

## Efektivitas vaksin bakterial *Streptococcus agalactiae* dengan penyalut berbeda terhadap peningkatan kinerja imunitas ikan nila *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)

[Effectivity of *Streptococcus agalactiae* bacterial vaccine with different coatings for increasing the immunity system on Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)]

Ricko Reynalta<sup>\*✉</sup>, Munti Yuhana<sup>\*</sup>, Angela Mariana Lusiasuti<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup>) Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor

<sup>\*\*</sup>) Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan Bogor

Diterima: 23 Oktober 2018; Disetujui: 19 Maret 2018

### Abstrak

Vaksinasi merupakan salah satu tindakan paling efektif dalam pencegahan infeksi *Streptococcus agalactiae*. Pada penelitian ini, vaksin disalut dengan bahan biomaterial (kitosan, susu skim, dan maltodekstrin) dengan dosis 1% atau 10%, dan dikeringbekukan. Seleksi vaksin dilakukan secara *in vitro* dengan melihat uji viabilitas sel, kelarutan, konsentrasi protein, dan berat molekul protein. Hasil seleksi menunjukkan bahwa vaksin dengan penyalut kitosan 1% dan 10% berada pada urutan kedua terbaik pada uji kelarutan dan konsentrasi protein. Vaksin yang disalut kitosan diujikan kembali secara *in vivo* melalui injeksi pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) sebelum diuji tantang dengan bakteri *S. agalactiae*. Uji (*in vivo*) terdiri atas enam perlakuan dan tiga ulangan yakni perlakuan ikan diinjeksi dengan vaksin cair (A), *Phosphat Buffered Saline* (PBS) (B), vaksin yang disalut kitosan 1% (C), vaksin yang disalut kitosan 10% (D), kitosan 1% (E), dan kitosan 10% (F). Parameter yang diamati meliputi nilai sintasan, *relative percent survival* (RPS), titer antibodi, dan total leukosit. Hasil penelitian perlakuan C menunjukkan hasil berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) dengan nilai sintasan  $92,22 \pm 3,85\%$ , RPS  $85,21 \pm 7,20\%$ , dan titer antibodi C juga menunjukkan hasil paling tinggi, tetapi tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ) untuk meningkatkan jumlah leukosit dalam percobaan melawan infeksi bakteri *S. agalactiae*. Dengan demikian, vaksin kering beku yang disalut kitosan 1% efektif untuk meningkatkan kinerja imunitas ikan nila.

Kata penting: kitosan, *Oreochromis niloticus*, penyalut, *Streptococcus agalactiae*, vaksin

### Abstract

Vaccination is one of the most effective control measure in preventing *Streptococcus agalactiae* infection. In this study, vaccine coatings were prepared with certain biomaterials such as chitosan, skim milk, and maltodextrin at concentration 1% or 10%, and further freeze-dried. Vaccine selected (*in vitro*) by tests: viability cell, solubility, protein concentration and protein molecular weight. The result of *in vitro* test showed that chitosan coating at doses 1% and 10% were the best in solubility and protein concentration test. Vaccine coated with chitosan was administrated again by injection (*in vivo*) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) before challenged by *S. agalactiae*. This test consists of six treatments and three replications, i.e. the fish were injected with liquid vaccine (A), *Phosphat Buffered Saline* (PBS) (B), vaccine with chitosan coating 1% (C), vaccine with chitosan coating 10% (D), chitosan 1% (E), and chitosan 10% (F). Parameters were observed including survival rate, relative percent survival (RPS), antibody titre, and total leucocyte. The results showed that treatment C showed a significant difference ( $P < 0,05$ ) in survival rate  $92.22 \pm 3.85\%$ , RPS  $85.21 \pm 7.20\%$ , and antibody titre highest result, but not significant ( $P > 0,05$ ) to increase total leucocyte in experimental fish against *S. agalactiae* infection. In conclusion, vaccine freeze dry with chitosan coated 1% is effective to improve immunity system of Nile tilapia.

Keywords: chitosan, coating, *Oreochromis niloticus*, *Streptococcus agalactiae*, vaccine

### Pendahuluan

Ikan nila merupakan salah satu komoditas ekspor andalan Indonesia yang produksinya terus meningkat. Data produksi budi daya ikan

nila tahun 2016 sebanyak 1.187.812 ton, meningkat sekitar 6,51% dibandingkan tahun 2017 sebanyak 1.265.201 ton (KKP 2017). Dibandingkan ikan jenis lain, ikan nila tahan terhadap serangan bakteri, parasit, fungi, dan virus (Amal & Zaad 2011), sehingga komoditas ini banyak

✉ Penulis korespondensi

Alamat surel: [rickreynalta@gmail.com](mailto:rickreynalta@gmail.com)

dibudidayakan dalam skala intensif. Permasalahan yang terjadi pada budi daya skala intensif, yakni mudahnya ikan mengalami stress, sehingga lebih rentan terhadap serangan penyakit (Taukhid & Purwaningsih 2011).

Penyakit yang sering menyerang ikan nila adalah streptococcosis yang 85% disebabkan oleh *Streptococcus agalactiae* (Taukhid & Purwaningsih 2011). Infeksi bakteri *S. agalactiae* menyebabkan perubahan klinis dan histopatologis, nekrosis sel-sel hati dan limpa, koloninya menyebar di beberapa organ dalam seperti pada otak, mata dan ginjal (Lusiastuti *et al.* 2010), bentuk badan huruf C, nafsu makan menurun, serta warna tubuh gelap (Dwinanti *et al.* 2014). Infeksi *S. agalactiae* yang parah dapat mengakibatkan kematian massal >50% dalam tempo 3-7 hari (Taukhid & Purwaningsih 2011). Cara yang paling efektif untuk mencegah streptococcosis, yakni dengan vaksinasi (Taukhid *et al.* 2014).

Vaksinasi mampu meningkatkan daya tahan ikan dan memberikan proteksi terhadap serangan penyakit tertentu. Proteksi yang dihasilkan vaksin mempunyai jangka waktu tertentu, sehingga keberadaan antibodi yang ditimbulkan dalam tubuh ikan akan semakin menurun, yang berakibat pada penurunan level tingkat proteksi (Sukenda *et al.* 2015).

Preparasi vaksin dilakukan dengan cara inaktivasi sel patogen *S. agalactiae*, sehingga apabila diinjeksikan ke dalam tubuh menjadi avirulen, namun masih mampu merangsang sistem imun akibat adanya zat asing yang masuk dalam tubuh yang mampu melindungi ikan dalam melawan bakteri patogen (Sugiani *et al.* 2013).

Vaksin yang digunakan melalui injeksi umumnya dibuat dalam bentuk cair (Wali &

Balkhi 2006). Vaksin ini memiliki beberapa kelemahan seperti kurang praktis dan mudah rusak selama penyimpanan dan transportasi (Kumru *et al.* 2014), meskipun kelebihanannya dapat langsung digunakan (siap pakai). Hal ini mengingat karakteristik vaksin cair sensitif terhadap panas, sehingga tidak dapat mempertahankan stabilitas struktur untuk jangka waktu yang lama. Untuk mengatasi permasalahan tersebut, diujicobakanlah vaksin dalam bentuk kering beku yang mudah dalam proses mobilitas serta diharapkan mampu mempertahankan kualitas dalam jangka waktu lama (Kumru *et al.* 2014). Guna mempertahankan kualitas sekaligus meningkatkan imunogenisitas vaksin perlu disalut dengan bahan seperti kitosan, susu skim, dan maltodekstrin.

Kitosan merupakan bahan polimer yang terbukti efektif dalam melindungi sel. Penambahan kitosan 1% dapat menghasilkan viabilitas dan perlindungan lebih baik pada sel *Lactobacillus acidophilus* (Cock & Castillo 2013). Susu skim merupakan bahan dari pemisahan lemak. Susu skim dapat ditambahkan dalam probiotik. Kanmani *et al.* (2011) menyatakan bahwa probiotik bakteri *Streptococcus phocae* yang ditambahkan susu skim 10% dan trehalosa menunjukkan sintasan lebih 85%. Maltodekstrin merupakan produk yang dihasilkan dari hidrolisis pati oleh enzim  $\alpha$ -amilase secara parsial sebagai sumber oligosakarida (Husniati 2009). Penambahan maltodekstrin 10% ke *Bacillus* sp. dosis 0,5% probiotik meningkatkan sintasan  $75 \pm 12,5$  % pada ikan nila (Utami *et al.* 2015).

Oleh karena itu, dilakukan penelitian mengenai penyalut yang paling efektif digunakan untuk vaksin kering beku *S. agalactiae* dalam penanggulangan penyakit streptococcosis. Penambahan penyalut pada vaksin diharapkan

mampu menginduksi sistem kekebalan terhadap penyakit streptococcosis pada ikan nila.

## Bahan dan metode

### Bahan uji

Ikan nila berbobot  $\pm 20$  g didapatkan dari Balai Pengembangan Benih Ikan Air Tawar (BPBIAT) Wanayasa, Purwakarta. Bakteri yang digunakan merupakan bakteri *Streptococcus agalactiae* strain N<sub>14</sub>G dari koleksi Instalasi Riset Pengendalian Penyakit Ikan (IRP2I) Depok.

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober 2017 hingga Juni 2018 bertempat di Instalasi Riset Pengendalian Penyakit Ikan (IRP2I) Depok, Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan (BRPBATPP) Bogor dan Pusat Antar Universitas (PAU), Institut Pertanian Bogor (IPB).

### Rancangan penelitian

Penelitian diawali dengan pengujian *in vitro* dan dilanjutkan pengujian *in vivo*. Uji *in vitro* dilakukan untuk mencari dua komposisi terbaik dari vaksin *S. agalactiae* kepadatan  $3,95 \times 10^9$  cfu mL<sup>-1</sup> yang disalut bahan dan dosis berbeda, sehingga terdiri atas enam perlakuan (Tabel 1). Dosis yang digunakan mengacu pada Cock & Castillo (2013), Kanmani *et al.* (2011), Husniati (2009) dan diseragamkan pada masing-masing penyalut karena terdapat perbedaan struktur molekul bahannya.

Uji *in vivo* terdiri atas enam perlakuan dan tiga ulangan (Tabel 2) yang dilakukan untuk mengetahui efektivitas penyalut vaksin terbaik pada ikan nila dengan diuji tantang bakteri *S. agalactiae* kepadatan  $3,17 \times 10^7$  cfu mL<sup>-1</sup> secara *intra peritoneal* dengan dosis 0,1 mL kg<sup>-1</sup> bobot tubuh ikan.

Tabel 1 Rancangan penelitian perlakuan komposisi vaksin uji *in vitro*

Perlakuan	Keterangan
A	Vaksin yang disalut kitosan (1 %)
B	Vaksin yang disalut kitosan (10 %)
C	Vaksin yang disalut susu skim (1 %)
D	Vaksin yang disalut susu skim (10 %)
E	Vaksin yang disalut maltodekstrin (1 %)
F	Vaksin yang disalut maltodekstrin (10 %)

Tabel 2 Rancangan penelitian perlakuan vaksin uji *in vivo* pada ikan nila

Perlakuan	Keterangan
A	Ikan nila yang menggunakan vaksin cair dan diuji tantang
B	Ikan nila yang tidak menggunakan vaksin dan diuji tantang
C	Ikan nila yang diinjeksikan vaksin kering beku terbaik pertama hasil uji <i>in vitro</i> dan diuji tantang
D	Ikan nila yang diinjeksikan vaksin kering beku terbaik kedua hasil uji <i>in vitro</i> dan diuji tantang
E	Ikan nila yang diinjeksikan hanya dengan penyalut terbaik pertama dan diuji tantang
F	Ikan nila yang diinjeksikan hanya dengan penyalut terbaik kedua dan diuji tantang

*Prosedur penelitian*

Pembuatan vaksin cair. Bakteri *S. agalactiae* dikultur pada media *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA) dengan metode sebar dengan pemberian isolat sebesar 0,1 mL per cawan petri sebanyak 3 petri dan diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 28°C selama 72 jam. Hasil biakan dipanen ke *Phosphat Buffered Saline* (PBS) 99 mL dan dikumpulkan ke dalam botol. Bakteri diinaktivasi dengan formalin sebesar 1% dari total volume yakni 1 mL.

Pembuatan vaksin kering beku. Vaksin cair 30 mL ditambahkan penyalut (kitosan, susu skim, dan maltodekstrin) sesuai dengan perlakuan. Dosis 1% ditambahkan bahan penyalut 0,3 g dan dosis 10% ditambahkan bahan penyalut 3 g, kemudian dihomogenkan, dan dilakukan proses pengeringan beku. Proses kering beku menggunakan mesin *coolsafe* Scanvac dari Chemoscience Pte Ltd. dimulai dengan menyalakan mesin hingga indikator suhu mencapai -100 °C. Memasukkan sampel dan menyalakan *vacuum* selama 3 hari sampai sampel berubah dari bentuk beku menjadi kering beku.

*Parameter penelitian*Tahap 1. Uji in vitro

## 1. Uji kelarutan

Uji kelarutan dilakukan langsung setelah vaksin berbentuk kering beku dengan melarut-

kan ke dalam larutan PBS. Pengukuran dilakukan secara kualitatif berdasarkan Tabel 3.

## 2. Uji viabilitas sel

Vaksin dosis 0,1 mL disebar ke media BHIA dan diinkubasi selama 72 jam pada suhu 28 °C. Pengamatan dilakukan terhadap pertumbuhan bakteri *S. agalactiae*. Reaksi positif ditandai dengan adanya koloni yang tumbuh pada media dan reaksi negatif apabila tidak ada koloni yang tumbuh.

## 3. Uji konsentrasi protein

Uji ini menggunakan metode Bradford (1976) in Bollag & Edelstein (1991). Sebanyak 100 µL sampel ditambah dengan 1 mL pereaksi Bradford. Pereaksi Bradford dibuat dari 0,01 g *coomasie brilliant blue* (CBB) G-250 yang dilarutkan dalam 5 mL etanol 95% dan 200 mL *phosphoric acid* 88%. Sebanyak 30 mL larutan stok ditambah 425 mL akuades, 15 mL etanol 95% dan 30 mL *phosphoric acid* 88%. Campuran tersebut diencerkan dua kali, dihomogenasi dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm. Konsentrasi protein contoh dihitung berdasarkan kurva standar yang dibuat menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA). Data yang diperoleh diurutkan berdasarkan hasil nilai tertinggi.

Tabel 3 Perbedaan kualitas tingkat kelarutan vaksin setelah dilarutkan kembali

Kualitas	Penjelasan
Larut sempurna	Warna larutan homogen, tidak terdapat endapan, dan apabila dilarutkan kembali memiliki warna yang tidak berubah
Larut	Warna larutan homogen, tidak terdapat endapan, dan apabila dilarutkan kembali memiliki warna yang berubah
Sedikit larut	Warna larutan sedikit homogen dan terdapat endapan
Tidak larut	Warna larutan tidak homogen dan terdapat endapan

#### 4. Uji berat molekul protein

Uji ini menggunakan metode *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS Page). Elektroforesis dilakukan mengikuti metode Laemmli (1971) in Bollag & Edelstein (1991) dengan tahapan persiapan gel 30% etanol dan 10% asam asetat selama 3-6 jam pada suhu ruang. Larutan dibuang dan gel direndam 5 kali pada 30% etanol. Inkubasi selama 30 menit. Etanol dibuang dan cuci gel 10 kali dalam air bebas ion, serta diinkubasi 10 menit. Gel direndam 5 kali dalam 0,1% AgNO<sub>3</sub> yang diencerkan. Inkubasi selama 30 menit suhu ruang dan dicuci kembali pada air bebas ion. Gel ditambahkan 2,5% NaCO<sub>3</sub> dan 0,02% formaldehid, serta diinkubasi suhu ruang sambil diagitasi hingga terbentuk pita. Gel dicuci kembali dengan air bebas ion selama 10 menit. Data yang diperoleh diurutkan berdasarkan hasil nilai tertinggi.

#### Tahap 2. Uji in vivo

Ikan nila yang digunakan diadaptasikan terlebih dahulu selama 2 minggu. Ikan nila berukuran ± 20 g disuntikkan vaksin dengan dosis 0,1 mL ekor<sup>-1</sup> secara *intra peritoneal* pada wadah bak berukuran 72 cm × 38 cm × 35 cm dengan volume 60 liter dan kepadatan 30 ekor. Pakan diberikan secara *ad satiation* pada pagi dan sore, serta dipelihara selama 21 hari. Ujiantang dilakukan dengan menginjeksikan bakteri *S. agalactiae* dengan kepadatan 3,17 × 10<sup>7</sup> cfu mL<sup>-1</sup> dengan dosis 0,1 mL ekor<sup>-1</sup> (berdasarkan hasil uji LD50 yang dilakukan) secara *intra peritoneal* dan dipelihara selama 21 hari pasca penyuntikan. Sampling titer antibodi dan total leukosit dilakukan seminggu sekali.

#### 1. Sintasan

Sintasan dihitung menggunakan rumus (Effendie 1997):

$$\text{Sintasan} = \frac{N_t}{N_0} \times 100$$

Keterangan: N<sub>t</sub>= Jumlah ikan yang hidup pada akhir pengamatan (ind), N<sub>0</sub>= Jumlah ikan pada awal pengamatan (ind)

#### 2. Level proteksi relatif (RPS)

Level proteksi relatif diukur melalui nilai *Relative Percentage Survival* (RPS) dengan rumus (Ellis 1988):

$$\text{RPS} = 1 - \frac{\% \text{Mortalitas ikan yang divaksin}}{\% \text{Mortalitas ikan kontrol}} \times 100$$

#### 3. Titer antibodi

Pengukuran titer antibodi dilakukan dengan menggunakan metode Roberson (1990), yaitu teknik aglutinasi langsung dengan menggunakan *microtitre plate*. Pengamatan dilakukan terhadap beberapa ekor sampel ikan uji. Serum darah ikan uji dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 mL. Serum disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Dilakukan uji aglutinasi dalam *microplate* dengan komposisi serum 25 µL dan bakteri *S. agalactiae* 25 µL. Keberadaan antibodi dapat dideteksi 24 jam dengan adanya aglutinasi pada sumur.

#### 4. Total leukosit

Total leukosit menggunakan metode Blaxhall & Daisley (1973). Darah dihisap dengan pipet bulir putih sampai skala 0,5 dan ditambahkan larutan Turk's sampai skala 11. Kedua ujung ditutup sejajar dan digerakkan membentuk angka delapan selama 5 menit. Dua tetes pertama dibuang dan sisanya diteteskan di atas *haemocytometer*. Rumus perhitungan total leukosit, yaitu:

$$\text{Total} = \Sigma \text{ sel terhitung} \times \frac{1}{\text{volume kotak besar}} \times \text{fp}$$

Keterangan: fp = faktor pengenceran

#### Analisis data

Data uji *in vitro*, diseleksi secara deskriptif untuk menentukan dua perlakuan terbaik.

Data uji *in vivo* yang meliputi: sintasan, level

proteksi relatif, dan total leukosit dianalisis menggunakan *one way* (ANOVA), sedangkan data titer antibodi dianalisis secara deskriptif. Data ditabulasi menggunakan bantuan program Microsoft Excel 2016 dan SPSS 23 dengan selang kepercayaan 95%. Apabila berpengaruh nyata, maka akan dilakukan Uji Duncan.

Tabel 4 Hasil pengujian kelarutan, viabilitas sel, kelarutan, dan konsentrasi protein perlakuan vaksin dengan penyalut berbeda

No	Perlakuan	Hasil Pengujian		
		Kelarutan	Viabilitas Sel	Konsentrasi Protein (mg mL <sup>-1</sup> )
1.	A (Vaksin+Kitosan 1%)	Larut sempurna	Tidak viabel	0,292
2.	B (Vaksin+Kitosan 10%)	Larut sempurna	Tidak viabel	0,769
3.	C (Vaksin+Susu skim 1%)	Sedikit larut	Tidak viabel	0,308
4.	D (Vaksin+Susu skim 10%)	Sedikit larut	Tidak viabel	0,334
5.	E (Vaksin+Maltodekstrin 1%)	Larut sempurna	Tidak viabel	0,162
6.	F (Vaksin+Maltodekstrin 10%)	Larut sempurna	Tidak viabel	0,147

Tabel 5 Hasil pengujian berat molekul protein vaksin dengan penyalut berbeda

No	Berat Molekul Perlakuan (kDa)						
	Vaksin cair	A (V+K1%)	B (V+K10%)	C (V+SS1%)	D (V+SS10%)	E (V+M1%)	F (V+M10%)
1.	121,53	-	-	-	-	-	-
2.	114,29	-	-	114,29	114,29	-	-
3.	95,06	-	-	95,06	95,06	-	-
4.	84,07	-	-	-	-	-	-
5.	79,07	-	-	-	-	-	-
6.	65,77	65,77	65,77	65,77	65,77	-	-
7.	58,17	-	-	-	-	-	-
8.	45,50	-	-	45,50	45,50	-	-
9.	37,84	37,84	37,84	37,84	37,84	-	-
10.	26,18	26,18	26,18	-	-	-	-
11.	23,16	23,16	23,16	23,16	23,16	-	-
12.	16,02	12,53	12,53	16,02	16,02	-	-
13.	12,53	-	-	12,53	12,53	-	-
14.	9,22	-	-	9,22	9,22	-	-

Keterangan :(-): Tidak ada nilai yang terdeteksi

## Hasil

### Tahap 1. Uji *in vitro*

Vaksin yang digunakan merupakan vaksin hasil seleksi terbaik secara *in vitro*, yakni vaksin yang disalut kitosan 1 % dan 10 % dengan hasil steril, larut sempurna, memiliki nilai konsentrasi protein (0,292 dan 0,769 mg mL<sup>-1</sup>), dan memiliki berat molekul, yaitu: 65,77; 37,84; 26,18; 23,16 dan 12,53 kDa (Tabel 4). Hasil uji *in vitro* disajikan pada Tabel 4 dan 5.

### Tahap 2. Uji *in vivo*

Hasil pemeliharaan menunjukkan sintasan perlakuan C berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap semua perlakuan dengan nilai  $92,22 \pm 3,85\%$ . Level proteksi relatif (RPS) juga menun-

jukkan perlakuan C memberikan hasil berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) dengan semua perlakuan dengan nilai  $85,21 \pm 7,20\%$ . Nilai sintasan dan RPS disajikan pada Tabel 6.

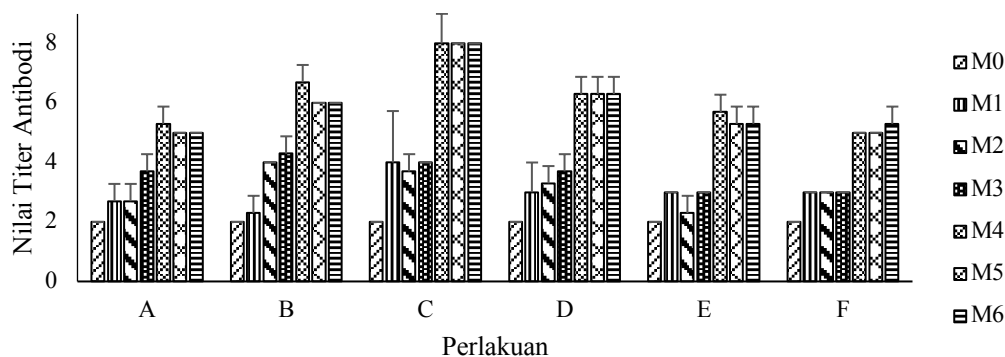
Titer antibodi menunjukkan perlakuan C menunjukkan hasil titer antibodi tertinggi dibandingkan lainnya, kemudian diikuti dengan perlakuan D. Titer antibodi semua perlakuan dapat dilihat pada Gambar 1.

Nilai leukosit selama pemeliharaan menunjukkan perlakuan A, C dan D memberikan pengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap perlakuan B, namun tidak berpengaruh nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap perlakuan E dan F. Total leukosit selama pemeliharaan disajikan pada Gambar 2.

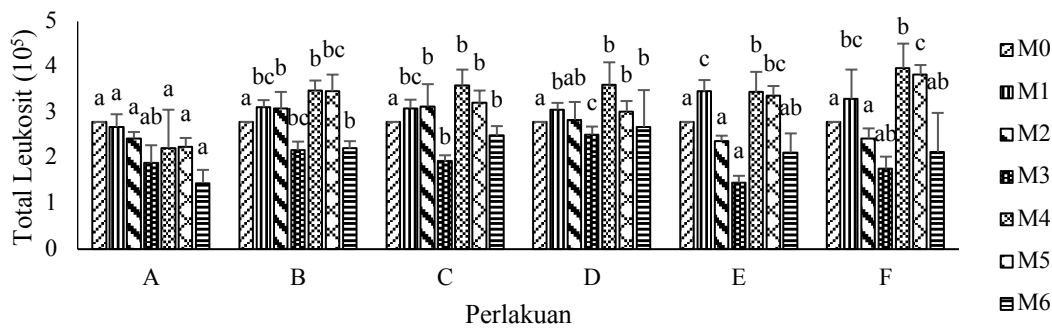
Tabel 6 Nilai sintasan dan RPS setiap perlakuan yang diuji tantang menggunakan *S. agalactiae*

No.	Perlakuan	Sintasan (%)	RPS (%)
1.	A (Vaksin)	$72,22 \pm 6,94^b$	$46,74 \pm 10,73^a$
2.	B (Tidak divaksin)	$46,67 \pm 8,82^a$	-
3.	C (Vaksin kering beku kitosan 1 %)	$92,22 \pm 3,85^c$	$85,21 \pm 7,20^b$
4.	D (Vaksin kering beku kitosan 10 %)	$75,56 \pm 8,39^b$	$55,00 \pm 8,58^a$
5.	E (Kitosan 1%)	$68,89 \pm 8,39^b$	$42,28 \pm 6,87^a$
6.	F (Kitosan 10%)	$72,22 \pm 5,09^b$	$48,01 \pm 1,76^a$

Keterangan: (-): Tidak dilakukan pengukuran. Huruf yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata ( $P < 0,05$ ).



Gambar 1 Titer antibodi beberapa perlakuan A (vaksin cair), B (tidak divaksin), C (vaksin kering beku kitosan 1%), D (vaksin kering beku kitosan 10%), E (kitosan 1%), F (kitosan 10%) yang diuji tantang menggunakan *S. agalactiae* pada setiap perlakuan mulai dari pra vaksinasi (minggu ke - 0), vaksinasi (minggu ke - 1, 2, 3), dan pasca uji tantang (minggu ke - 4, 5, 6)



Gambar 2 Total sel darah putih (leukosit) pada setiap perlakuan A (vaksin cair), B (tidak divaksin), C (vaksin kering beku kitosan 1 %), D (vaksin kering beku kitosan 10 %), E (kitosan 1 %), F (kitosan 10 %) mulai dari pra vaksinasi (minggu ke - 0), vaksinasi (minggu ke - 1, 2, 3), dan pasca uji tantangan (minggu ke - 4, 5, 6). Huruf yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata ( $P < 0,05$ )

### Pembahasan

Vaksin tidak viabel menandakan bahwa vaksin yang digunakan sudah dalam keadaan inaktif, sehingga aman bagi ikan dan tidak ada resiko bersifat virulen. Vaksin ikan juga harus larut sempurna (homogen) agar vaksin yang masuk ke inang jumlahnya tetap. Hasil larut sempurna diperoleh vaksin yang disalut kitosan dan maltodekstrin. Hal ini diduga karena bahan penyalut yang digunakan, baik kitosan maupun maltodekstrin dapat larut dalam air (Kurniasih & Kartika 2011; Pentury *et al.* 2013). Vaksin yang disalut susu skim menghasilkan hasil kurang larut, karena sebagian besar kandungan susu skim merupakan kasein yang merupakan protein hidrofobik atau protein yang tidak larut dalam air (Estiasih 2012).

Nilai berat molekul perlakuan pada semua vaksin kering beku terjadi pengurangan jumlah nilai berat molekul. Hal ini diduga karena proses kering beku, dapat mengurangi atau menghilangkan protein yang terdapat dalam vaksin. Nahariah *et al.* (2015) menyatakan bahwa proses kering beku dapat mengakibatkan perubahan struktur jaringan bahan yang dikeringkan. Perlakuan vaksin A dan B yang disalut

kitosan memiliki berat molekul protein karena kitosan menghasilkan zat pelindung mukosa (Irianto & Muljanah 2011), sehingga kandungan vaksin bisa terlindungi. Sama halnya dengan perlakuan C dan D dengan bahan penyalut susu skim diduga karena susu skim dapat melindungi bakteri selama proses pembekuan (Sari & Moeljaningsih 2011) yang mampu melindungi kandungan vaksin. Berbeda dengan perlakuan E dan F yakni bahan penyalut maltodekstrin yang tidak menghasilkan berat molekul protein karena konsentrasi yang digunakan terlalu besar, sehingga penyalut membungkus vaksin terlalu kuat dan vaksin tidak dapat terdeteksi.

Vaksin kering beku kitosan 1% memberikan proteksi paling baik diduga karena penyalut kitosan memberikan proteksi sebagai bahan anti mikroba, selain dari vaksin inaktif *S. agalactiae*. Terbukti pada ikan yang hanya diberikan kitosan, memberikan hasil tidak berbeda nyata dengan ikan hasil vaksinasi. Konsentrasi kitosan yang digunakan harus dalam jumlah sedikit agar bahan kitosan tidak menghambat paparan epitop vaksin inaktif yang diberikan. Ini dibuktikan dengan perlakuan D menggunakan penyalut kitosan lebih banyak, namun



menghasilkan nilai sintasan yang lebih rendah dibanding perlakuan C. Besarnya konsentrasi kitosan yang digunakan diduga membuat zat pelindung yang dihasilkan juga banyak, sehingga vaksin yang sedianya diperuntukkan memicu respons imun spesifik bagi inang menjadi tidak efektif.

Vaksin kering beku kitosan 1% (perlakuan C) juga efektif digunakan sebagai vaksin untuk menanggulangi infeksi *S. agalactiae*, karena memiliki nilai RPS > 50 % (Ellis 1988). Vaksin yang disalut kitosan 10 % (perlakuan D) meskipun memiliki nilai RPS > 50 %, namun hasil uji statistik tidak berbeda nyata dengan perlakuan lain.

Antibodi berperan sebagai sistem pertahanan tubuh ikan dalam melumpuhkan patogen yang masuk (Sukenda *et al.* 2014). Awal vaksinasi (M1-M3) tidak menunjukkan peningkatan yang signifikan yang disebabkan karena bakteri yang masuk ke tubuh ikan sudah dalam bentuk inaktif, sedangkan pada masa ujiantang (M4-M6) menunjukkan terjadi peningkatan pada semua perlakuan vaksin cair, kering beku dan kitosan. Peningkatan tertinggi ditunjukkan pada perlakuan C. Hal ini menandakan perlakuan vaksin yang disalut kitosan 1 % mampu merespons dengan baik antigen yang masuk, sehingga sel B memproduksi antibodi dan melindungi secara spesifik serangan bakteri *S. agalactiae* (Biller *et al.* 2014).

Leukosit merupakan bagian yang berkaitan dengan sistem imun. Penggunaan vaksin *S. agalactiae* yang disalut dengan kitosan tidak memberikan pengaruh yang nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap peningkatan jumlah leukosit ikan. Awal vaksinasi (M1), hampir semua perlakuan menunjukkan peningkatan jumlah leukosit yang diduga karena adanya zat asing yang masuk ke dalam

tubuh inang sebagai upaya pertahanan tubuh (Sukenda *et al.* 2014). Pe-ningkatan jumlah sel leukosit juga terjadi saat ujiantang (M4) pada semua perlakuan. Hal ini diduga karena adanya infeksi bakteri yang masuk pada ujiantang, sehingga meningkatkan jumlah leukosit (Matofani *et al.* 2013). Hartika *et al.* (2014) berpendapat bahwa peningkatan jumlah leukosit ikan berperan cukup besar terhadap serangan penyakit dan infeksi. Terjadi penurunan pada minggu ke-5 dan ke-6 (M5 dan M6) di semua perlakuan diduga karena jumlah bakteri dalam inang menurun, sehingga leukosit juga menurun dan digantikan oleh antibodi (Matofani *et al.* 2013).

### Simpulan

Vaksin *Streptococcus agalactiae* yang disalut kitosan 1% efektif untuk meningkatkan sifat imunitas ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dengan nilai sintasan mencapai  $92,22 \pm 3,85$  %, *Relative Percent Survival*  $85,21 \pm 7,20$ %, serta titer antibodi tertinggi.

### Persantunan

Terima kasih kepada Balai Riset Penelitian dan Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan yang telah memberikan bantuan teknis dan fasilitas selama penelitian.

### Daftar pustaka

- Amal MNA, Zaad MZ. 2011. Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 34(2): 195–206.
- Biller JDT, Montassier HJ, Takahashi LS, Urbinati EC. 2014. Proposed method for agglutinating antibody titer analysis and its use as indicator of acquired immunity in pacu, *Piaractus mesopotamicus*. *Brazilian Journal of Biology*, 74(1): 238-242.

- Blaxhall PC, Daisley KW. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology*, 5(6): 577-581.
- Bollag MD, Edelman SJ. 1991. *Protein Methods*. Wiley-Liss. New York. 170 p.
- Cock LS, Castillo VV. 2013. Probiotic encapsulation. *African Journal of Microbiology Research*, 7(40): 4743-4753.
- Dwinanti SH, Sukenda, Yuhana M, Lusiastuti AM. 2014. Toksisitas dan imunogenitas produk ekstraseluler *Streptococcus agalactiae* tipe non-hemolitik pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia*, 2(1): 105-116.
- Effendie MI. 1997. *Biologi Perikanan*. Yayasan Pustaka Nusatama. Yogyakarta. 157 p.
- Ellis AE. 1988. General principles of fish vaccination. In: Ellis AE (ed.). *Fish Vaccination*. Academic Press, London. pp. 1-19.
- Estiasih T. 2012. Adsorpsi kompetitif fosfolipid pada permukaan globula minyak dalam sistem emulsi yang distabilisasi kaseinat. *Jurnal Teknologi Pertanian*, 13(1): 16-26.
- Hartika R, Mustahal, Putra AN. 2014. Gambaran darah ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dengan penambahan dosis prebiotik yang berbeda dalam pakan. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*, 4(4): 259-267.
- Husniati. 2009. Studi karakterisasi sifat fungi maltodekstrin dari pati singkong. *Jurnal Riset Industri*, 3(2): 133-138.
- Irianto HE, Muljanah I. 2011. Proses dan aplikasi nanopartikel kitosan sebagai penghantar obat. *Squalen*, 6(1): 1-8.
- Kanmani P, Kumar RS, Yuvaraj N, Paari KA, Pattukumar V, Arul V. 2011. Cryopreservation and microencapsulation of a probiotic in alginate kitosan capsules improves survival in simulated gastrointestinal conditions. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16(6): 1106-1114.
- [KKP] Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2017. *Dashboard Produksi Perikanan dan Kelautan 2017 [internet]*. [diunduh 17 November 2018]. Tersedia pada: [https://satudata.kkp.go.id/dashboard\\_produksi](https://satudata.kkp.go.id/dashboard_produksi).
- Kumru OS, Joshi SB, Smith DE, Middaugh CR, Prusik T, Volkin DB. 2014. Vaccine instability in the cold chain: Mechanisms, analysis and formulation strategies. *Biologicals*, 42(5): 237-259.
- Kurniasih M, Kartika D. 2011. Sintesis dan karakterisasi fisika-kimia kitosan. *Jurnal Inovasi*, 5(1): 42-48.
- Lusiastuti AM, Purwaningsih U, Sumiati T. 2010. Isolasi bakteriofaga anti *Streptococcus agalactiae* dari ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Riset Akuakultur*, 5(2): 237-243.
- Matofani AS, Hastuti S, Basuki F. 2013. Profil darah ikan kunti (*Oreochromis niloticus*) yang diinjeksi *Streptococcus agalactiae* dengan kepadatan berbeda. *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 2(2): 64-72.
- Nahariah, Legowo AM, Abustam E, Hintono A. 2015. Aktivitas antioksidan dan antihipertensi tepung putih telur hasil "Pan Drying" pada suhu dan waktu pengeringan yang berbeda. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan*, 4(1): 28-34.
- Pentury MH, Nursyam H, Harahap N, Soemarno. 2013. Karakterisasi maltodekstrin dari pati hipokotil mangrove (*Bruguiera gymnorrhiza*) menggunakan beberapa metode hidrolisis enzim. *Indonesian Green Technology Journal*, 2(1): 53-60.
- Roberson BS. 1990. Bacterial agglutination. In: Stolen JS, Fletcher TC, Danerson DP, Roberson BS, van Muiswinkel WB. *Techniques in Fish Immunology*. SOS Publications. New Haven (US). pp.81-86.
- Sari AN, Moeljaningsih. 2011. Pengaruh penambahan susu skim dan konsentrasi starter (*Lactobacillus casei*) dalam pembuatan es krim susu jagung probiotik. *Berita Litbang Industri*, 16(1): 36-46.
- Sukenda, Febriansyah TR, Nuryati S. 2014. Efikasi vaksin sel utuh *Streptococcus agalactiae* pada ikan nila *Oreochromis sp.* melalui perendaman. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 13(1):83-93.
- Sukenda, Rusli, Nuryati S, Hidayatullah D. 2015. Durasi proteksi vaksin *Streptococcus agalactiae* untuk pencegahan streptococcosis pada ikan nila. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 14(2): 192-201.
- Sugiani D, Sukenda, Harris E, Lusiastuti AM. 2013. Vaksinasi ikan tilapia (*Oreochromis niloticus*) menggunakan vaksin monovalen dan bivalen untuk pencegahan penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* dan *Streptococcosis*. *Jurnal Riset Akuakultur*, 8(2): 230-239.

- Taukhid, Lusiastuti AM, Sumiati T. 2014. Aplikasi vaksin *Streptococcus agalactiae* untuk pencegahan penyakit streptococcosis pada budidaya ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Berita Biologi*, 13(3): 245-253.
- Taukhid, Purwaningsih U. 2011. Penapisan isolat bakteri *Streptococcus spp.* sebagai kandidat antigen dalam pembuatan vaksin, serta efikasinya untuk pencegahan penyakit streptococcosis pada ikan nila, *Oreochromis niloticus*. *Jurnal Riset Akuakultur*, 6(1): 103-118.
- Utami DAS, Widanarni, Suprayudi MA. 2015. Administration of microencapsulated probiotic at different doses to control streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Microbiology Indonesia*, 9(1): 17-24.
- Wali A, Balkhi MUH. 2006. Fish vaccination and therapeutics. *International Journal of Multidisciplinary Research and Development*, 3(4): 55-60.