



630  
Mi



LAPORAN PENELITIAN DOSEN MUDA  
TAHUN ANGGARAN 2001

**ISOLASI MACROPHAGE DARI IKAN KAKAP PUTIH *Lates carcarifer*  
DAN DAN ANALISIS DAYA BUNUHNYA TERHADAP INFEKSI  
BAKTERI *Vibrio harveyi***

**Peneliti :**

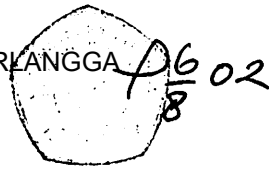
**Ir. ENDANG DEWI MASITHAH, M.P.  
Dr. Ir. HARI SUPRAPTO, M.Agr.**

**LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Dibiayai oleh : Bagian Proyek Peningkatan Kualitas Sumberdaya Manusia  
DIP Nomor : 059/XXIII/1--/2001 Tanggal 1 Januari 2001  
Kontrak Nomor : 021/LIT/BPPK-SDM/III/2001  
Ditjen Dikti, Depdiknas  
Nomor Urut : 01

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Nopember, 2001



**LAPORAN PENELITIAN DOSEN MUDA  
TAHUN ANGGARAN 2001**

**ISOLASI MACROPHAGE DARI IKAN KAKAP PUTIH *Lates carcarifer*  
DAN DAN ANALISIS DAYA BUNUHNYA TERHADAP INFEKSI  
BAKTERI *Vibrio harveyi***

**Peneliti :**

**Ir. ENDANG DEWI MASITHAH, M.P.  
Dr. Ir. HARI SUPRAPTO, M.Agr.**

**LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Dibiayai oleh : Bagian Proyek Peningkatan Kualitas Sumberdaya Manusia  
DIP Nomor : 059/XXIII/1/--/2001 Tanggal 1 Januari 2001  
Kontrak Nomor : 021/LIT/BPPK-SDM/III/2001  
Ditjen Dikti, Depdiknas  
Nomor Urut : 01

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

**Nopember, 2001**



# LEMBAGA PENELITIAN

1. Puslit Pembangunan Regional
2. Puslit Obat Tradisional
3. Puslit Pengembangan Hukum
4. Puslit Lingkungan Hidup (5995718)
5. Puslit Pengembangan Gizi (5995720)
6. Puslit/Studi Wanita (5995722)
7. Puslit Olahraga
8. Puslit Bioenergi
9. Puslit Kependudukan dan Pembangunan (5995719)
10. Puslit/Kesehatan Reproduksi

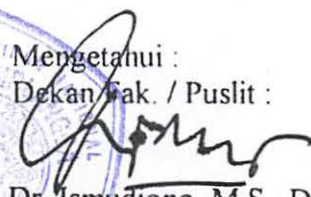
Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115 Teip. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5995346  
E-mail: lpuunair@rad.net.id - http://www.geocities.com/Athens/Olympus/6223

## IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN DOSEN MUDA

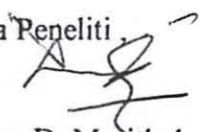
- |   |  |
|---|--|
| 1. a. Judul Penelitian  | : Isolasi Macrophage Dari Ikan Kakap Putih<br><i>Lates carcarifer</i> dan Analisis Daya Bunuhnya<br>Terhadap Infeksi Bakteri <i>Vibrio harveyi</i> |
| b. Macam Penelitian   | : I / II / III *   |
| 2. Kepala Proyek Penelitian   | :  |
| a. Nama Lengkap dan Gelar   | : Endang Dewi Masithah, M.P., Ir.  |
| b. Jenis Kelamin  | : Wanita   |
| c. Pangkat/Golongan dan NIP   | : Penata Muda / IIIa / 132158476   |
| d. Jabatan Fungsional   | : Asisten Ahli Madya   |
| e. Fakultas / Puslit / Jurusan  | : Kedokteran Hewan / Teknologi Kesehatan Ikan  |
| f. Univ./Inst./Akademi/ST.  | : Universitas Airlangga  |
| g. Bidang Ilmu Yang Diteliti  | : Perikanan  |
| 3. Jumlah Tim Peneliti  | : 2 (dua) orang  |
| 4. Lokasi Penelitian  | : FKH dan TDC Universitas Airlangga  |
| 5. Bila Penelitian ini merupakan peningkatan kerjasama kelembagaan sebutkan : |  |
| a. Nama Instansi  | : -  |
| b. Alamat   | : -  |
| 6. jangka Waktu Penelitian  | : 6 bulan  |
| 7. Biaya Yang Diperlukan  | : Rp. 5.000.000,-<br>(Lima Juta Rupiah)  |

Surabaya, 28 September 2001

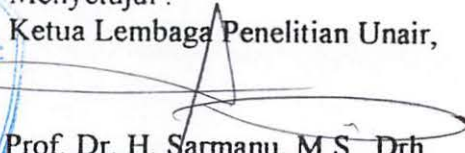
Mengetahui :  
Dekan Fak. / Puslit :

  
Dr. Ismudiono, M.S., Drh.  
NIP. 130687297

Ketua Peneliti

  
Endang D. Masithah, M.P., Ir.  
NIP. 132158476

Menyetujui :  
Ketua Lembaga Penelitian Unair,

  
Prof. Dr. H. Sarmanu, M.S., Drh.  
NIP. 130701125

RINGKASAN

Judul Penelitian : ISOLASI MACROPHAAGE DARI IKAN KAKAP PUTIH  
(*Lates carcarifer*) DAN ANALISIS DAYA BUNUHNYA  
TERHADAP INFEKSI BAKTERI *Vibrio harveyi*

Ketua Peneliti : Endang D. Masithah

Anggota Peneliti : Hari Suprpto

Tahun : 2001

Jumlah halaman : 22

---

Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi macrophage ikan kakap putih (*Lates carcarifer*) dan mengetahui analisis daya bunuhnya terhadap bakteri yang sering menginfeksi di tambak. Daya bunuh macrophage sangat penting sebagai pertahanan diri terhadap infeksi dari luar tubuh. Bakteri *Vibrio harveyi* adalah spesies bakteri yang sering ditemukan di tambak dan bersifat *lethal* terhadap ikan dan udang.

Kultur macrophage bisa dilakukan dengan MEM pada suhu kamar selama tiga hari. Lebih dari tiga hari, banyak kendala yang ditemui sehingga sering terjadi kontaminasi dan kematian macrophage.

Phagocytic Index dari macrophage terhadap bakteri *Vibrio harveyi* berkisar antara 4,2 – 7,8 dan angka Phagocytic Rate sebesar 0,6 – 0,8. Tinggi rendahnya Phagocytic Index dan Phagocytic Rate tersebut sangat dipengaruhi oleh faktor eksternal dan internal termasuk polusi, kualitas air serta stress ikan.

Kelulushidupan atau Survival Rate berkisar 10 – 40 persen dan kontrol 64 – 93 persen pada inkubasi selama 30 menit, sedangkan pada inkubasi 60 menit adalah 10 – 30 persen dan kontrol 61 – 86 persen.

(Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. No. Kontrak 021 / LIT / BPPK-SDM / III / 2001, Tanggal 15 – 3 2001-10-16).

## SUMMARY

ISOLATION OF MACROPHAGE OF KAKAP PUTIH (*Lates carcarifer*) AND ANALYSIS OF THEIR KILLING AGAINST *Vibrio harveyi* (Endang D. Masitbah and Hari Suprpto, 2001, 22 page)

The research was deal with the isolation of macrophage of kakap putih and to understand of their killing effort agains bacterial which was oftenly infected fish in brackishwater pond. The macrophage is important for the defense mechanism against bacterial infection. *Vibrio harveyi* is commonly found in pond and lethal to fish and shrimp.

Culture of macrophage with L-15 was done in room temperature for 3 days, more than 3 days the macrophage gradually dead and contamination.

Phagocytosis Index of macrophage agains *Vibrio harveyi* are between 4,2 – 7,8 with Phagocytic Rate between 0,6 – 0,8. The fluctuation of Phagocytosis Index and Phagocytic Rate were influenced by external and internal factors such as polution, water quality and stress.

The Survival Rate of bacteria between 10 – 40 percent and control 64 – 93 percent for 30 minutes incubation, while 60 minutes incubation between 10 – 30 percent and control 64 – 93 percent.

(Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University. Number 021 / LIT / BPPK-SDM / III / 2001)

## KATA PENGANTAR

Penelitian tentang perikanan di Indonesia masih tertinggal jauh dibandingkan dengan bidang pertanian lainnya, terutama tentang masalah yang dihadapi dalam budidaya ikan. Kegagalan panen banyak diakibatkan oleh masalah penyakit dan pelanggaran kaidah budidaya yang benar. Penyakit merupakan masalah yang besar di dalam budidaya ikan dan hasil laut lainnya, terutama yang disebabkan oleh virus, bakteri serta polusi air.

Keberhasilan pembenihan kakap putih merupakan rangkaian keberhasilan budidaya pembesarannya. Kendala berjangkitnya penyakit bakterial merupakan penyebab tertinggi kematian benih kakap putih. Penelitian tentang Isolasi Macrophage Dari Ikan Kakap Putih (*Lates carcarifer*) Dan Analisis Daya Bunuhnya Terhadap Infeksi Bakteri *Vibrio harveyi* diharapkan dapat dilanjutkan untuk mengatasi permasalahan gagalnya pembenihan kakap putih yang bernilai ekonomis penting.

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga
2. Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga
3. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
4. Kepala Departemen Diarrhea tropical Disease Center

yang telah memberikan fasilitas, kemudahan serta pendanaan pada penelitian ini. Semoga Tuhan Yang Maha Esa membalas budi baik dan amalnya. Mudah-mudahan penelitian yang sederhana ini berguna bagi yang memerlukan.

## DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN.....	i
RINGKASAN DAN SUMMARY.....	ii
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR TABEL.....	vi
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Vibriosis.....	4
2.2 Hubungan Stress Dengan Penyakit.....	4
2.3 Aktifitas Fagositosis Dari Macrophage.....	6
2.4 Produksi Antibodi Ikan.....	7
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	9
3.1 Tujuan Penelitian.....	9
3.2 Manfaat Penelitian.....	9
BAB IV. METODE PENELITIAN.....	10
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	10
4.2 Bahan dan Alat Penelitian.....	10
4.3 Metode Penelitian.....	11
4.4 Variabel yang Diamati.....	14
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	15
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	19
DAFTAR PUSTAKA.....	20



DAFTAR TABEL

Tabel No.	Halaman
1. Pagositosis Macrophage Kakap Putih Terhadap <i>Vibrio harveyi</i> .....	16
2. Kelulushidupan <i>Vibrio harveyi</i> dari Pagositosis Macrophage Kakap Putih Pada Inkubasi Yang Berbeda.....	17

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang Masalah

Pada awal tahun 1980-an perolehan devisa dari ekspor hasil perikanan cukup besar sumbangannya terhadap perekonomian negara. Tingginya produksi perikanan diharapkan bisa menyediakan pangan yang cukup untuk kepentingan pangan masyarakat serta menyediakan lapangan kerja. Tetapi pada awal tahun 1991 terjadi kemerosotan produksi perikanan dengan berjangkitnya berbagai macam penyakit yang disebabkan oleh bakteri dan virus, bahkan ada kematian akibat penyakit yang belum diketahui dengan pasti penyebabnya. Kerugian akibat penyakit yang menyerang udang setiap tahun mencapai 62 juta USD per tahun, belum lagi ditambah kerugian akibat penyakit yang menyerang beberapa species ikan ekonomis penting lain. Kerugian tersebut terus meningkat dari tahun ke tahun dan pada tahun 2001 diperkirakan mencapai lebih dari 500 juta USD per tahun. Padahal target perolehan devisa dari industri perikanan sebesar 6,7 milyar USD dalam beberapa tahun terakhir.

Kendala utama dalam upaya mengembalikan produksi perikanan yang telah merosot adalah adanya pencemaran perairan serta kurangnya pemahaman petani tambak untuk menjaga lingkungan agar tetap lestari sehingga hal ini memicu berjangkitnya berbagai macam penyakit. Pemaksaan lingkungan atau tambak dengan padat penebaran tinggi, pemakaian bahan kimia termasuk pupuk atau obat-obatan

yang tidak terkontrol, pada akhirnya akan menyebabkan kerusakan lingkungan yang parah.

Berbagai upaya dilakukan untuk mengatasi permasalahan yang terjadi. Di beberapa negara, saat ini sedang dicari jenis bakteri yang memiliki kemampuan berkompetisi dengan bakteri patogen untuk menekan pertumbuhan bakteri patogen tersebut. Diharapkan hal ini dapat memberikan keuntungan dari dua arah, yaitu mengurangi jumlah bakteri patogen dan mengurangi penggunaan obat-obatan yang merusak lingkungan (Gatesoupe, 1999; Leano *et al.*, 1998; Rengpipat *et al.*, 1998; Maeda *et al.*, 1997). Selain itu dilakukan upaya untuk mengenalkan berbagai spesies ikan ekonomis penting untuk mengimbangi budidaya udang yang sangat banyak kendalanya. Jenis ikan untuk keperluan ekspor tersebut antara lain nila (*Oreochromis niloticus*), kakap merah (*Lutjanus sp.*), Kerapu (*Epinephelus sp.*), kakap putih (*Lates carcarifer*), beronang (*Siganus sp.*) dan napoleon (*Chelius undulus*) (Anonimus, 1997). Walaupun begitu, bukan berarti upaya ini tidak menemui kendala. Dalam upaya pembenihannya, berbagai jenis ikan ekonomis penting tersebut sering mengalami kematian pada ukuran benih akibat serangan bakterial. Namun resiko yang disebabkan oleh bakteri pada umumnya mudah ditanggulangi jika keberadaan bakteri tersebut bisa diketahui lebih dini.

Bakteri *Vibrio splendidus* dan *Vibrio harveyi* adalah jenis bakteri penyebab utama kematian ikan kakap putih (*Lates carcarifer*) di panti-panti pembenihan maupun kolam pembesaran. Permasalahan yang diduga sebagai penyebab kematian tersebut adalah menurunnya kinerja macrophage terhadap bakteri. Menurunnya

kemampuan macrophage terhadap bakteri bisa disebabkan oleh beberapa faktor misalnya stress, kualitas air yang memburuk dan banyaknya bakteri yang hidup di perairan.

## 1.2 Rumusan Masalah

Dari latar belakang permasalahan tersebut di atas, rumusan masalah yang diajukan adalah sebagai berikut :

1. Apakah macrophage dapat diisolasi dari ikan kakap putih (*Lates carcarifer*)
2. Bagaimana daya bunuh macrophage terhadap bakteri *Vibrio harveyi*

## BAB II

## TINJAUAN PUSTAKA

## 2.1 Vibriosis

Vibriosis adalah sebutan penyakit yang ditimbulkan oleh bakteri dari genus *Vibrio* yang merupakan normal flora di perairan utamanya di laut dan tambak serta di dalam ikan itu sendiri, bisa diisolasi dari perairan dengan fluktuasi salinitas dari rendah sampai tinggi (Paleroni, 1994). *Vibrio* mudah pula diisolasi dari permukaan kulit dan perut ikan laut dan di perairannya, walaupun ada beberapa spesies yang hidup di air tawar. Kebanyakan bakteri tersebut tumbuh baik pada media yang mengandung *seawater base*. Jenis *Vibrio splendidus* dan *Vibrio harveyi* adalah dua spesies yang sering dijumpai pada udang (Sunaryanto dan Mariam, 1986) dan menyerang beberapa ikan budidaya lain serta mengakibatkan kerugian yang besar pada industri perikanan (Lightner, 1994).

## 2.2 Hubungan Stress Dengan Penyakit

Stres dialami ikan jika sudah tidak sanggup menyesuaikan diri dengan lingkungan (Ellis, 1989). Perubahan yang terjadi karena response terhadap lingkungan disebut **General Adaptation Syndrome (GAS)**. Outputnya berupa **Adrenocorticotrophic Hormone (ACTH)** dan **corticosteroid** serta menghasilkan penyimpanan ion  $\text{Na}^+$  dan  $\text{Cl}^-$ , sedangkan ion  $\text{K}^+$  dibuang. Akhirnya mengakibatkan 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 indeks stres pada ikan salmon (Barton and Iwama, 1991). Level plasma cortisol pada ikan yang tidak stres sangat rendah yaitu 5.0 mg / ml (Pickering and Pottinger, 1989). Kenaikan level cortisol menunjukkan *stress-induce immuno suppression* (Maule *et al.*, 1987), memperlambat pertumbuhan (Pickering, 1990) dan kerusakan sistem reproduksi (Carragher *et al.*, 1989; Pottinger and Pickering, 1990). Plasma glucose dan cortisol hanya menunjukkan stres akut, tetapi bukan kondisi yang kronis. Injeksi cortisol terhadap ikan menunjukkan keterlambatan infiltrasi leukosit pada luka dan inhibisi proses penyembuhan luka.

Pada percobaan yang dilakukan oleh Mushiake *et al.* (1985) menunjukkan bahwa kemampuan leukosit belut Jepang (*Anguila japonica*) yang distreskan dengan Copper menurun. Produksi Striped jack di Jepang pada tahun 1989 di atas 830 ribu, tetapi pada tahun 1990 tidak berproduksi sama sekali karena overcrowding sehingga memicu Viral Necrosis Virus (VNN) (Arimoto, personal communication). Stres juga disebabkan oleh pelusi di perairan yang mengakibatkan menurunnya jumlah leukosit dan trombosit (McLeay and Gordon, 1977). Belut Jepang yang distreskan dengan ferric ammonium citrate menjadikan belut tersebut sangat peka terhadap *Vibrio anguillarum* (Nakai *et al.*, 1987).

### 2.3 Aktifitas Phagocytosis Dari Macrophage

Aktifitas macrophage terhadap bakteri adalah mekanisme yang penting di dalam struktur sistem pertahanan tubuh ikan. Tetapi beberapa patogen misalnya *Legionella pneumophila* mempunyai kemampuan untuk survive dalam proses phagocytosis oleh macrophage (Dowling *et al.*, 1992). Hasil penelitian Oliver *et al.* (1985, 1986) menunjukkan bahwa injeksi tunggal dari Freund's Complete Adjuvant (FCA) menaikkan daya bunuh peritoneal macrophage ikan trout terhadap virulent *Aeromonas salmonicida*, menaikkan LD<sub>50</sub> sebesar 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 yaitu oxygen dependent system (Lowrie *et al.*, 1985) dan oxygent independent system (Gabig and Babior, 1981). Oxygen dependent system meliputi produksi relatif oksigen, 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 leukosit ikan melalui studi chemiluminesce (CL) (Stave *et al.*, 1984) dan darah (Higson and Jone, 1984). Ada beberapa kemungkinan menurunnya macrophage dalam ingested particel ialah kemungkinan tidak memproduksi reaktif oksigen atau atau aktifitas macrophage tertekan karena berbagai produk hormon karena stres.

## 2.4 Produksi Antibodi Ikan

Antibodi adalah molekul immunoglobulin yang diproduksi secara langsung sebagai respon terhadap antigen, bisa berbentuk spesifik, non kovalen dan reversibel terhadap antigen yang menimbulkannya. Hanya ada satu immunoglobulin pada ikan yang telah diidentifikasi yaitu IgM (Ellis, 1989). Mammalia IgM terdiri dari lima sub unit, i.e. 10 ringan dan 10 heavy polypeptide serta karbohidrat dengan berat molekul 900.000 Da. Antibodi terdeteksi dalam serum ikan salmon sesudah 6 minggu dari vaksinasi (Landolt, 1989). Padahal channel catfish yang divaksinasi dengan *Edwardsiella ictaluri* FKC dengan dan tanpa vitamin C menunjukkan bahwa level antibodi pada ikan yang pakannya diberi suplemen vitamin C sangat tinggi (Li and Lovell, 1985).

Antibodi dapat dibagi dalam beberapa kategori berdasarkan aktifitasnya misalnya agglutination, precipitation dan virus neutralizing antibodies. Agglutinating antibody mampu mengaktifkan sistem komplemen yang bisa memecah ingested particel. Precipitating antibody mampu menyebabkan precipitate soluble antigen yang sangat penting sebagai antitoksin dengan menetralkan toksisitas. Sedangkan virus neutralizing antibody dijumpai pula pada serum ikan. Antibodi tersebut akan melekat pada permukaan partikel virus sehingga menyebabkan virus tidak bisa menginfeksi sel. Antibody dijumpai di serum, cairan jaringan dan mucus (gut, skin and gill). Insang adalah tempat masuknya antigen dalam *immersion caccination* (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 di bawah 12 °C, tetapi produksi antibodi terdeteksi pada suhu 25 °C, sedangkan rainbow trout bisa membentuk antibodi pada suhu 5 °C. Beberapa sifat yang mempengaruhi pembentukan antibodi misalnya sex ratio dalam suatu populasi dan beberapa faktor stres (handling, kepadatan, kecerahan dan polutan). Dari beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa immunisasi dengan dinding sel bakteri atau lipopolysaccharide menghasilkan titer antibodi yang tinggi dan proteksi (Egidius and Anderson, 1979; Agius *et al.*, 1983; Thorburn and Janson, 1979; Salati *et al.*, 1989).

## BAB III

### TUJUAN PENELITIAN

#### 3.1 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah :

1. Mengisolasi macrophage dari kakap putih (*Lates carcarifer*)
2. Mengetahui daya bunuh macrophage kakap putih hasil isolasi terhadap bakteri *Vibrio harveyi*.

#### 3.2 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi acuan untuk penelitian yang bersifat praktis, yang hasilnya dapat diinformasikan dan diterapkan bagi petani tambak dalam pembenihan dan budidaya kakap putih terutama untuk menghindari serangan bakteri *Vibrio harveyi*.

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Pembenuhan Ikan, Fakultas Kedokteran Hewan dan Tropical Diseases Centre, Universitas Airlangga, pada bulan Mei sampai sengan Agustus 2001. Bakteri *Vibrio harveyi* diisolasi dari tambak di daerah Pasuruan, Jawa Timur, yang berasal dari air untuk budidaya, lumpur dan udang windu (*Penaeus monodon*).

#### 4.2 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan-bahan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah :

1. Ikan kakap putih (*Lates carcarifer*). Digunakan sebagai sumber macrophage. Ikan kakap putih yang digunakan adalah ukuran konsumsi dengan berat berkisar 500 g.
2. Bakteri *Vibrio harveyi*. Diisolasi dari tambak di daerah Pasuruan, Jawa Timur, berasal dari air untuk budidaya, lumpur dan udang windu (*Penaeus monodon*).
3. Media TCBS. Media ini digunakan untuk menumbuhkan bakteri *Vibrio harveyi* hasil isolasi dari tambak.
4. Glycogen. Digunakan untuk merangsang produksi macrophage kakap putih
5. MS-222. Digunakan untuk membius ikan kakap putih
6. Medium Leibovitz (L-15) yang mengandung 2 % Fetal Bovine Serum (FBS) dan 10 unit / ml heparin

7. Trypan blue. Digunakan untuk pengecatan bakteri *Vibrio harveyi* pada saat penghitungan kepadatan sel
8. May-Grunwald Giemsa. Digunakan untuk pewarnaan macrophage
9. Tween-20. Digunakan untuk membunuh macrophage sisa perlakuan pagocytosis
10. Media TSA. Digunakan untuk penanaman bakteri pada saat uji plate count.

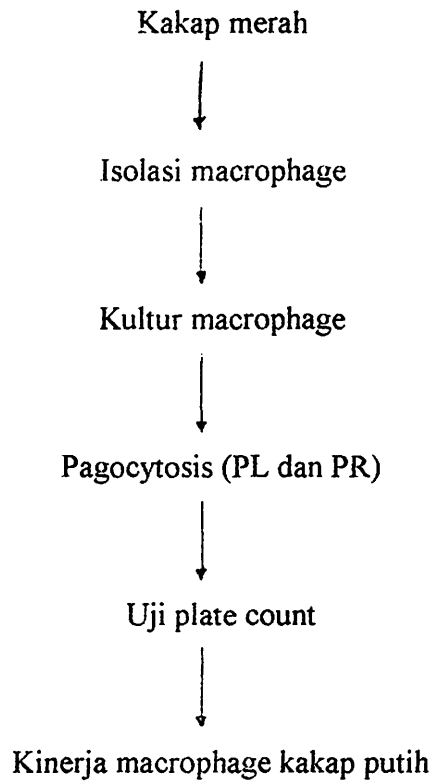
Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. S spuit / alat suntik. Digunakan untuk menyuntikkan berbagai bahan yang diperlukan (sesuai perlakuan) ke dalam tubuh ikan kakap putih serta mengisolasi macrophage
2. Centrifuge. Digunakan untuk mencentrifuge macrophage
3. Haemocytometer. Digunakan untuk menghitung kepadatan sel macrophage dan koloni *Vibrio harveyi* setelah perlakuan pagocytosis
4. Cawan petri. Digunakan untuk penanaman bakteri *Vibrio harveyi* hasil isolasi serta uji plate count setelah perlakuan pagocytosis

#### 4.3 Metode Penelitian

Bakteri *Vibrio harveyi* diisolasi dari tambak di daerah Pasuruan, Jawa Timur yang berasal dari air untuk budidaya, lumpur dan udang windu (*Penaeus monodon*). Bakteri kemudian ditumbuhkan pada media TCBS, kemudian dilakukan *tissue passage* tiga kali pada ikan kakap putih. Reisolasi dilakukan dari ginjal ikan yang sakit pada media TCBS.

Kerangka operasional penelitian adalah sebagai berikut :



Isolasi macrophage

Tujuan : Untuk mendapatkan macrophage dalam jumlah yang cukup dan tidak tercampuri oleh kontaminan lain

Kakap putih disuntik secara *intraperitoneally* dengan 1 – 2 ml glycogen untuk merangsang produksi macrophage. Sesudah 24 jam, ikan dibius dengan MS-22 dan darah diambil dari pangkal ekor agar macrophage tidak terkontaminasi darah merah.

Sebanyak 2 ml Leibovitz medium (L-15) yang mengandung Fetal Bovine Serum dan 10 unit / ml heparin disuntikkan ke dalam intraperitoneal ikan kakap putih. Perut ikan diurut-urut dan kemudian macrophage dipanen dengan cara disedot dengan jarum suntik. Macrophage dicuci dengan 2 ml L-15. Sel macrophage kemudian disentrifuge pada 400 x g selama 10 menit dan dilarutkan pada L-15. Viable cell (sel yang hidup) dilihat dan dihitung dengan pengecatan trypan blue, kemudian kepadatan sel dihitung menggunakan haemocytometer.

### Phagocytosis

Tujuan : Untuk mengetahui kinerja macrophage.

Bakteri dan macrophage (infected 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 pagocytosis dihitung (Phagocytic Index / PI dan Phagocytic Rate / PR).

Sedangkan sisa macarophage dimatikan dengan diberi 50 µl Tween 20 kemudian bakteri yang tersisa diinkubasikan di TCBS untuk uji plate count.

### Uji plate count

Tujuan : Untuk mengetahui berapa banyak bakeri yang bisa dibunuh oleh macrophage atau mengetahui bakteri yang masih hidup setelah perlakuan phagocytosis

Jika proses phagocytosis telah selesai macrophage dibunuh dengan penambahan Tween – 20 selama 5 menit kemudian 50 µl 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.

#### 4.4 Variabel Yang Diamati

Variabel yang diamati terdiri dari :

$$\text{Phagocytic Index : } \frac{\text{Jumlah bakteri yang dimakan oleh macrophage}}{\text{Jumlah macrophage yang memakan bakteri}}$$

Phagocytic Index menggambarkan kemampuan macrophage dalam memakan bakteri.

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

Phagocytic Rate menggambarkan persentase yang memakan bakteri.

$$\text{Kelulushidupan } \textit{Vibrio harveyi} : \frac{\text{CFU terdeteksi dari macrophage pada waktu x}}{\text{CFU dari lysed macrophage pada waktu awal}}$$

Kelulushidupan (Survival Rate) *Vibrio harveyi* menggambarkan persentase bakteri *Vibrio harveyi* yang mampu lolos dari kegiatan phagocytosis oleh macrophaage

## BAB V

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Macrophage dapat diisolasi dari organ ikan termasuk darah, lymphoid organ (khususnya ginjal) dan peritoneal cavity. Sel yang diambil dari sumber yang berbeda mempunyai tingkat reaktivitas yang berbeda pula. Hal tersebut harus dipertimbangkan dalam isolasi dan kegunaannya.

Hasil yang didapatkan dari penelitian, bahwa macrophage dapat diisolasi dari ikan kakap putih (*Lates carcarifer*) serta mempunyai aktifitas phagocytosis yang cukup tinggi. Macrophage diisolasi dari *peritoneal cavity* namun aktifitas yang dihasilkan oleh *head macrophage* pada penelitian ini tidak dilakukan pengujian. Dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa macrophage yang diisolasi mempunyai aktifitas phagocytosis yang cukup tinggi. Aktifitas macrophage semakin meningkat dengan semakin lamanya masa inkubasi. Hal ini terlihat dari nilai Phagocytic Index yang lebih tinggi pada inkubasi 60 menit dibanding inkubasi 30 menit. Berarti, semakin lama masa inkubasi, kemampuan macrophage dalam memakan bakteri semakin besar. Demikian juga untuk nilai Phagocytic Rate, pada inkubasi 60 menit nilainya lebih tinggi dibanding inkubasi 30 menit. Berarti semakin lama masa inkubasi, maka semakin banyak pula macrophage yang memakan bakteri. Kesanggupan macrophage untuk aktifitas phagocytosis yang tinggi disebabkan oleh beberapa hal antara lain tingkat stress ikan yang bisa disebabkan oleh memburuknya kualitas air. Polusi yang



berlebihan terutama logam berat dapat menyebabkan menurunnya aktifitas phagocytosis.

Macrophage yang diisolasi pada penelitian ini berasal dari *peritoneal cavity*, walaupun sebenarnya jumlah dari macrophage terbanyak berasal dari head kidney yang kaya akan resident macrophage yaitu sekitar  $3 - 4 \times 10^7$  cells serta memiliki kemampuan phagocytic lebih baik. Hal ini disebabkan macrophage dari peritoneal lebih mudah diisolasi dan hampir semua terdiri dari macrophage, tidak seperti head kidney yang masih memerlukan proses isolasi lagi.

Tabel 1. Pagositosis Macrophage Kakap Putih Terhadap *Vibrio harveyi*

Nomor sampel	Waktu Inkubasi (menit)	Phagocytic Index (PI)	Phagocytic Rate (PR)
1	30	4,2	0,8
	60	5,1	0,7
2	30	6,4	0,7
	60	6,2	0,6
3	30	7,0	0,8
	60	7,2	0,8
4	30	6,2	0,8
	60	7,8	0,7

Tinggi rendahnya aktifitas phagocytosis kadang dipengaruhi oleh adanya *Predisposing effect* dari beberapa polutan yang menyebabkan stress di perairan. Selain hal tersebut pada ikan yang ditangkap, handling sangat mempengaruhi kualitas psikologis ikan. Stress pada ikan ditandai dengan meningkatnya jumlah cortisol pada darah. Jumlah tersebut berbanding lurus dengan kondisi psikologis ikan. Dari tabel 1 diatas juga dapat dilihat bahwa kemampuan phagocytosis macrophage yang berasal dari ikan berbeda (nomor sampel berbeda), juga bervariasi.

Tabel 2. Kelulushidupan *Vibrio harveyi* dari Pagositosis Macrophage Kakap Putih Pada Indubasi Yang Berbeda

Nomor sampel	Kelulushidupan (Survival Rate) (%)			
	Inkubasi 30 menit		Inkubasi 60 menit	
	<i>Vibrio harveyi</i>	kontrol	<i>Vibrio harveyi</i>	kontrol
1	27	88	20	86
	35	78	28	85
2	33	99	17	77
	24	64	30	61
3	14	93	21	78
	10	87	10	80
4	40	88	25	79
	34	77	23	66

Pada tabel 2 terlihat bahwa tidak semua bakteri mati setelah aktifitas phagocytosis oleh macrophage. Pada inkubasi 30 menit maupun 60 menit, terjadi kelulushidupan yang bervariasi dari bakteri *Vibrio harveyi*. Namun bila dibandingkan dengan kontrol, terlihat bahwa kelulushidupan bakteri pada perlakuan kontrol lebih tinggi. Sebagai bakteri kontrol, digunakan *E. coli*, karena jenis ini merupakan bakteri

yang tergolong paling mudah dimakan macrophage. Bervariasinya nilai kelulushidupan *Vibrio harveyi* dapat diakibatkan oleh bervariasinya kemampuan macrophage atau adanya disfungsi phagocytosis macrophage. Disfungsi phagocytosis macrophage ikan mungkin juga disebabkan oleh *multifaktorial effects* termasuk aktifitas cytotoxic dan hemolytic dari ECP yang dihasilkan oleh bakteri selama kultur. Pada beberapa macrophage kematian terjadi pada waktu kultur dan kemungkinan disebabkan oleh adanya ECP dari bacteria. Pada beberapa bakteri mempunyai kemampuan untuk bisa survive sesudah phagocytosis, misalnya *E. tarda* mempunyai *indigenous resistance* terhadap phagocytosis dan killing dari macrophages. Pada laporan terakhir disebutkan bahwa eel neutrophils tidak mempunyai myeloperoxidase sehingga tidak mempunyai hypochlorous acid yang diperkirakan berfungsi sebagai oksidan (Iida and Wakabayashi, 1995). Dilihat dari persentase bakteri yang masih hidup sesudah phagocytosis, macrophage kakap putih termasuk memiliki aktifitas phagocytosis yang tinggi.

Tingginya aktifitas phagocytosis ini dipengaruhi oleh faktor eksternal dan internal, seperti telah dijelaskan diatas. Selain itu, medium yang digunakan untuk kultur juga sangat menentukan keberhasilan. Medium L-15 memiliki keunggulan karena penggunaan medium ini tidak memerlukan CO<sub>2</sub> buffering system dan sangat cocok untuk kultur macrophage ikan. Medium L-15 memiliki stabilitas pH yang baik, sehingga medium tidak menjadi asam atau basa pada saat pelaksanaan kultur. Sedangkan pada medium lain misalnya RPMI atau MEM memerlukan CO<sub>2</sub> buffering system untuk mencegah medium menjadi asam atau terlalu basa.

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa macrophage kakap putih dapat diisolasi. Macarophage kakap putih memiliki nilai Phagocytic Index rata-rata 5,95 pada inkubasi 30 menit dan 6,57 pada inkubasi 60 menit serta nilai Phagocytic Rate rata-rata 0,77 pada inkubasi 30 menit daan 0,7 pada inkubasi 60 menit. Daya bunuh macrophage kakap putih terhadap bakteri *Vibrio harveyi* lebih tinggi atau lebih baik dibanding terhadap bakteri kontrol (*E. coli*)

#### 6.2 Saran

Pada masa yang akan datang perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang faktor-faktor yang mempengaruhi aktifitas phagocytosis macrophage kakap putih untuk menanggulangi kematian benih kakap putih yang masih tinggi akibat serangan bakteri.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonimus. 1997. Makalah Direktur Bina Program Pada Pertemuan koordinasi dan Pemantapan Rekayasa Teknologi Pembenihan Lintas Unit Pelaksana Teknis Direktorat Jenderal Perikanan di Yogyakarta. Direktorat Jenderal Perikanan. 8 – 12 Juni 1997.
- Agius, C., M.T. Horne and P.D. Ward. 1983. Immuniaztion of rainbow trout *Salmo garidneri* Richardson, against vibriosis : comparison of an extract antigen with whole cell bacterin by oral and intraperitoneal routes. *J. Fish Diseases*, 6: 129 – 134.
- 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.
- 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. *Annual Review of Fish diseases*, 1991 : 3 – 26.
- Carragher, J.F., J.P. Sumpter, T.G. Pottinger and A.D. Pickering. 1989. The deleterious effect of cortisol implantation on reproductive function in two species of trout *Salmo trutta* and *Salmo gairdneri* Richardson. *General and Comparative Endocrinology*, 76 : 310 – 321.
- Dowling, J.N., A.K. Saha and R.H. Glew. 1992. Virulence factors of the family Legionellaceae. *Microbiological Review* 56 : 32 – 60.
- Egidius, E. and Anderson, K. 1978. Host – specific pathogenicity of strains of *Vibrio anguillarum* isolated from rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson and Saithe *Polachius viriens* L. *J. Fish Diseases* 1 : 45 – 50.
- Egidius, E.C. and K. Anderson. 1979. Bath-immunization a practical and non stressing method of vaccination sea farmed rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson agains nibriosis. *J. Fish Diseases*, 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.
- Gabig, T.G. and B.M. Babior. 1981. The killing of pathogen by phagocytes. *Annual Review Medicine*, 32 : 313 – 326.

- Higson, F.K. and O.T.G. Jones. 1984. The generation of active oxyge species by stimulated rainbow trout leucocyte in whole blood. *Comp. Biochem. Physiology*, 77B : 583 – 587.
- Johnson, R.B. 1978. Oxygen metablism and the microbial activity of macrophage. *Fed. Proc.* 37 : 2759 – 2764.
- Landolt, M.L. 1989. Yhe relationship between diet and the immune response of fish. *Aquaculture*, 79 : 193 – 206.
- Lightnet, D.V. 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. The World Aquaculture Society.
- Li, Y. and R.T. Lovell. 1985. Elevated level of dietary ascorbic acid increased immune responses in chanel catfish. *J. Nutrition*, 115 : 123 – 131.
- Lowrie, D.B., P.S. Jackett and P.W. Andrew. 1985. Activation of macrophage for antimicrobial activity. *Immunology Letter*, 11 : 195 – 203.
- Maule, A.G. and C.B. Schrek. 1990. Glucocorticoid receptor in leucocytes and gill of juvenile coho salmon *Onchorynchus kisutch*. *General and Comparative Endocrinology*, 77 : 448 – 455.
- Mushiake, K., T. Nakai and K. Muroga. 1985. Effect of zinc on the activity of eel *Anguilla japonica* leucocyte. *Fish pathology*, 6 : 125 – 130.
- 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 Pathology*, 22 : 185 – 189.
- Olivier, G., C.A. Eaton and N. Campell. 1986. Interaction *Aeromonas salmonicida* dan pertoneal macrophages of brook trout *Salvelinus fontinalis*. *Veterinary Immunization and Immunopathology*, 9 : 223 – 234.
- Olivier, G., T.P.T. Evelyn and R. Lallier. 1985. Immunity to *Aeromonassalmonicida* in coho salmon *Onchorynchus kisutch* induced by modified Freund's complete adjuvant : its non specific nature and probable role of macrophagein the phenomenon. *Development and Comparative Immunology*, 9 : 419 – 432.
- Paleroni, N.J. 1994. *Pseudomonadaceae*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol 1*. Ed by Noel R. Krieg. William and Wilkin. Baltimore USA. Pp 141 – 198.

- Pickering, A.D. and T.G. Pottinger. 1989. Stress response and disease resistance in salmonid fish : effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiology dan Biochemistry*, 7 : 253 – 258.
- Pottiger, 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*. *General and Comparative Endocrinology*, 80 : 264 – 273.
- Salati, F., K. Watanabe, K. Kawai and R. Kusuda. 1989. Immune response of ayu against *Vibrio anguillarum* Lipopolysaccharide. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 19 : 45 – 49.
- 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.
- Stave, J.W., B.S. Roberson and F.M. Hetrick. 1984. Factors affecting the chemiluminescent response of fish phagocytes. *J. Fish Biology*, 25 : 197 – 200.
- Sumpter, J.P., H.M. Dye and T.J. bempfey. 1986. The effects of stress on plasma ACTH, -MSH and cortisol level in salmonid fishes. *General and Comparative Endocrinology*, 62 : 377 – 385.
- Sunaryanto, A. and mariam. 1986. Occurrence of a pathogenic bacteria causing luminescence in penaeid larvae in Indonesia hatcheries. *Bull. Brackishwater Aquatic Development Center*, 8 : 64 – 70.
- Thorburn, M.A. and E. Janson. 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.