ikan kerapu sehingga menjaga kualitas air harus menjadi prioritas utama.

Infeksi *Vibrio* menyebabkan kematian yang berbeda terhadap kerapu. Patogenitasnya dipengaruhi oleh ukuran ikan, karena kerapu yang dewasa kematiannya sangat rendah dan kematian tinggi terjadi pada larva. Kemungkinan besar kematian tersebut disebabkan oleh belum berkembangnya sistem imun yang ikan. Sistem imun berkembang sempurna jika ikan telah sempurna didalam pertumbuhannya, suatu misal adalah ikan sebelah, pada waktu berusia 0 sampai dengan 14 hari masih berenang dan berposisi seperti ikan pada umumnya tetapi setelah berusia 15 hari ikan berubah posisi menjadi matanya dikanan semua atau dikiri semua dengan tubuh berubah menjadi horizontal. Kematian pada usia dini juga dialami udang yang terserang Whitespot Baculovirus (WSBV) atau virus dan penyakit lain, udang yang mati umumnya berusia 0 sampai dengan 60 hari dengan kematian sangat tinggi, tetapi udang yang dewasa lebih resisten terhadap infeksi

WSBV dan beberapa virus. Kasus yang unik terjadi pada udang putih, sesudah infeksi akan menyisakan kurang lebih 5 persen dari populasi tetap hidup dan ini menjadi pertanyaan yang sangat menarik. Sebenarnya pengembangan untuk membuat udang yang resisten terhadap penyakit ini dapat dimulai dari udang resisten tersebut, tetapi tanpa dukungan dana yang besar dan sarana yang memadai rasanya tidak mungkin dilaksanakan. Karena untuk membuat udang yang resisten diperlukan paling tidak 10 generasi atau 10 tahun, bahkan ada yang lebih, oleh sebab itu membuat udang yang resisten memerlukan waktu yang lama dan dana yang besar.

Chitosan adalah produk deacetylation dari chitin, dan banyak dipakai didalam pengolahan limbah dan limbah pembuatan minuman misalnya beer dan bisa digunakan sebagai chelator dari logam. Pada budidaya ikan chitosan dikenal sebagai immunostimulan untuk proteksi terhadap infeksi bakteri, sebagai kontrol pemberian vaksin dan sebagai suplemen pakan (Bullock *et al.*, 2000). Chitosan tidak beracun untuk hewan, tetapi jika dilarutkan pada asam asetat dan dimasukkan kedalam kolam pada 1.0 ppm untuk mengendapkan bahan organik dapat menyebabkan toksik akut untuk rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Pada kontrol untuk mengetahui toksisitas, trout mati setelah beberapa jam dimasukkan kedalam 0.75 ppm dan mati 24 jam kemudian setelah dimasukkan kedalam 0.075 ppm. Pada konsentrasi 0.038 ppm menyebabkan kematian setelah 6 hari sedangkan 0.019 ppm tidak menyebabkan kematian sampai 14 hari. Pemeriksaan histopatologi pada insang, kulit, muscle and organ dalam menunjukkan perubahan patologi yang nyata hanya pada insang. Hilangnya lamellar epithelium, hypertrophy dan hyperplasia dari sel lamellar epithelial terjadi pada ikan trout yang dipaparkan pada 0.019 dan 0.038 ppm. Pada trout yang dipaparkan pada 0.75 dan 0.075 ppm chitosan terjadi lamellar fusion yang luas. Dari data diatas diketahui bahwa chitosan terlarut yang asam sangat toksik untuk ikan trout walaupun pada konsentrasi yang rendah sekalipun.

Tabel 3. Toksisitas dari Extracellular products (ECP) dan Intracellular components (ICC) *V. anguillarum* dan *V. alginolyticus*. Ikan kerapu sebanyak 10 ekor disuntik dengan bermacam dosis ditunggu 14 hari. Kontrol disuntik dengan PBS dengan dosis yang sama.

Dosis (ml/ikan)	Toksisitas				Rataan lama kematian	
	<i>V. alginolyticus</i> ECP (mati/tes)	<i>V. alginolyticus</i> ICC (mati/tes)	<i>V. anguillarum</i> ECP (mati/tes)	<i>V. anguillarum</i> ICC (mati/tes)	<i>V. alginolyticus</i> (hari)	<i>V. anguillarum</i> (hari)
0.025	0/10	0/10	0/10	0/10	-	-
0.050	0/10	0/10	0/10	0/10	-	-
0.075	0/10	0/10	0/10	0/10	-	-
0.10	0/10	0/10	0/10	0/10	-	-

Ekstraseluler dari hasil metabolit dari *V. alginolyticus* dan *V. anguillarum* tidak menyebabkan ikan mati karena konsentrasinya rendah. Pembuatan ECP semestinya dengan cellophane plate tetapi karena tidak ada cellophane produksi dilakukan pada media broth. Intracellular juga tidak menyebabkan ikan menjadi mati. Hanya sedikit ikan mati dengan suntikan ICC, tetapi hal tersebut masih menyisakan keraguan apakah kematian memang disebabkan oleh adanya intracellular toxin atau faktor lain. Murdjani (2003) pun melaporkan bahwa extracellular product dari bakteri *V. alginolyticus* tidak toksik dengan cara produksi yang sama, tetapi jika diproduksi dengan cara lain hasilnya kemungkinan akan berbeda. Walaupun ada perbedaan toksisitas dari extracellular disebabkan karena konsentrasi toksin yang berbeda.

Walaupun pengembangan vaksin bukan merupakan satu-satunya pilihan untuk mengatasi penyakit yang terjadi pada budidaya kerapu, tetapi pengembangan toksin ini adalah cara yang dipilih karena praktis terutama jika bisa diberikan secara oral lewat pakan. Komposisi vaksin yang telah dicoba dapat disajikan pada beberapa tabel dibawah ini.

Tabel 4 Proteksi polyvalent Ribosomal dari *V. alginolyticus* dan *V. anguillarum*. Kerapu berat 10 g disuntik dengan ribosomal dengan dosis bervariasi dan dipelihara selama 6 minggu. Dosis untuk uji tantang  $8.7 \times 10^4$  CFU/ml *V. alginolyticus* dan  $8.7 \times 10^5$  CFU/ml *V. anguillarum*

Dosis vaksin (mg/ikan)	<i>V. alginolyticus</i> Mortalitas (mati/tes)	<i>V. anguillarum</i> Mortalitas (mati/tes)	Kontrol (mati/tes)
10	4/10	5/10	9/10
15	4/10	3/10	8/10
20	3/10	4/10	10/10

Antigen ribosomal dari *Vibrio* memberikan proteksi yang cukup terhadap kerapu terutama pada konsentrasi 20 mg/l, dibawah doses tersebut proteksi bervariasi, tetapi pada vaksinasi lain jika dosis terlalu tinggi tidak protektif juga. Rataan berat kerapu yang digunakan adalah 10 g, dengan berat tersebut sistem imunnya sudah bekerja normal. Pada usia 4 minggu sistem imun ikan trout sudah bekerja normal, tetapi perkembangan memorinya minimal 8 minggu. Ninomiya *et al.* (1993) melaporkan bahwa ribosomal vaksin memberikan proteksi yang baik sampai 6 minggu sesudah imunisasi, sesudah itu mempunyai kecenderungan menurun, begitu pula pada ikan yang divaksin dengan FKC sintasan paling tinggi diamati pada 2 minggu sesudah imunisasi, dan mempunyai kecenderungan menurun sampai akhir penelitian. Walaupun kontrol ikan mati sebanyak 77 persen tetapi secara keseluruhan hasilnya memuaskan. Penyakit Vibriosis ini tidak dipengaruhi oleh suhu air karena rata-rata suhu di Indonesia tidak banyak berubah walaupun pada musim hujan sekalipun. Produksi antibodinya juga dipengaruhi oleh tingkat stress ikan, ikan yang stress produksi antibodinya sedikit karena ikan yang stress mengeluarkan kortisol yang menekan produksi antibody oleh limfosit. Ikan memberikan respons yang baik sesudah 8 minggu, karena B cells dan T sel berfungsi sesudah 4 minggu tetapi *T helper cells* dan *memory cells* dewasa sesudah berusia 8 minggu.

Tabel 5 Proteksi polyvalent FKC dan ribosomal dari *V. alginolyticus* dan *V. anguillarum*. Kerapu berat rata-rata 10 g disuntik dengan FKC dan ribosomal dengan dosis bervariasi dan dipelihara selama 6 minggu. Dosis untuk uji tantang  $8.2 \times 10^4$  CFU/ml *V. alginolyticus* dan  $8.4 \times 10^5$  CFU/ml *V. anguillarum*

Dosis vaksin (mg/ikan)	<i>V. alginolyticus</i> Mortalitas (mati/tes)	<i>V. anguillarum</i> Mortalitas (mati/tes)	Kontrol (mati/tes)
10	4/10	4/10	9/10
15	3/10	4/10	8/10
20	2/10	3/10	9/10

Pemakaian immunostimulant dengan vaksin ikan adalah suatu metode yang sangat menarik untuk menaikkan kemampuan proteksi pada ikan. Dengan memperkuat potensi vaksin diharapkan dosis yang rendah sudah dapat memberikan proteksi yang cukup pada ikan. Injeksi vaksin dengan pemberian adjuvant misalnya FCA dapat meningkatkan produksi antibodi yang tinggi (Cipriano and Pyle, 1985). Misalnya vaksinasi sockeye salmon dengan sel utuh bakteri *Renibacterium salmoninarum* yang telah dimatikan (FKC) dicampur dengan adjuvant dapat meningkatkan circulatory antibody. Selanjutnya Cipriano and Pyle (1985) melaporkan bahwa FKC dari *Aeromonas salmonicida* memberikan proteksi yang bagus terhadap furunculosis. Pada vaksinasi adjuvant dapat digunakan tetapi kadang memberikan efek karkas yang kurang baik sehingga tidak disukai konsumen. Tetapi adjuvant tidak diberikan disini dan diganti dengan penambah rasa pakan ikan. Pada sistem imun ikan neutrofil dan monosit merupakan fagosit yang kuat sedangkan eosinofil merupakan fagosit yang lemah. Satu neutrofil dapat memfagosit 5-20 bakteri, sedangkan monosit jauh lebih kuat dibandingkan neutrophil. Macrophag adalah monosit yang matang/dewasa dapat menghancurkan bakteri dalam jumlah yang banyak. Seratus bakteri bisa difagosit oleh satu macrofag, lisosom segera melekatkan diri pada vesikel fagositik dan akibatnya kedua membran menjadi satu dan lisosom akan mengeluarkan asam hidrolase kedalam vesikel.

Tabel 6 Proteksi polyvalent ICC dan ribosomal dari *V. alginolyticus* dan *V. anguillarum*. Kerapu 10 g diberi pakan yang mengandung ICC dan ribosomal dengan dosis bervariasi dan dipelihara selama 6 minggu. Suhu air pada 28°C selama penelitian berlangsung. Dosis untuk ujiantang  $8.2 \times 10^4$  CFU/ml *V. alginolyticus* dan  $8.4 \times 10^5$  CFU/ml *V. anguillarum*

Dosis antigen (mg/ikan)	<i>V. alginolyticus</i> Mortalitas (mati/tes)	<i>V. anguillarum</i> Mortalitas (mati/tes)	Kontrol Mortalitas (mati/tes)
10	5/10	4/10	8/10
15	3/10	2/10	9/10
20	3/10	2/10	9/10

ICC sebenarnya mempunyai kandungan yang sama dengan FKC, hanya apakah substansi yang berada di ICC masih sama dengan di FKC, karena kemungkinan sebagian rusak pada waktu sonikasi bakteri. ICC juga memberikan proteksi yang cukup untuk ikan kerapu, tetapi metode penyuntikan bukanlah metode yang diinginkan untuk vaksinasi ikan jumlah yang banyak. Sebenarnya banyak laporan lain bahwa pemberian bakterin yang merupakan sel utuh bakteri dapat meningkatkan non-specific defense factors. Ujiantang vaksinasi dengan *A. salmonicida* (Jeney and Anderson, 1993) memberikan proteksi tinggi terhadap ikan. Beberapa hasil diatas adalah vaksinasi dengan penyuntikan antigen terhadap ikan. Kelemahan vaksin yang diberikan lewat pakan adalah rasa pakan yang diberi antigen tersebut tidak disukai ikan sehingga perlu memberikan suplemen rasa lain yang disukai ikan. ICC adalah termasuk protective antigens yang dapat membangkitkan respon kekebalan pada ikan kerapu dengan baik jika diberikan dengan cara yang benar. Ada beberapa vaksin yang dibuat dari beberapa serotype misalnya *Vibrio* vaksin yang terdiri dari *V. anguillarum* dan *V. ordalii* yang masing-masing serotype LPS yang berbeda dan pada percobaan sekarang *V. anguillarum* dan *V. alginolyticus* memberikan hasil yang baik. Untuk beberapa ikan vaksin tersebut sudah dijual di Amerika Utara dan Eropa, karena bakteri tersebut kendala utama didalam budidaya ikan trout, salmon dan beberapa ikan lain.

Vaksinasi dengan LPS membuktikan bahwa LPS merupakan antigen yang potensial untuk vaksinasi pada ikan. Laporan dari Egidius and Anderson (1979) ; Agius *et al.*, (1983), Thorburn and Janson (1979) dan Salati *et al* (1989) membuktikan bahwa immunisasi dengan dinding sel bakteri (outer membrane protein/OMP) atau lipopolysaccharide (LPS) menghasilkan proteksi dan titer antibody yang tinggi. Pemberian vaksin dengan cara oral adalah metode yang paling cocok untuk ikan, vaksin oral sebenarnya dapat menghemat tenaga, waktu dan stress pada ikan (Quentel and Vigneulle, 1997). Selain hal tersebut vaksinasi dalam jumlah yang sangat banyak juga sangat menyulitkan. Vaksin oral terhadap furunculosis memberikan hasil yang menjanjikan (Duff, 1942) walaupun hasilnya bervariasi (Post, 1966; Schachte 1978; Fryer *et al.*, 1976,1978; Amend and Johnson, 1981). Mengapa vaksinasi oral hasilnya berbeda-beda?. Kemungkinannya adalah antigen telah rusak di *stomach* dan *foregut* sebelum mencapai *hindgut* (Rombout *et al.*, 1985) sehingga memberikan hasil yang bervariasi. Hasil vaksinasi kerapu dengan LPS disajikan pada Tabel 9 dibawah ini.

Tabel 7 Proteksi kerapu dengan polyvalent LPS dan ribosomal dari *V.anguillarum* dan *V. alginolyticus*. Berat rata-rata ikan 10 g disuntik dengan LPS dan ribosomal dengan dosis bervariasi dan dipelihara selama 6 minggu. Dosis untuk uji tantang  $8.2 \times 10^4$  CFU/ml *V. alginolyticus* dan  $8.4 \times 10^5$  CFU/ml *V. anguillarum*

Dosis antigen (ml/ikan)	<i>V. alginolyticus</i> Mortalitas (mati/tes)	<i>V.anguillarum</i> Mortalitas (mati/tes)	Kontrol (mati/tes)
0.025	4/10	5/10	8/10
0.050	3/10	3/10	7/10
0.075	2/10	2/10	9/10

Proteksi LPS cukup baik untuk *V. alginolyticus* dan *V. anguillarum*, tetapi sayang bahwa ekstraksi LPS belum sempurna karena LPS masih berbau phenol atau bensin. Bau tersebut ikan tidak mau makan pakan yang telah dicampuri LPS sehingga pemberian pakan diberikan secara paksa dengan dibuka mulutnya. Pada

penelitian yang dilakukan oleh Kusdarwati *et al.* (2005) dilaporkan bahwa ikan yang disuntik dengan LPS membuat borok pada bekas suntikan dan menyebabkan ikan menjadi mati. LPS sebenarnya adalah endotoxin didalam supernatan setelah sel bakteri pecah, karena LPS terdapat pada bagian luar dinding sel Gram negatif bakteria dan bersifat tahan panas. Antigen yang mempunyai Berat Molekul (BM) lebih dari 5 kD saja yang immunogenik, sedangkan yang lebih kecil tidak. Sampai sekarang masih diketahui bahwa ikan hanya mempunyai IgM yang tersusun dari karbohidrat. IgM adalah immunoglobulin utama khusus untuk infeksi terhadap bakteri, tetapi immonoglobulin ini affinitasnya sangat rendah.

Tabel 8 Proteksi OMP dan ribosomal dari *V.anguillarum* dan *V. alginolyticus*. Kerapu dengan berat rata-rata 10 g disuntik dengan OMP dan ribosomal dengan dosis bervariasi dan dipelihara selama 6 minggu. Dosis untuk ujiantang  $8.2 \times 10^4$  CFU/ml *V. alginolyticus* dan  $8.4 \times 10^5$  CFU/ml *V. anguillarum*

Dosis antigen (ml/ikan)	<i>V.anguillarum</i> Mortalitas (mati/tes)	<i>V. alginolyticus</i> Mortalitas (mati/tes)	Kontrol (mati/tes)
0.025	3/10	3/10	9/10
0.050	4/10	3/10	8/10
0.075	3/10	2/10	10/10

Dilaporkan oleh Vinitantharat *et al.* (1993) antigen dari bakteri utuh yang dimatikan FKC, ICC dan LPS memberikan hasil proteksi yang baik. Jeney (1993) juga melaporkan bahwa pemberian FKC dan immunostimulant meningkatkan non specific defense factor dibandingkan dengan ikan yang menerima hanya FKC saja. Pemberian FKC dengan ribosomal ternyata juga memberikan proteksi terhadap ikan kerapu. Kontrol ikan tidak semua mati, karena kontrol hanya menerima PBS saja, tetapi sudah cukup memberikan gambaran bahwa vaksinasi ini berhasil. Sintasan dari FKC, ICC, LPS sangat tinggi bahkan ada yang mencapai 80 persen. Antigen adalah substansi yang bereaksi dengan antibodi atau bisa mengaktifkan T cells dan umumnya semua antigen adalah immunogen. Rendahnya produksi

antibodi pada ikan yang divaksin dengan ECP mungkin disebabkan karena rendahnya konsentrasi antigen pada ECP tersebut. Misalnya hapten merupakan substansi yang rendah BMnya yang bisa berikatan dengan antibody khusus tetapi tidak bisa membangkitkan pembentukan antibodi. Peningkatan kinerja macrophage kadang dibarengi dengan peningkatan *lytic substance* yang terdiri dari beberapa substansi misalnya protease, nuclease, lipase atau lysozyme (Suprpto, 2001). Sebenarnya untuk mencapai vaksinasi yang maksimal seluruh komponen penyusun vaksin harus diketahui. Vinitnantharat *et al.* (1993) melaporkan juga bahwa penyuntikan OMP dari *E. ictaluri* terhadap catfish *I. Punctatus* memberikan efek proteksi yang baik, bahkan titer antibody juga tinggi dibandingkan dengan yang disuntik dengan vaksin lain. Puncaknya dicapai pada 3 minggu sesudah penyuntikan antigen terhadap ikan. Pada prinsipnya memang benar bahwa *Cellular immunity* dan *humoral immunity* dapat dibangkitkan dengan pemberian vaksin ataupun immunogen lain. Salah satu cara mengetahuinya dengan melihat peningkatan *Cellular immunity* ditandai dengan meningkatnya Phagocytosis Index (PI) (Tabel 11) dari *peritoneal macrophage*, sedangkan *humoral* ditandai dengan meningkatnya titer antibody dari kerapu (Tabel 12).

Tabel 9. Kinerja macrophage ikan kerapu yang telah divaksin dengan berbagai macam vaksin polyvalent *V. anguillarum* dan *V. alginolyticus*. Uji phagocytosis dilakukan pada minggu kedua dan ketiga setelah pemberian.

Aktifitas phagocytosis macrophage kerapu dengan berbagai vaksin						Kontrol
Vaksinasi	Rib	FKC	ICC	LPS	OMP	
Minggu 2	8.1	7.8	7.7	8.0	7.5	1.1
Minggu 3	8.0	8.6	8.0	7.9	7.6	1.1

Pemberian *booster* pada vaksinasi ikan diharapkan dapat menjaga produksi antibodi tetap stabil sampai pada beberapa minggu sesudah vaksinasi. Vaksinasi pada ikan memang lebih sulit dibandingkan dengan mamalia, karena system pemberian vaksin yang sulit. Lewat pakan dikawatirkan beberapa substansi penting

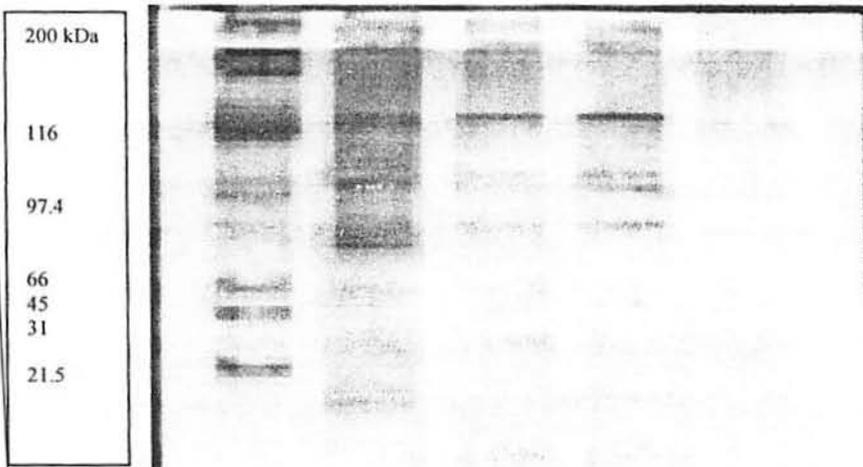
vaksin akan hilang sedangkan dengan suntik memerlukan waktu, biaya yang besar. Dan yang paling penting dapat menyebabkan ikan stress. Misalnya pemberian pakan dengan dosis vitamin C yang tinggi 3000 mg/kg/pakan dapat meningkatkan resistensi ikan terhadap penyakit pada catfish atau ikan lain, sehingga vitamin C perlu diberikan pada ikan sebagai suplemen tambahan (Ellis, 1988). Polutan yang dibuang ke perairan dapat mempengaruhi dan menurunkan fungsi phagocyte cells (Mushiake, 1985), bahkan polusi yang disebabkan oleh beberapa logam berat dapat menyebabkan anemia pada ikan. Hasil elektroforesis Gambar 1 dibawah menunjukkan protein band yang kemungkinan bersifat *protective antigen*, untuk mengetahui mana yang bersifat immunogen harus dilakukan pemisahan dan diuji potensi biologisnya satu persatu pada kerapu. Tetapi gambaran kasar bahwa substansi vaksin diatas memberikan proteksi pada kerapu setelah uji tantang. Produksi titer antibodi pada kerapu sesudah vaksinasi disajikan pada Tabel 11 dibawah ini.

Tabel 10 Produksi antibody kerapu yang divaksin dengan berbagai komposisi FKC, ICC, LPS dan OMP. Serum diambil 2 minggu sesudah vaksinasi kerapu.

Titer antibodi ikan kerapu sesudah divaksin dengan berbagai komponen vaksin dari <i>V. anguillarum</i> dan <i>V. alginolyticus</i> (1:.....)						Kontrol
Vaksinasi	Rib	FKC	ICC	LPS	OMP	
1 minggu	1.024	1.024	512	512	512	120
2 minggu	1.024	1.024	1.024	1.024	512	120

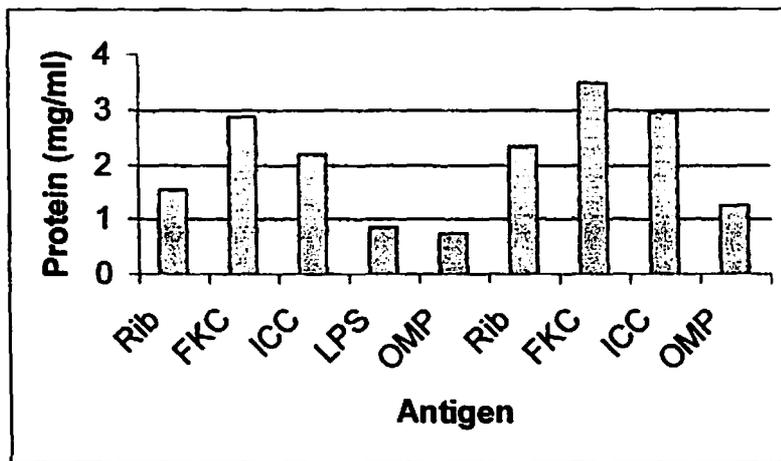
Pada beberapa penelitian misalnya Song *et al.* (1985) melaporkan bahwa peningkatan produksi antibody ikan yang divaksin tidak ada hubungannya dengan proteksi ikan. Tetapi pada hasil penelitian sekarang produksi antibody kerapu yang divaksin dengan empat macam komposisi vaksin menunjukkan peningkatan produksi antibody yang tinggi dan juga dibarengi dengan proteksi yang tinggi. Kontrol ikan menunjukkan sedikit peningkatan titer antibody sampai akhir penelitian. Konsentrasi protein dari beberapa antigen yang dipakai dalam penelitian ini bisa dilihat pada Gambar 2.

BM antigen berkisar antara 5 - 180 kD, tetapi berapa MW yang bersifat protektif belum diketahui dengan pasti. Pemisahan dengan *ion exchange chromatography* dan *gel filtration* diperlukan untuk mengetahui potensi proteksinya terhadap kerapu. Elektroforesis dari 5 komponen antigen menunjukkan bahwa BM dari *protective antigen* berada pada semua komponen vaksin. Tetapi ada pita tipis yang terbentuk karena konsentrasi kedua substansi tersebut rendah, sebaliknya pada FKC dan ICC yang mempunyai konsentrasi yang tinggi. Hasil tersebut bisa dilihat pada Gambar 2 tentang kandungan protein dari kelima komposisi vaksin.



Gambar 1. Elektrophoresis dari 5 komposisi vaksin polyvalent *V. anguillarum* dan *V. alginolyticus*. Lane 1 adalah marker, 2. RBS 3. LPS, 3. ICC, 4. OMP dan 5. FKC.

Kandungan protein tinggi mulai dari FKC, ICC, OMP dan LPS. Jika kelima komponen vaksin tersebut digabungkan dan ditambahi dengan beberapa immunostimulant kemungkinan besar mempunyai proteksi yang tinggi pada ikan karena beberapa komponennya bisa dengan mudah diserap ikan.



Gambar 2. Kandungan protein dari beberapa vaksin polyvalent yang dicobakan pada kerapu lewat pemberian suntikan. Sebelah kiri adalah kandungan protein *V. alginolyticus* dan kanan *V. anguillarum*.

Jika diamati dengan benar kandungan protein vaksin berhubungan dengan tingkat proteksi dari vaksin yang digunakan. Komposisi vaksin yang dicobakan pada kerapu mempunyai tingkat proteksi bervariasi. Pada beberapa vaksin misalnya LPS tidak disukai ikan karena disebabkan kurang sempurnanya ekstraksi yang dilakukan sehingga masih menyisakan bau avtur.

Chitin adalah selulose kedua yang terbanyak di alam sebagai polymer alami. Sepanjang deacetylation dari produk chitosan, chitin biasanya dibuat dari cangkang krustase khususnya kepiting dan udang. Banyaknya limbah dari krustase kebutuhan bahan baku dari chitosan tidak pernah kekurangan dan hasilnya banyak digunakan dalam berbagai sector kehidupan. Kebanyakan chitosan dipakai sebagai *nontoxic cationic flocculent* pada pengolahan limbah, pabrik minuman dan juga chelator dari logam. Juga sekarang sedang dilakukan untuk pengobatan luka pada manusia, agen hemostatik, system pemberian obat dan sebagai agen penurun kolesterol. Penggunaan untuk pertanian termasuk pelapisan untuk biji, pengawetan buah-buahan, sebagai fungistat dan sebagai flocculent untuk pengambilan limbah protein. Pada budidaya perikanan telah dipakai untuk immunostimulan untuk meningkatkan proteksi ikan salmon terhadap infeksi bakteri (Anderson and Swicki, 1994 Swicki *et al.*, 1994). Jika digunakan sebagai aditif pakan, chitosan bebas dilaporkan tidak

toksik terhadap tikus pada pakan 10 g/kg berat badan (Arai et al., 1968), tetapi jika diberi pakan 20 g/kg sebagai chitosan acetat, 40 % dari tikus sedang

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Komponen vaksin polyvalent ribosomal yang dicobakan pada kerapu memberikan proteksi yang tinggi, komponen tersebut adalah polyvalent Ribosomal, FKC, ICC, OMP dan LPS. Kelima vaksin polyvalent tersebut mempunyai *protective antigen* walaupun proteksi dan konsentrasinya bervariasi. Kelima vaksin polyvalent tersebut memberikan proteksi 90, 80, 90, 80 persen terhadap kerapu. Konsentrasi protein vaksin polyvalent mempunyai korelasi dengan proteksi pada kerapu. Konsentrasi protein pada vaksin masing-masing adalah FKC 3.5, ICC 3.1, OMP 0.8 dan LPS 0.95 mg/ml. Titer antibodi LPS rendah minggu pertama 512 dan mencapai 1024 pada minggu kedua sesudah pemberian booster sedangkan yang lain mencapai diatas 1024 semua.

### Saran

Percobaan vaksinasi lapangan sebenarnya harus dilakukan sesudah percobaan laboratorium, karena kadang penelitian laboratorium bagus tetapi di lapangan kadang akan terjadi sebaliknya. Jika bisa untuk penelitian yang akan datang bisa dilakukan pemberian vaksin dilewatkan pakan, karena inilah sebenarnya metoda yang paling cocok dan efisien pada vaksinasi ikan dan jika dicampur dengan alginate dapat digunakan sebagai kontrol pengeluaran protein oleh bakteri misalnya bakterin (Polk *et al.*, 1994) dan sebagai suplemen diet (Kono *et al.*, 1987)

## PUSTAKA

- Agius, C., M.T.Horne and P.D.Ward (1983) : Immunization of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson, against vibriosis: comparison of an extract antigen with whole cell bacterin by oral and intraperitoneal routes. J. Fish Dis., 6 : 129 - 134.
- Ahne, W., W. Popp and R. Hoffman (1982) : *Vibrio sp. fluorescens* as pathogen of tench *Tinca tinca*. Bull. Europe. Ass. Fish Path., 4 : 56 - 57.
- Allen, D. A., B. Austin and R. R. Colwell (1983) : Numerical taxonomy of bacterial isolates associated with a freshwater fishery. J. Gen. Microbiol., 129 : 2043 - 2062.
- Alexander, J.B., A. Bower, G.A. Ingram and S.M.Shamshoon (1982) : The portal of entry of bacteria into fish during hyperosmotic infiltration and the fate of antigens. Dev. Comp. Immunol. Suppl., 2 : 41 -46.
- Amend, D.F. and K.A. Johnson (1981) : Current status and future needs of *Vibrio anguillarum* bacterin. Dev Biol Stand 49 : 403-417.
- Arkoosh, M.R. and S.L.Kaatari (1987) : Effects of early aflatoxin B1 exposure on *in vivo* and *in vitro* antibody responses in rainbow trout *Salmo gairdneri*. J.Fish Biol., 31 : 19 - 22.
- Anderon, D.P. and A.K. Siwicki (1994) : Duration of protection against *Aeromonas salmonicida* immunostimulated with glucan or chitosan by injection or immersion. Prog.Fish-Cult. 56 : 258-261.
- Austin, B. and D. Austin (1987) : Bacterial Fish Pathogen. Ellis Hoorwood.London. pp 250 - 260.
- Aoki, T., Kitao,T., Itabashi,T., Wada,Y., Sakai,M. (1981) : Proteins and lipopolysaccharides in the membrane of *Vibrio anguillarum*. Develop. Biol. Standard., 49, 225 - 232.
- Barton, B.A. and G.K.Iwama (1991) : Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. Ann. Rev. Fish Dis, 1991 : 3 - 26.

- Bullock, G.L., V. Blazer, S. Tsukuda and S. Summerfelt (2000) : Toxicity of acidified chitosan for cultured rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 185 : 273-280.
- Carragher, J.F., J.P. Sumpter, T.G. Pottinger and A.D. Pickering (1989) : The deleterious effects of cortisol implantation on reproductive function in two species of trout *Salmo trutta* and *Salmo gairdneri* Richardson. *Gen and Comp Endocrin.*, 76 : 310 - 321.
- Chart,H. and Trust, T.J. (1984) : Characterization of the surface antigen of the marine fish pathogens, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalli*. *Can. J. Microbiol.*, 30, 703 - 710.
- De Figueirredo, J. and Plumb, J.A (1977) : Virulence of difference isolate of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish. *Aquaculture* 11 : 349-354.
- Direktorat Jenderal Perikanan (1977) : Makalah Direktur Bina Program Pada Pertemuan Koordinasi dan Pemantapan Rekayasa Teknologi Pembenihan Lintas Unit Pelaksana Teknis Direktorat Jenderal Perikanan di Yogyakarta, 8 - 12 Juni 1977.
- Duff, D.C.B. (1942) : The oral immunization of trout against *Bacteri salmonicida*. *J.Immunol.*, 44 : 87-94.
- Dowling, J.N., A.K. Saha and R.H.Glew (1992) : Virulence factors of the family *Legionellaceae*. *Microbiol. Rev* 56 : 32 - 60.
- Egidius, E.C. and K. Anderson (1979) : Bath-immunization a practical and non stressing method of vaccination sea farmed rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson against vibriosis. *J.Fish Dis.* 2, 405 - 410.
- Ellis, A.E. (1989) : The Immunology of Teleost. In *Fish Pathology*. Ed. by R.J. Robert. Baillere Tindall London, pp 92 - 104.
- Egidius,E. and Anderson,K. (1979) : Bath immunization a practical and non stressing method of vaccinating farmed sea rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson against Vibriosis, *J.Fish.Dis.* 2, 405 - 410.
- Ellis, A.E. (1988) : *Fish Vaccination*. Academic Press. pp 1 - 50.
- Evelyn,T.P.T (1984) : Immunization against pathogenic vibriosis. In *Symposium Fish Vaccination*, ed. P. de Kinkelin,Paris : Off. Int. Epiz. pp.121 - 150.

- Fryer, J.L., Rohovec, J.S. and Garrison, R.L. (1978) : Immunization of salmonid for control of Vibriosis. *Mar. Fish Review*, 40, 20 - 23.
- Figueras, A., M. M. Santarem and B. Novoa (1997) : *In vitro* immunostimulan of turbot *Scophthalmus maximus* leucocytes with beta glucan and/or *Photobacterium damsela* bacterin. *Fish Pathol*, 32 : 153 - 157.
- Fryer, J.L., J.S. Rohovec, G.L. Tebbit, J.S. Michael, K.S. Filcher (1976) : Vaccination for control infectious disease in Pasific salmon. *Fish Pathol.*, 10 : 155-164.
- Fryer, J.L., J.S. Rohovec, R.L. Garrison (1976) : Immunization of salmonid for control of vibriosis. *Mar Fish Rev* 40 : 20-23.
- Gabig, T. G and B.M. Babior (1981) : The killing of pathogen by phagocytes. *Ann. Rev. Med*, 32 : 313 - 326.
- Gould, R.W., O'Leary, P.J., Garrison, R.L., Rohovec, J.S. and Fryer, J.L. (1978) : Spray vaccination: a method for immunization of fish. *Fish. Pathol.*, 13, 63 - 68.
- Hasting, T.S. (1988) : Furunculosis vaksin. Dalam "Fish Vaccination" ed. by A.E. Ellis. Academic Press. Tokyo, Japan, pp 93 - 110.
- Higson, F.K. and O.T.G. Jones (1984) : The generation of active oxygen species by stimulated rainbow trout leucocyte in whole blood. *Comp. Biochem. Physiol.* 77 B: 583 - 587.
- Huet, M. (1986) : *Texbook of Fish Culture ; Breeding and Cultivation of Fish.* Fishing News Book. Surrey-England, pp 192 - 199.
- Johnson, R. B. (1978) : Oxygen metabolism and the microbial activity of macrophage. *Fed. Proc.* 37, : 2759 - 2764.
- Johnson, K.A., Flynn, J.K and Ammend, D.F. (1982) : Duration of immunity in salmonids vaccinated by direct immersion with *Yersinia ruckeri* and *Vibrio anguillarum* bacterins. *J.Fish.Dis.*, 5, 207 - 213.
- Kawai, K., Kusuda, R. and Itami, T. (1981) : Mechanisms for protection in ayu orally vaccinated for vibriosis. *Fish. Pathol*, 15, 257 - 262.

- Kusuda, R and K. Kawai (1992) : Bacterial infections of fish in Japan. In : Salmonid diseases, editor T. Kimura. Hokkaido University Press, Sapporo, Japan.
- Kono, M., T. Matsui dan C. Shimizu (1987) : Effect of chitin, chitosan and cellulose as diet supplement on the growth of cultured fish. Nip. Sui. Gak, 53 : 125-129.
- Lameli, U.K. (1970) : Cleavage of structural protein during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature, 227 : 680 - 684.
- Landolt, M.L. (1989) : The relationship between diet and the immune response of fish. Aquaculture, 79 : 193 - 206.
- Leong, J.C dan J.L.Fryer (1993) : Viral vaccine for aquaculture. Annual. Rev. of Fish Dis, pp 225 - 240.
- Li, Y. and R.T. Lovell (1985) : Elevated level of dietary ascorbic acid increased immune responses in channel catfish. J. Nutrition, 115 : 123 - 131.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L.Farr and R.J.Randall (1951) : Protein measurement with the folin phenol reagent. J.Biol. Chem 193 : 265- 275.
- Lowrie, D.B., P.S.Jackett and P.W.Andrew (1985) : Activation of macrophage for antimicrobial activity. Immunol Let, 11 : 195 - 203.
- Main, K.L. and C. Rosenfeld (1994) : Cultured of high value marine fishes in Asia and the United States. The Oceanic Institute, Hawaii, pp 3 - 44.
- Manning, M.J. and Mughal, M.S. (1985) : Factors affecting the immune response of immature fish. In : Fish and Shellfish Pathology. Ed. A.E.Ellis, London, Academic Press, pp 27-40.
- Maule, A.G and C.B. Schrek (1990) : Glucocorticoid receptor in leukocytes and gill of juvenile coho salmon *Onchorhynchus kisutch*. Gen and Comp Endocrin, 77 : 448 - 455.
- Nakai, T., T. Kanno, E.R.Cruz and K. Muroga (1987) : The effects of iron compounds on the virulence of *Vibrio anguillarum* in Japanese eel and ayu. Fish Pathol, 22 : 185 - 189.
- Olivier, G., T.P.T. Evelyn and R. Lallier (1985) : Immunity to *Aeromonas salmonicida* in coho salmon *Onchorhynchus kisutch* induced by modified

- Freund's complete adjuvant: its non-specific nature and probable role of macrophage in the phenomenon. *Develop and Comp Immunol*, 9 : 419 - 432.
- Olivier, G., C.A. Eaton and N. Campell (1986) : Interaction between *Aeromonas salmonicida* dan peritoneal macrophages of brook trout *Salvelinus fontinalis*. *Vet. Immun and Immunopath*, 9 : 223 - 234.
- Peck, R. (1985) : A one-plate assay for macrophage bacterial activity. *J. Immunol Meth*, 83 : 131 - 140.
- Pickering, A.D. and T.G.Pottinger (1989) : Stress response and disease resistance in salmonid fish : effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Phys dan Biochem*, 7 : 253 - 258.
- Pickering, A.D (1990) : Stress and the suppression of somatic growth in teleost. In *Progress in Comparative Immunology*. Ed. by Epple, A., C.G. Scannes and M.H. Stetson, pp 473 - 479.
- Polk, A, B. Amsden, D. Scarrat, A. Gonzal, o Okhamafe, M. Goosen (1994) : Oral delivery in aquaculture : control release of protein from chitosan-alginate microcapsule. *Aquacult Eng*. 13 : 311-323.
- Pottinger, T.G., and A.D. Pickering (1990) : The effects of cortisol administration on hepatic and plasma estradiol binding capacity in immature female rainbow trout *Onchorhynchus mykiss*. *Gen and Comp Endocrin*, 80 : 264 - 273.
- Post, G. (1966) : Response of rainbow trout *Salmo gairdneri* to antigen of *Aeromonas hydrophila*. *J. Fish Res Board can* 23 : 1487-1494.
- Quentel C and M. Vegneulle (1997) : Antigen uptake and immune responses after oral vaccination. In : Gudding, R, Lillehaug, A, Midtlying, P.J., Brown, F (eds) *Fish Vaccinology*. Dev Biol Stand Basel, Karger 90, p 69-78.
- Richard, R.H. and R.J. Robert (1989) : The bacteriology of teleost. In *Fish Pathology* Ed by R.J. Robert. Baillere Indall. London. pp 183 - 204.
- Robert, R.J. and M.T. Horne (1978) : Bacterial meningitis in farmed rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson, affected with chronic pancreatic necrosis. *J. Fish Dis*. 1 : 157 - 164.
- Schachte, J.H. (1978) : Immunization of channel catfish *Ictalurus punctatus* against two bacterial disease. *Mar Fish Rev* 40 : 18-24.

- Salati, F., K. Watanabe, K.Kawai and R.Kusuda (1989) : Immune response of ayu against *Vibrio anguillarum* Lipopolysaccharide. Nip Sui Gak, 19 : 45 - 49.
- Siwicki, A.K., D.P. Anderson and G.L. Rumsey (1994) : Dietray intake of immunostimulant by rainbow trout affect non specific immunity and protection against furunculosis. Vet. Immunol. Immunopathol. 41 : 125-139.
- Smith, P.D. (1982) : Analysis of the hyperosmotic and bath methods for fish vaccination -comparison of uptake of particulate and non particulate antigens. Dev. Comp. Immunol. Suppl., 2 : 181 - 186.
- Suprpto, H., T. Hara, T. Nakai and K. Muroga (1996a) : Purification of a lethal toxin of *Edwardsiella tarda*. Fish Pathol, 31 : 203 - 207.
- Suprpto, H. (1997b) : Studies on the toxin of *Edwardsiella tarda*. Doctoral Thesis. Hiroshima University, Japan. pp 83.
- Suprpto, H. (1999c): Histopathology study of natural infection nila *Chromileptes altivelis* caused by *Vibrio sp.* sp.J.Pene Univ Sriwijaya Palembang (In Press).
- Suprpto, H. (1999d) : Isolation of causative agent diseased of nila *Chromileptes altivelis* in Ranu Pakis Lumajang East Java Province-Indonesia. J. Perik Unibraw. (In press).
- Stave, J.W., B.S. Roberson and F.M.Hetrick (1984) : Factors affecting the chemilumi-nescenct response of fish phagocytes. J. Fish Biol., 25 : 197 - 200.
- Sumpster, J.P., H.M. Dye and T.J. Bemfey (1986) : The effects of stress on plasma ACTH,  $\alpha$ -MSH and cortisol level in salmonid fishes. Gen and Comp Endocrinol, 62 : 377 - 385.
- Thorburn, M.A. and E.Jansson (1988) : The effects of booster vaccination and fish size on survival and antibody production following *Vibrio* infection of bath-vaccinated rainbow trout *Salmo gairdneri*. Aquaculture 71: 285 - 291.
- Towbin, H., T.Staehelin and J. Gourdon (1979) : Electrophoresis transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad.Sci. USA, 76 : 4350 - 4354.

## Lampiran 1

### RENCANA PENELITIAN TAHUN KETIGA

#### EVALUASI LAMA PROTEKSI KERAPU *Chromileptes altivelis* SETELAH VAKSINASI DENGAN VAKSIN RIBOSOMAL *Vibrio alginolyticus* DAN DIPELIHARA SAMPAI UKURAN FINGERLING

##### Tujuan Penelitian

1. Membuat vaksin vibriosis ribosomal monovalent dan polyvalent untuk menanggulangi penyakit ikan kerapu dan untuk menekan kerugian yang sangat besar.
2. Uji lapangan vaksinasi pada fish pen pada ikan kerapu.
3. Membuat vaksin vibriosis yang bisa memberikan proteksi tinggi dan lama atau paling tidak sampai usia komersial.
4. Mencegah kerugian yang besar dan menjaga kontinuitas ekspor ikan kerapu ke mancanegara dan didalam negeri.
5. Budidaya yang berhasil akan memberikan lapangan kerja yang banyak bagi masyarakat luas

##### Manfaat Penelitian

1. Vaksin monovalent dan polyvalent yang baik (memberikan proteksi tinggi) diharapkan bisa menanggulangi penyakit kerapu di panti pembenihan atau kolam pembesaran yang disebabkan oleh *Vibrio*.
2. Menyebarkan metode penanggulangan penyakit kerapu yang disebabkan oleh *Vibrio* sp. terhadap pelaku industri perikanan
3. Mencegah kerugian yang besar dari industri kerapu dan menjaga kontinuitas ekspor ikan kerapu ke manca-negara dan didalam negeri.
4. Menciptakan lapangan kerja bagi masyarakat luas, tidak hanya petani ikan tetapi banyak industri yang terkait dengan industri perikanan.

## Percobaan Tahun Ketiga

### Immunisasi kerapu di lapangan

Vaksin monovalent dan polyvalent dilapisi chitosan



Immunisasi kerapu



Dipelihara di lapangan/ kolam



SR dan pertumbuhan

### Phagocytosis

Bakteri dan macrophage (Vaksin dan kontrol) dicampur kemudian diinkubasikan pada 25°C selama 30 menit dengan shaking 25 rpm agar terjadi kontak antara macrophage dan bakteri, macrophage diambil untuk dibuat usapan pada slide glass yang telah dilapisi albumin dan diwarnai dengan May-Grunwald Giemsa dan phagocytosis dihitung dengan metode sbb :

Jumlah bakteri yang dimakan oleh macrophage

Phagocytic index :-----

Jumlah macrophage yang memakan bakteri

Jumlah macrophage yang makan bakteri

Phagocytic rate :-----

Jumlah macrophage yang diamati

### Uji Aktifitas Bakteri

Daya bunuh macrophage terhadap bakteri dilakukan berdasarkan metode Secombes (1993). Bakteri dikultur pada TSB selama 24 - 48 jam pada suhu 25°C, dicuci 3 kali dengan PBS (pH 7.0) dan jumlahnya disetel  $1.3 \times 10^4$  cells/ml pada TSB. Macrophage dicuci dengan L-15 tiga kali yang telah ditambah dengan 2 % FBS dan sodium heparin 10 unit/ml, kepadatan disetel pada  $10^6$  cells/ml kemudian

didistribusikan di microtiter plate (100  $\mu$ l/well). H<sub>2</sub>S sebagai stressor dan PBS sebagai kontrol ditambahkan pada macrophage dalam well. Kemudian bakteri dimasukkan pada triplicate wells. Plate kemudian digoyang (shaking) selama 5 menit, kemudian diinkubasikan pada suhu 25°C selama 1, 3, 6 jam. Pada akhir inkubasi, supernatant dibuang dan Tween-20 (0.2%) dimasukkan kedalam well untuk mematikan macrophage. Seratus microliter dari Trypto Soya Broth (TSB) ditambahkan pada well dan diinkubasikan pada suhu 25°C selama 16 jam untuk menumbuhkan bakteria. Yang terakhir 5% larutan MTT [3-(4,5-dimethylthiazoyl-2-yl)-2-5 diphenyltetrazolium bromide] sebanyak 10  $\mu$ l ditambahkan pada well kemudian absorbance dibaca dengan spectrophotometer pada panjang gelombang 620 nm sesudah 15 menit.

Kerapui absorbance pada well dengan bakteri  
(1, 3 dan 6 jam)

Bakteri survived dihitung : -----

Kerapui absorbance pada 1 jam

### Uji plate count

Persiapan uji ini sama dengan uji MTT kecuali sesudah macrophage dibunuh dengan penambahan Tween-20, 5 menit kemudian 50  $\mu$ l dari Physiological Saline (PS) ditambahkan pada well. Dasar dari well discrap dengan hati-hati untuk mengambil semua benda yang menempel. Bakteri yang didapatkan kemudian diencerkan sepersepuluh (10 fold) kemudian ditanam pada media TSA. Jumlah koloni (Colony Forming Unit/CFU) dihitung sesudah 24 jam inkubasi pada suhu 25°C. Hasilnya kemudian dihitung dengan formula sebagai berikut :

CFU terdeteksi dari macrophage pada X time

-----  
CFU dari lysed macrophage pada 0 time

### Pengukuran titer antibody

Rabbit antiserum dan antiserum standard (kerapu antiserum) yang telah dibuat diatas dipergunakan untuk uji agglutinas. Antigen adalah bakteri *V. alginolyticus*

dan *V.a.nguillarum* yang telah dimatikan dengan formalin (FKC) dan dicuci dengan PBS. Pengukuran tersebut dilakukan sebagai berikut. Dua puluh lima microliter dari 0.01 M PBS dimasukkan kedalam setiap well. Diluter dipanaskan sampai merah menyala untuk mencegah kontaminasi. Antiserum dimasukkan dan diencerkan mulai dari well pertama sampai well terakhir. Konsentrasi antigen diukur pada spektrophotometer dengan panjang gelombang 530 nm dan abosrbance 0.5. Satu tetes antigen dimasukkan kedalam setiap well, kemudian well dikocok selama 5 menit dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 2 jam. Kontrol dilakukan sama dengan diatas, antiserum yang digunakan diganti dengan PBS. Kerapui agglutinasia adalah sebagai beriku :

[4 (well kesatu), 8 (well kedua).....4496 (well kesebelas)]

### **ELISA untuk analisa produksi antibody**

Prosedur ELISA yang dipakai adalah menurut Leiro *et al.* (1993) dengan sedikit modifikasi. Seratus mililiter larutan bakteri ( $1 \times 10^4$  cells/ml PBS) dimasukkan kedalam microtiter plate yang telah dilapisi terlebih dahulu larutan 0.001 % Poly-L-Lysin sebanyak 100  $\mu$ l selama 2 jam pada suhu kamar. Sesudah inkubasi 2 jam pada suhu kamar, plate dicuci dengan PBS yang mengandung 0.05 % Tween-20 (T-PBS) sebanyak 5 kali, diblok dengan 25 % Block Ace dalam PBS dan kemudian 100  $\mu$ l serum kerapu diencerkan dengan PBS ditambahkan pada plate. Sesudah inkubasi 4°C semalam plate dicuci 5 kali dengan T-PBS, kemudian 100  $\mu$ l anti kerapu IgM rabbit IgG dilarutkan pada 1: 200 pada T-PBS ditambahkan pada setiap well dan plate diinkubasikan selama 2 jam pada suhu kamar. Kemudian 100  $\mu$ l horseradish peroxidase-labelled anti-rabbit IgG goat IgG diencerkan 1: 20.000 pada T-PBS ditambahkan pada setiap well. Sesudah inkubasi selama 2 jam pada suhu kamar dan dicuci, 100  $\mu$ l TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine free base tablets) ditambahkan pada setiap well. Reaksi distop dengan penambahan 50  $\mu$ l dari 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dan sesudah 20 menit dan optical density (OD) pada 450 nm diukur dengan Microplate reader.

Konsentrasi antibody diukur dari aktifitas antibody  $\mu$ l<sup>-1</sup> serum dan 4.36  $\mu$ l<sup>-1</sup> adalah sama seperti pada aktifitas standard serum. Pengetesan antiserum standar

dilakukan pada plate untuk mengetahui titer individu sampel dengan membandingkan 50% endpoint. Unit antibody OD dari triplicate well dihitung dengan formula sebagai berikut :

$$\text{Aktifitas sampel} = \text{Aktifitas standard} \times \frac{50 \% \text{ standard volume}}{50 \% \text{ volume sample}}$$

### **Electrophoresis (Laemli, 1970) dan Western blotting (Towbin *et al*, 1979)**

Antibody yang didapatkan dari kerapu yang telah divaksin dengan *V. alginolyticus* dan *V.a.nguillarum* FKC dan yang tidak divaksin (kontrol) dicampur dengan buffer 0.17 M Tris-HCl (pH 6.8) yang mengandung SDS (5.3%) dan 2-mercaptoethanol (13.2%). Elektrophoresis dilakukan pada 10 % gel dengan buffer Tris (0.025M) glycine (0.192M) yang mengandung 0.1M SDS dilakukan pada voltase 150 selama 1 jam. Protein band yang terjadi divisualisasi dengan Coomassie brilliant blue. Sesudah SDS-PAGE, protein di gel ditransfer secara elektrophoresis dengan nitrocellulose membrane filter. Membrane kemudian diblok dengan TBS buffer (20mM Tris Hcl, pH 7.5, 0.5M NaCl) pada 2 % skim milk. Sesudah dicuci membrane direaksikan dengan rabbit anti *V. alginolyticus* dan *V.a.nguillarum* serum diencerkan 1 : 500 dengan TBS buffer selama 1 jam, dicuci dengan buffer, dan direaksikan dengan alkaline phophatase conjugated anti-rabbit Ig swine Ig. Yang terakhir protein band divisualisasikan dengan 5-bromo-4-chloro-3-indoryl phosphate (x phosphate) dan 4-nitroblue tetrazolium chloride (NBT).

## Lampiran 2.

### RINCIAN ANGGARAN PENELITIAN TAHUN KETIGA

Jenis Pengeluaran	Rincian Anggaran Yang Diusulkan		
	Tahun I	Tahun II	Tahun III
Pelaksana (Gaji dan Upah)	Rp 14.800.000.	Rp14.800.000	<b>Rp14.800.000</b>
Peralatan	Rp 1.380.000.	Rp 1.380.000.	<b>Rp 1.380.000.</b>
Bahan Aus (Material Penelitian)	Rp 16.068.000	Rp16.068.000	<b>Rp16.068.000</b>
Perjalanan	Rp 1.100.000.	Rp 1.100.000.	<b>Rp 1.100.000.</b>
Pemeliharaan	Rp 750.000	Rp 750.000	<b>Rp 750.000</b>
Pertemuan/Lokakarya /Seminar	Rp 250.000	Rp 250.000	<b>Rp 250.000</b>
Laporan/Publikasi	Rp 2.000.000.	Rp 2.000.000.	<b>Rp 2.000.000.</b>
Lain-lain	Rp 1.800.000.	Rp 1.800.000.	<b>Rp 1.800.000.</b>
Total Anggaran	50.000.000.	50.000.000.	<b>50.000.000.</b>
Total Keseluruhan Anggaran	Rp 150.000.000. (Seratus lima puluh juta rupiah)		

#### 1. JUSTIFIKASI ANGGARAN

##### 1.1 Upah/Honor (lama max 10 bulan)(dalam Rp 1000)

Tim Peneliti	Jumlah Orang	Minggu/ Bulan	Bulan/ Kerja	Jam/ Minggu	Tarif/ Jam/Minggu	Total
a.Ketua	1	4	10	20	8.000	6.400
b.Peneliti	2	4	10	10	5.000	6.000.
b.Pembantu Peneliti	1	4	10	20	3.000	2.400.
Sub Total						14.800

## 1.2. Komponen peralatan

Nama bahan	Satuan	Harga Satuan	Jumlah Harga
Aquarium	1 buah/bh	90	540
Aerator dan selang	1 set	45	270
Bak plastik	1 bh	75	450
Jerry can	1 bh	20	120
Sub total			1.380

## 1.3. Bahan habis Pakai (dalam Rp 1000)

### a. ATK

Nama bahan	Satuan	Harga Satuan	Jumlah Harga
Kertas HVS A4	1 rim	40.000	400
Tinta komputer	2 buah	250	500
Disket komputer	1 boks	35	70
Sub total			970

### b. Bahan Kimia (dalam Rp 1.000)

Nama bahan	Satuan	Harga Satuan	Jumlah Harga
Kerapu	1 kg	80	800
Paper filter 0.45 $\mu\text{m}$	1 boks	350	350
TCBS	500 g	950	950
Marine Agar	500 g	800	800
Film negatif dan positif	1 rol	60	300
Sodium dihydrogen phosphate	500 g	300	300
Disodium dihydrogen phosphate	500 g	520	520
Natrium chlorida	500 g	190	380
Chloroform	1 l	580	580
Indole	100 g	395	395
Marine broth	250 g	845	845

Membrane filter 0.45 $\mu\text{m}$	1 boks	2200	2200
Nitrate	100g	300	300
Arginine	100g	144	144
Amylase	25 mg	295	295
Gelatine	1000g	600	600
Ornithin	100 g	380	380
Lipase	90 mll	380	380
Alginase	100 g	415	415
Chitinase	100g	759	759
Deoxyribonuclease	25 mg	450	450
Citrate (Simmons)	1000g	516	516
D-Mannose	25 g	375	375
D-Galactose	10 g	480	480
D-Fructose	50 g	300	300
Sucrose	500g	240	240
Maltose	100 g	290	290
Cellobiose	10 g	350	350
N-Acetylglucosamine	25 g	390	390
Succinate	100 g	195	195
Fumarate	100 g	195	195
Erythritol	25 g	390	390
D-Mannitol	100 g	210	210
Glycerol	1 l	510	510
ONPG	100 g	450	450
DL-Malate	5 unit	590	590
D-Arabinose	25g	260	260
VP	100 g	400	400
$\alpha$ -Ketoglutare	25 g	250	250
D-Glucose	500g	150.	150
Tween 20	500 g	252	252

D-Trehalose	5 g	225	225
Tris HCl	500 g	380	380
Lysine	25 g	250	250
Ethanol	4 l	450	450
Starch	250 g	196	196
Lipase	25 g	325	325
Glacial acetic acid	500 ml	155	155
Hydrogen Sulfate	50g	520	520
Catalase	10 mg	460	460
Sub total			16.950

#### 1.4. Perjalanan dinas

Tujuan	Satuan	Harga Satuan	Jumlah Harga
Surabaya-Jakarta	1 pergi pulang	700	700
Transportasi lokal		400	400
Sub total			1.100

#### 1.5. Lain-lain (penyusunan/perbanyak laporan, analisi lab., analisis data, seminar, pertemuan /rapat, bahan pustaka, fotocopy)

Nama bahan	Satuan	Harga Satuan	Jumlah Harga
Cuci cetak film	1 rol	40	300
Seminar	1 kali	250	250
Pustaka pendukung			1.500
Pemeliharaan alat		750	750
Publikasi internasional	1 kali	2.000	2.000
Sub total			4.800

<b>TOTAL BIAYA PENELITIAN</b>	<b>Rp 50.000.000.</b> <b>(Lima puluh lima juta rupiah)</b>
-------------------------------	---

### Lampiran 3.

#### DUKUNGAN TERHADAP PELAKSANAAN PENELITIAN

Tidak ada dukungan penelitian dari pihak lain

### Lampiran 4.

#### SARANA DAN PRASARANA PENELITIAN

##### 4.1 Laboratorium

Daftar Peralatan Utama di Tropical Diseases Center Unair

No	Sasaran dan tahapan kegiatan	Nama dan jenis peralatan utama	Unit	Harga
1	Pemecah bakteri	Sonicator	1	-
2	Menyimpan material penelitian (sampel)	deep freezer	1	-
3	Analisis pertahanan diri	ELISA reader	1	-
4	Penelitian laboratorium, ujiantang	Bak, aquarium dll	-	-
5	Pembuatan media dan kultur bakteri	Autoclave	2	-
7	Pembuatan vaksin	Clean bench, centrifuge	2	-
8	Memisahkan partikel vaksin dan supernatan	Centrifuge	3	-
9	Ekstraksi LPS	Ultracentrifuge	1	-
10	Inkubasi bakteri	Inkubator	3	-
11	Mengetahui berat molekul imunitas antigen	SDS-PAGE	2	-
12	Menyimpan media dan bahan aus lainnya	Refrigerator	3	-
13	Membaca kepadatan	Spektrophoto-	2	-

	Bakteri, konsentrasi protein	meter		
--	------------------------------	-------	--	--

#### 4.2 Peralatan Utama

No	Nama Alat	Jumlah
1	Aquarium	15 bh
2	Pompa air	3 bh
3	Bak air	6 bh
4	Tandon air	3 bh
5	Filter air	10 set

#### 4.3 Keterangan Tambahan

Tidak ada

**JADUAL KEGIATAN**

No	KEGIATAN/PENANGGUNG JAWAB	BULAN									
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	Pembelian bahan penelitian Peneliti Utama	√									
2	Pembuatan vaksin Peneliti Utama		√								
3	Pembuatan vaksin Peneliti Utama		√								
4	Percobaan vaksinasi di lab Peneliti			√							
5	Percobaan vaksinasi di lab Peneliti				√	√	√	√	√	√	√
6	Analisis respon imun humoral Peneliti					√					
7	Analisis respon imun humoral Peneliti						√				
8	Analisis respon imun seluler Peneliti							√			
9	Analisis respon imun seluler Peneliti									√	
10	Menulis untuk Asian Fisheries Peneliti Utama										√

