

## Kandidat Vaksin Potensial *Streptococcus agalactiae* untuk Pencegahan Penyakit Streptococcosis pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)

(POTENTIAL VACCINE CANDIDATE OF *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* FOR PREVENT  
*STREPTOCOCCOSIS ON NILA TILAPIA (OREOCHROMIS NILOTICUS)*)

Esti Handayani Hardi<sup>1</sup>, Sukenda<sup>2</sup>, Enang Harris<sup>3</sup>, Angela Mariana Lusiastuti<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Bagian Mikrobiologi Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,  
Universitas Mulawarman, Kampus Gunung Kelua, Jln Gunung Tabur,  
Samarinda, Kalimantan Timur, Email : estie\_hardie@yahoo.com

<sup>2</sup>Bagian Kesehatan Ikan, <sup>3</sup>Bagian Teknik Produksi dan Manajemen,  
Institut Pertanian Bogor, Jawa Barat,

<sup>4</sup>Bagian Kesehatan Ikan, Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar Bogor, Jawa Barat

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mendapatkan vaksin terbaik untuk mencegah penyakit streptokokosis yang disebabkan oleh *Streptococcus agalactiae* pada ikan nila. Vaksin yang dibuat adalah vaksin sel utuh dan vaksin produk ekstraseluler/ECP dari *S. agalactiae* tipe  $\hat{\alpha}$ -hemolitik (62,3 dan 55,8 kDa) dan tipe non-hemolitik (62,3; 55,8 dan 51,8 kDa). Vaksin diinaktivasi dengan formalin 3%. Ikan yang digunakan pada percobaan ini berukuran 15 g dan diinjeksi melalui intraperitoneal (IP) untuk vaksin dan uji tantang dengan *S. agalactiae* tipe  $\hat{\alpha}$ -hemolitik (kepadatan  $10^3$  colony-forming units (CFU)/fish) dan tipe non-hemolitik ( $10^5$  CFU). Vaksin sel utuh tipe  $\hat{\alpha}$ -hemolitik memberikan proteksi yang lebih baik pada ikan nila dibandingkan dengan vaksin dari ECP bakteri tipe yang sama. Namun, vaksin gabungan antara sel utuh dan ECP tipe  $\hat{\alpha}$ -hemolitik lebih baik memberikan proteksi pada ikan nila dibandingkan dengan vaksin sel utuh. Sementara itu vaksin gabungan antara sel utuh non-hemolitik dan ECP  $\hat{\alpha}$ -hemolitik hanya memberikan proteksi sebesar 79% pada infeksi dari *S. agalactiae* tipe  $\hat{\alpha}$ -hemolitik dan 42% tipe non-hemolitik. Vaksin sel utuh dari tipe non hemolitik hanya mampu mencegah infeksi dari tipe non hemolitik saja tidak terhadap infeksi dari tipe yang lain. Vaksin gabungan antara sel utuh dan ECP dari tipe non-hemolitik hanya memberikan proteksi sebesar 50-56% pada infeksi kedua tipe bakteri. Namun vaksin yang dibuat dari gabungan antara sel utuh tipe  $\hat{\alpha}$ -hemolitik dan ECP tipe non-hemolitik memberikan proteksi yang baik terhadap infeksi dari *S. agalactiae* tipe  $\hat{\alpha}$ -hemolitik dibandingkan dengan infeksi dari tipe non-hemolitik. Ini menunjukkan bahwa kandidat vaksin terbaik untuk mencegah infeksi dari *S. agalactiae* adalah vaksin yang dibuat dari *S. agalactiae* tipe  $\hat{\alpha}$ -hemolitik dengan menggabungkan antara ECP dan sel utuh.

Kata Kunci : *S. agalactiae*, ECP, sel utuh, vaksinasi

### ABSTRACT

The effectiveness of *Streptococcus agalactiae* vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) was evaluated for prevention of streptococcal disease. The vaccine was prepared using formalin-killed whole cell and concentrated extracellular products/ECP (62.3 and 55.8 kDa) of  $\hat{\alpha}$ -haemolytic isolate and 62.3; 55.8 and 51.8 kDa protein of non-haemolytic ECP of *S. agalactiae*. Vaccination and challenged ( $10^3$  colony-forming units (CFU)/fish of  $\hat{\alpha}$ -haemolytic and  $10^5$  CFU/fish of non-haemolytic *S. agalactiae*) trial was conducted by intraperitoneal (IP) injection into fish with average body weight of 15 g. Fish were vaccinated with whole cell, ECP and mixed (whole cell and ECP) vaccine. Tilapia vaccinated with whole cell of  $\hat{\alpha}$ -haemolytic isolate had a relative percent survival (RPS) rates higher than those of ECP  $\hat{\alpha}$ -haemolytic vaccine. However, fish vaccinated with mixed (whole cell and ECP) of  $\hat{\alpha}$ -haemolytic has a better protection rates as compared to those of two type of *S. agalactiae* infection. Whereas those vaccinated with mixed (whole cell non-haemolytic and ECP of  $\hat{\alpha}$ -haemolytic) vaccine has protection rate of 79% from  $\hat{\alpha}$ -haemolytic and 42% from non-haemolytic infection. Tilapia vaccinated with whole cell of non-haemolytic was only able to protect fish from non-haemolytic infection and was unable to protect fish from other types. Tilapia vaccinated with ECP non-haemolytic had a worse RPS than others vaccines in which mix whole cell and ECP vaccine of non-haemolytic had a protection 50-56% from *S. agalactiae* infection. Whereas vaccinated with mixed (whole cell  $\hat{\alpha}$ -haemolytic and ECP of non-haemolytic) vaccine showed a better to protect from  $\hat{\alpha}$ -haemolytic than non-haemolytic infection. It showed that vaccination with mixed (whole-cell and extracellular product) vaccine of *S. agalactiae*  $\hat{\alpha}$ -haemolytic was more effective to protect tilapia against Streptococcosis.

Keywords: *S. agalactiae*, ECP, whole cell, vaccination

## PENDAHULUAN

Bakteri penyebab penyakit streptokokosis pada budidaya ikan nila yang sering ditemukan lima tahun belakangan ini adalah bakteri *Streptococcus agalactiae*. Streptokokosis menyebabkan ikan berenang *whirling*, *unilateral* atau *bilateral* eksophtalmia, dan warna tubuh menjadi hitam (Evans *et al.*, 2002; Hardi *et al.*, 2011a; Elder *et al.*, 1994; ). Evans *et al.*, (2006a) menunjukkan hasil pengamatan bahwa *S. agalactiae* menyebabkan ikan nila mati sebanyak 90% dalam enam hari setelah injeksi. Gejala tingkah laku ikan nila sebelum mati terlihat seperti berenang lemah dan berada di dasar akuarium, respons terhadap pakan lemah, berenang tidak beraturan, tubuh membentuk huruf-C, perubahan pada warna tubuh, dan bukaan operculum menjadi lebih cepat.

Sheehan *et al.*, (2009) melaporkan bahwa bakteri *S. agalactiae* yang menginfeksi ikan nila ditemukan dalam dua tipe yaitu tipe 1 ( $\hat{\alpha}$ -hemolitik) dan tipe 2 (non-hemolitik). Bakteri tipe 1 tumbuh baik (cepat) pada suhu 37°C dan mampu menghidrolisis gula lebih banyak sedangkan bakteri tipe 2 memiliki sifat yang bertolak belakang dengan tipe 1, yaitu tumbuh relatif lebih lambat pada suhu 37°C dan hanya gula tertentu yang mampu dihidrolisis. Dari hasil pengamatan di berbagai tempat di dunia ternyata bakteri tipe 2 lebih ganas dibandingkan dengan tipe 1. Penyebaran bakteri tipe 2 lebih luas dan ditemukan di beberapa wilayah di Asia seperti Cina, Indonesia, Vietnam, dan Filipina juga di wilayah Amerika Latin seperti Ekuador, Honduras, Meksico, dan Brazil. Hasil pengujian patogenisitas yang dilakukan Hardi *et al.*, (2011a) diketahui bahwa bakteri tipe non-hemolitik menyebabkan kematian setelah 6-24 jam pascainjeksi sedangkan tipe  $\hat{\alpha}$ -hemolitik kematian terjadi setelah 48 jam. Perubahan pada gejala klinis ikan nila yang diinjeksi bakteri tipe non-hemolitik lebih cepat muncul (perubahan pola renang, respons terhadap pakan dan perubahan pada mata dan *clear operculum*) secara rata-rata muncul 6 jam pascainjeksi dan 12 jam pada ikan nila yang diinjeksikan dengan bakteri tipe  $\hat{\alpha}$ -hemolitik.

Beberapa upaya vaksinasi untuk mencegah penyakit streptokokosis sudah dilakukan antara lain injeksi vaksin *formalin-killed cell Streptococcus difficile* berupa vaksin sel utuh dan ekstrak protein bakteri *Enterococcus* sp. (Romalde *et al.*, 1996), *Streptococcus* sp. (Akhlaghi *et al.*, 1996) dan *S. iniae* (Eldar *et*

*al.*, 1997; Klesius *et al.*, 2000). Evans *et al.*, (2004a), Evans *et al.* (2004b) dan Evans *et al.*, (2004c) melakukan uji efikasi vaksin gabungan (ECP) dan sel utuh dari bakteri *S. agalactiae*. Vaksin inaktif dari *S. agalactiae* pada ikan nila di Brazil memberikan proteksi sebesar 83,6% setelah dilakukan uji tantang pada hari ke-21 pascavaksinasi dan 96,4% pada saat diuji tantang pada hari ke-30 pascavaksinasi (Giordano *et al.*, 2010).

Ada beberapa macam vaksin yang dapat digunakan dalam budidaya ikan antara lain; vaksin sel utuh, vaksin dari komponen sel, dan vaksin DNA. Pemilihan vaksin yang digunakan bergantung pada jenis bakteri yang digunakan, kondisi ikan, dan kondisi lingkungan. Selain itu, beberapa hal yang perlu dipertimbangkan adalah antigen yang heterogen, imunitas yang relatif rendah, dan cara aplikasinya di lapangan (Pasaribu *et al.*, 1990). Efikasi vaksinasi sangat tergantung pada jenis dan kualitas vaksin, cara vaksinasi (Souter, 1984), kondisi ikan, dan kualitas air (Ellis, 1988).

Untuk menyelesaikan masalah streptokokosis, perlu dilakukan penelitian vaksinasi dengan menggunakan protein yang terkandung dalam bakteri *S. agalactiae* karena vaksinasi dengan sel utuh dari isolat tunggal belum berhasil. Banyaknya isolat *S. agalactiae* yang ditemukan menginfeksi ikan nila menyebabkan patogenisitasnya juga berbeda pada ikan nila. Hal ini memberikan peluang untuk dilakukan penelitian dengan menggabungkan isolat-isolat tersebut. Penelitian ini bertujuan mengetahui efikasi vaksin sel utuh, ECP, dan gabungan keduanya baik yang berasal dari *S. agalactiae* tipe  $\hat{\alpha}$ -hemolitik dan atau non-hemolitik untuk penanggulangan penyakit streptokokosis.

## METODE PENELITIAN

### Ikan Uji dan Bakteri *S. agalactiae*

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Patologi Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar Sempur, Bogor dan Laboratorium Kesehatan Ikan Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor, Dramaga, Bogor.

Ikan uji yang digunakan adalah ikan nila (*Oreochromis niloticus*) berbobot 15 g sebanyak 45 ekor setiap perlakuan. Ikan berasal dari satu sumber dan diadaptasi dalam akuarium uji selama 14 hari sebelum digunakan serta tidak

ditemukan adanya gejala penyakit streptokokosis.

Isolat *S. agalactiae* yang digunakan adalah tipe  $\hat{\alpha}$ -hemolitik ( $N_{14}G$ ) dan non-hemolitik ( $NK_1$ ) yang telah melalui proses pemilihan kandidat vaksin yaitu melalui uji karakteristik, uji patogenisitas, dan kajian ECP *S. agalactiae* (Hardi *et al.*, 2011a).

### Pembuatan Vaksin

Vaksin yang digunakan berasal dari masing-masing tipe bakteri yang dibiakkan dalam media cair *brain heart infusion* (BHI, BD Bacto™) yang diinkubasi selama 72 jam pada suhu 28-30°C. Media yang telah ditumbuhi bakteri ditambahkan 3% formalin dan diinkubasi lagi selama 24 jam pada suhu yang sama.

Untuk mendapatkan vaksin sel utuh, suspensi disentrifus 7000 rpm selama 30 menit, *pellet* dicuci dua kali dengan *phosphate buffer saline* (PBS), dan terakhir ditambahkan PBS sebanyak volume awal biakan bakteri. Sampel vaksin ditanam pada media BHIA, jika tidak tumbuh dalam waktu 72 jam, vaksin aman untuk digunakan.

Vaksin ECP dibuat dengan menyentrifus suspensi pada 10000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Supernatan kemudian disaring dengan filter saring 0,22  $\mu$ m. Protein di dalam supernatan kemudian dianalisis dengan SDS-PAGE untuk mengetahui bobot molekul protein yang terkandung di dalamnya.

### Parameter yang diukur

Untuk mengetahui efikasi dari vaksin yang diberikan, dilakukan pengamatan pada beberapa parameter yaitu: 1) Parameter utama berupa tingkat kelangsungan hidup relatif (*Relative Percent Survival/RPS*) dihitung menggunakan rumus Baulny *et al.*, (1996) :

$$RPS = \left( 1 - \frac{\% \text{vaccinate mortality}}{\% \text{control mortality}} \right) \times 100$$

2) Parameter pendukung yaitu : pengamatan gambaran darah ikan meliputi pengamatan total leukosit (Doggett *et al.*, 1987; Rowley, 1990) serta total eritrosit (Shaperclaus, 1979), Diferensial leukosit (Anderson dan Siwicki, 1995). Pengukuran aktivitas fagositosis (Anderson dan Siwicki, 1995). Pengukuran titer antibodi dengan uji mikrotiter aglutinasi. Patologi klinik darah: hemoglobin (Wedemeyer dan Yasutake, 1977) dan hematokrit (Anderson dan Siwicki, 1995).

### Analisa Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini berupa tingkat kelangsungan hidup relatif, gambaran darah, aktivitas fagositosis, titer antibodi, dan patologi klinik darah dianalisis secara diskriptif dengan membandingkan data antar perlakuan.

### Vaksinasi pada ikan nila

Vaksinasi *S. agalactiae* pada ikan nila, dilakukan dengan menyuntikan vaksin seperti yang disajikan pada Tabel 1.

Masing-masing ikan diinjeksi vaksin sebanyak 0,1 mL/ekor. Ikan dipelihara selama 10 hari, kemudian setiap perlakuan diuji tantang dengan *S. agalactiae* tipe masing-masing pada hari ke 11 setelah vaksinasi. Setelah itu ikan dipelihara hingga hari ke 25. Pengamatan parameter utama dan pendukung diamati pada hari ke 25 setelah vaksinasi.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil fraksinasi protein melalui SDS-PAGE diketahui bahwa ECP bakteri *S. agalactiae* tipe  $\hat{\alpha}$ -hemolitik dan tipe non-hemolitik memiliki protein dengan bobot molekul yang hampir sama yaitu 51,8; 55,8 dan 62,3 kDa. Namun, tidak ditemukan protein 51,8 kDa pada ECP tipe  $\hat{\alpha}$ -hemolitik (Hardi *et al.*, 2011b). Menurut Pasnik *et al.*, (2005b) kandungan protein pada ECP bakteri *S. agalactiae* yang digunakan sebagai vaksin pada ikan berkisar antara 47-75 kDa dan yang lebih dominan adalah protein 54 dan 55 kDa.

### Tingkat Kelangsungan Hidup Relatif (*Relative Percent Survival/RPS*)

Ikan diuji tantang dengan *S. agalactiae* pada hari ke 11 setelah vaksinasi dan diamati adanya gejala streptokokosis (perubahan warna tubuh, *clear operculum*, dan eksophthalmia) yang muncul dan juga kematian yang terjadi selama 14 hari pasca uji tantang. Dari hasil penelitian terlihat bahwa perbedaan jenis vaksin yang diberikan berpengaruh terhadap tingkat kematian yang terjadi. Efikasi vaksin tertinggi dicapai pada saat ikan divaksinasi menggunakan vaksin gabungan (sel utuh dan ECP *S. agalactiae* tipe  $\hat{\alpha}$ -hemolitik) yaitu 92% setelah diuji tantang dengan bakteri tipe  $\hat{\alpha}$ -hemolitik dan hanya 75% saat diuji tantang dengan tipe non-hemolitik. Vaksinasi dengan gabungan antara sel utuh *S. agalactiae* tipe non-

hemolitik dengan ECP  $\hat{a}$ -hemolitik memiliki RPS 87% saat diuji tantang dengan *S. agalactiae* tipe  $\hat{a}$ -hemolitik dan hanya 56% saat diuji tantang dengan tipe non-hemolitik (Tabel 1).

Dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa setelah 14 hari uji tantang, vaksin dengan menggunakan sel utuh mampu mencegah infeksi dari kedua tipe bakteri. Ini menandakan bahwa keseluruhan vaksin dari kedua tipe bakteri mampu meningkatkan respons imun spesifik dan non spesifik.

Ikan yang tidak divaksin (perlakuan 2 dan perlakuan 11) mengalami kematian 100% pada hari ke 14 setelah uji tantang dengan gejala ikan mengalami eksophtalmia, warna tubuh menghitam, *clear operculum* dan beberapa ikan menunjukkan berenang *whirling*. Ikan yang divaksin dengan beberapa jenis vaksin

menunjukkan gejala yang beragam namun umumnya anatomi luar ikan tampak normal.

Vaksinasi menggunakan vaksin yang berasal dari bakteri tipe  $\hat{a}$ -hemolitik terlihat lebih baik untuk mencegah infeksi bakteri dari kedua tipe dibandingkan dengan vaksin dari tipe non-hemolitik, hal ini diduga karena dipengaruhi oleh vaksin dari permukaan sel bakteri. Hasil pengamatan yang dilakukan oleh Hardi *et al.*, (2011a) diketahui bahwa permukaan sel bakteri tipe  $\hat{a}$ -hemolitik (non-kapsul) lebih banyak tersusun atas protein, tidak seperti tipe non-hemolitik (kapsul) yang lebih banyak tersusun atas karbohidrat. Protein lebih bersifat imonogenik dan cepat meningkatkan aktivitas sel-sel imunitas. Menurut Jennings (1992) dan Baker (1993) komponen protein merupakan komponen penting dalam sistem

Tabel 1 Perlakuan pengujian efikasi vaksinasi dan RPS ikan yang divaksin dengan *S. agalactiae* tipe  $\hat{a}$ -hemolitik dan non hemolitik 14 hari pasca uji tantang

Perlakuan	Vaksin Uji tantang	Jumlah Ikan yang Mati	RPS (%)
1 Tidak divaksin	non	1	-
2 Tidak divaksin	$\hat{a}$ -hemolitik	24	-
3 sel utuh $\hat{a}$ -hemolitik	$\hat{a}$ -hemolitik	5	79
4 sel utuh $\hat{a}$ -hemolitik	non-hemolitik	6	75
5 ECP $\hat{a}$ -hemolitik	$\hat{a}$ -hemolitik	9	62.5
6 ECP $\hat{a}$ -hemolitik	non-hemolitik	18	25
7 50 % sel utuh $\hat{a}$ -hemolitik + 50 % ECP $\hat{a}$ -hemolitik	$\hat{a}$ -hemolitik	2	92
8 50 % sel utuh $\hat{a}$ -hemolitik + 50 % ECP $\hat{a}$ -hemolitik	non-hemolitik	6	75
9 50 % sel utuh $\hat{a}$ -hemolitik + 50 % ECP non-hemolitik	$\hat{a}$ -hemolitik	5	79
10 50 % sel utuh $\hat{a}$ -hemolitik + 50 % ECP non-hemolitik	non-hemolitik	14	42
11 Tidak divaksin	non-hemolitik	16	-
12 sel utuh non-hemolitik	$\hat{a}$ -hemolitik	6	62.5
13 sel utuh non-hemolitik	non-hemolitik	4	75
14 ECP non-hemolitik	$\hat{a}$ -hemolitik	22	0
15 ECP non-hemolitik	non-hemolitik	10	37
16 50 % sel utuh non-hemolitik + 50 % ECP non-hemolitik	$\hat{a}$ -hemolitik	7	56
17 50 % sel utuh non-hemolitik + 50 % ECP non-hemolitik	non-hemolitik	8	50
18 50 % sel utuh non-hemolitik + 50 % ECP $\hat{a}$ -hemolitik	$\hat{a}$ -hemolitik	2	87
19 50 % sel utuh non-hemolitik + 50 % ECP $\hat{a}$ -hemolitik	non-hemolitik	7	56

Keterangan perlakuan akan digunakan pada tabel-tabel berikutnya.

imun karena menjadi bahan dasar membentuk immunodominant epitop. Selain itu, protein dengan bobot molekul 55,8 dan 62,3 kDa bersifat imonegenik sedangkan protein 51,8 kDa dalam ECP tipe non hemolitik diduga cenderung bersifat negatif, namun hal ini masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait toksisitas dari protein 51,8 kDa terhadap inang. Hasil penelitian Pasnik *et al.*, (2005b) terlihat bahwa protein 54 dan 55 kDa merupakan protein yang mampu meningkatkan kerja dari sistem imun ikan nila.

**Gambaran Darah Ikan**

**Total leukosit.** Sebagai respons seluler dari pertahanan non spesifik juga mengalami peningkatan pascavaksinasi dengan kedua tipe bakteri *S. agalactiae*. Fungsi sistem kekebalan non-spesifik juga terlibat dalam sistem kekebalan spesifik. Umumnya ikan yang diberi vaksin memiliki total leukosit yang mendekati normal pada hari ke 14 pasca ujiantang. Namun, untuk ikan yang tidak divaksin total leukosit masih ditemukan tinggi, hal ini disebabkan karena tubuh ikan masih berupaya untuk memfagosit antigen (bakteri) dengan cara memproduksi dan mengirimkan lebih banyak sel darah putih ke daerah infeksi. Meskipun

ikan diberi vaksin, namun belum mampu membatu ikan sepenuhnya untuk mengeliminasi patogen yang ada dalam tubuh, ditandai dengan total leukosit yang masih tinggi hingga hari ke 14 (perlakuan 5 dan 14), khususnya adalah ikan-ikan yang diberi vaksin ECP dari tipe  $\hat{a}$ -hemolitik dan non-hemolitik. Vaksin ECP terlihat bersifat spesifik patogen artinya mampu mencegah dengan baik infeksi dari bakteri yang tipenya sejenis dengan tipe vaksin ECP. Vaksin ECP tipe  $\hat{a}$ -hemolitik mampu mencegah infeksi dari infeksi bakteri tipe  $\hat{a}$ -hemolitik sebesar 62.5% dan di akhir pengamatan masih ditemukan adanya peningkatan total leukosit yang menandakan masih berlangsungnya infeksi di dalam tubuh ikan. Begitu pula dengan vaksin ECP non-hemolitik, total leukosit ditemukan lebih tinggi dari kontrol pada ikan yang diuji tantang dengan tipe  $\hat{a}$ -hemolitik dan normal pada ikan yang diuji tantang dengan tipe yang sama dengan bakteri jenis vaksin. Hasil penelitian Sheehan *et al.*, (2009) menunjukkan bahwa ada spesifik respon pada ikan nila yang divaksin dengan sel utuh bakteri *S. agalactiae* dengan tipe bakteri yang menginfeksi. Ikan nila yang divaksin dengan *S. agalactiae* tipe  $\hat{a}$ -hemolitik mampu mencegah infeksi dari tipe  $\hat{a}$ -hemolitik

Tabel 2. Parameter pendukung efikasi vaksinasi dari vaksin  $\hat{a}$ -hemolitik dan non-hemolitik pada hari ke 14 pasca ujiantang.

Perlakuan*	Leukosit 10 <sup>5</sup> sel/mm <sup>3</sup>	Limfo sit (%)	Eritrosit 10 <sup>5</sup> sel/mm <sup>3</sup>	Aktivitas Fagositosis (%)	Anti bodi (-log <sub>2</sub> )	Hematokrit (%)	Hemaglobin g%
1	1,2±0,003	65 ±5	36 ±1	8,7±0,6	0	25,3 ± 0,17	11,67±0,30
2	2,6±0,008	68 ±2	24 ±0	1,3±0,6	0	40,5 ± 0,10	7,70±1,20
3	1,7±0,003	82 ±2	33 ±1	18,0±1,0	3	32,4 ± 0,15	10,00±1,00
4	1,8±0,002	82±1	30 ±3	19,3±0,6	2	30,3 ± 0,11	12,30±1,00
5	2,1±0,003	73±3	27 ±3	11,7±0,6	1	24,4 ± 0,11	10,50±0,00
6	2,2±0,001	67±2	24 ±0	15,3±0,6	0	25,2 ± 1,00	9,30±0,60
7	1,4±0,002	80 ±3	33 ±3	22,3±2,1	5	31,7 ± 0,53	11,30±0,60
8	1,5±0,002	80±4	27 ±0	20,3±1,2	4	33,0 ± 0,35	11,50±0,50
9	1,7±0,004	80±2	33 ±3	24,3±2,1	4	27,4 ± 0,39	12,00±0,00
10	1,7±0,006	72±2	24 ±0	19,3±0,6	3	24,6 ± 1,00	9,70±9,70
11	2,8±0,002	68±3	24±1	14,0±2,0	0	43,3 ± 0,40	8,00±1,00
12	1,3±0,001	79±1	30±2	20,0±1,0	2	32,3 ± 0,30	10,70±0,60
13	1,3±0,001	82±1	33±2	24,0±1,0	2	29,3 ±1,10	11,00±1,00
14	2,3±0,009	73±3	25±0,6	12,0±0,0	0	24,3 ±0,40	7,30±0,60
15	1,8±0,005	67±2	26±2,1	20,0±3,0	1	30,3 ±0,40	8,70±0,60
16	1,6±0,003	81±1	30±2	17,0±0,0	2	29,3 ±0,70	9,30±0,60
17	1,8±0,005	75±1	29±1,2	16,0±1,0	2	29,6 ±1,40	9,00±0,00
18	1,3±0,001	80±3	31±1,5	26,0±0,0	3	28,9 ±1,10	10,3±0,6
19	1,5±0,001	81±1	29±1	17,0±1,0	3	26,3 ±0,30	9,90±0,10

\*Keterangan perlakuan merujuk pada Tabel 1

lebih baik dibandingkan dengan infeksi dari tipe non-hemolitik.

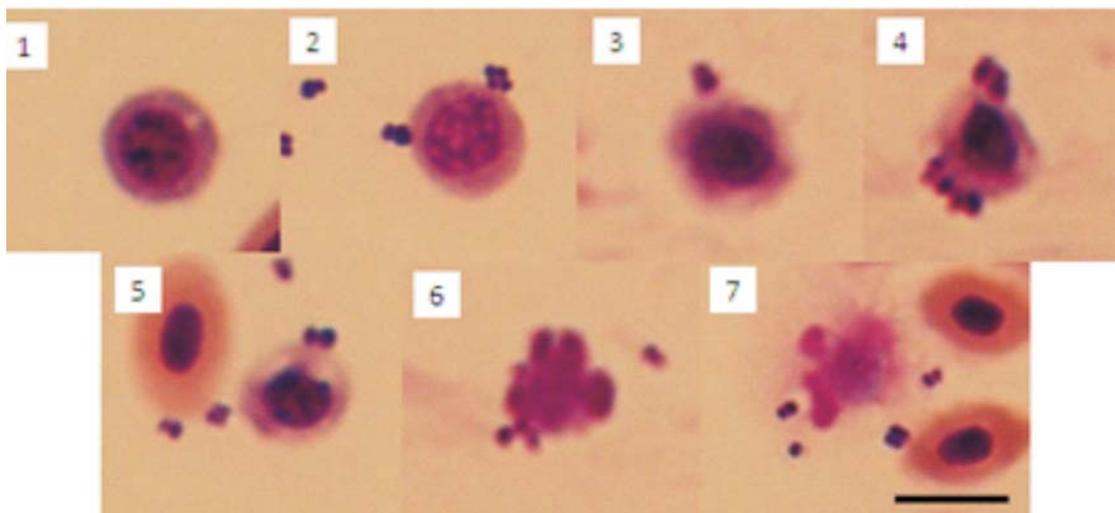
Total leukosit yang tinggi menunjukkan adanya infeksi dalam tubuh ikan. Pada ikan yang divaksin dengan bakteri tipe non hemolitik (perlakuan 12-19) terlihat total leukosit lebih tinggi dari kontrol pada hari ke 14 pasca ujiantang, hal ini menunjukkan bahwa infeksi dari *S. agalactiae* masih ada dalam tubuh ikan.

**Diferensial Leukosit.** Pascavaksinasi sel leukosit mengalami peningkatan jumlah khususnya limfosit. Limfosit berperan sebagai sel memori yang membentuk antibodi. Limfosit ikan nila yang diberi vaksin ditemukan lebih tinggi dari kontrol pada hari ke 14 pasca ujiantang, peningkatan limfosit sejalan dengan adanya peningkatan total leukosit. Berbagai jenis vaksin yang diberikan mampu meningkatkan jumlah sel limfosit, meskipun peningkatannya beragam. Ikan nila yang divaksin dengan jenis bakteri tipe  $\hat{\alpha}$ -hemolitik (perlakuan 3-perlakuan 10) memiliki jumlah limfosit yang lebih tinggi dibandingkan dengan ikan yang divaksin dengan tipe non hemolitik (perlakuan 12 sampai perlakuan 19).

**Total Eritrosit.** Ikan nila yang divaksin memiliki jumlah sel darah merah lebih rendah dari kontrol pada semua perlakuan. Data total eritrosit ini sejalan dengan kadar Hb, penurunan terjadi pada akhir pengamatan (hari ke 14 pasca ujiantang). Kadar Hb berkaitan dengan keseimbangan osmolaritas plasma darah.

Adanya *S. agalactiae* yang diduga mengandung toksin hemolisin memengaruhi kestabilan Hb. Hemolisin ini menyebabkan osmolaritas plasma darah lebih rendah, sel darah merah yang berada dalam plasma darah dengan osmolaritas rendah akan mengalami lisis, hal inilah yang diduga sebagai faktor virulensi pada *S. agalactiae*. Rendahnya kadar Hb menyebabkan laju metabolisme menurun dan energi yang dihasilkan menjadi rendah. Hal ini membuat ikan menjadi lemah dan tidak memiliki nafsu makan serta terlihat diam di dasar atau berenang lemah (Hardi *et al.*, 2011a).

**Aktivitas Fagositosis.** Fagositosis membantu tubuh untuk menghancurkan bakteri penyebab infeksi. Peningkatan aktivitas fagositosis terjadi karena vaksin yang diberikan baik dari sel utuh, ECP, maupun penggabungan dari tipe  $\hat{\alpha}$ -hemolitik ternyata mampu meningkatkan aktivitas sel monosit, neutrofil, dan limfosit (jumlah sel limfosit lebih tinggi dari kontrol) dalam memfagosit patogen (Gambar 1), sedangkan vaksin dari bakteri tipe non-hemolitik belum mampu meningkatkan aktivitas dari fagositosis secara signifikan. Aktivitas fagositosis ini sangat terkait dengan adanya bahan dalam vaksin, vaksin ECP tipe  $\hat{\alpha}$ -hemolitik yang terdiri dari protein dengan bobot molekul 55,8 dan 62,3 kDa dan vaksin sel utuh bakteri yang lebih banyak mengandung protein lebih bersifat imonogenik. Menurut Subowo (1993) protein merupakan



Gambar 1 Proses fagositosis dan penghancuran partikel bakteri pada ikan nila yang divaksinasi *Streptococcus agalactiae* tipe  $\hat{\alpha}$ -hemolitik, 1 bar = 20 $\mu$ m. 1. Sel monosit, 2. pelekatan, 3. Aktivitas membran, 4. permulaan fagositosis, 5 dan 6 penghancuran, 7. Pelepasan dan mengeluarkan hasil fagositosis.

makromolekul yang imunogen yang dapat merangsang limfosit untuk menghasilkan antibodi dan meningkatkan aktivitas fagositosis.

**Titer Antibodi.** Ikan yang divaksin tetap mampu memproduksi antibodi saat dilakukan uji aglutinasi dengan bakteri tipe  $\alpha$ -hemolitik dan non-hemolitik pada hari ke 25 pascavaksinasi atau hari ke 14 pasca ujiantang. Peningkatan titer antibodi ini terkait dengan bahan dari jenis vaksin yang diberikan.

Titer antibodi tertinggi dihasilkan oleh ikan yang divaksinasi oleh vaksin gabungan antara sel utuh dengan ECP bakteri *S. agalactiae* tipe  $\alpha$ -hemolitik. Protein dalam ECP dan dinding bakteri tipe  $\alpha$ -hemolitik yang lebih banyak mengandung protein, mampu meningkatkan produksi antibodi. Menurut Subowo (1993) protein merupakan makromolekul yang imunogenik yang dapat merangsang limfosit untuk menghasilkan antibodi. Protein dengan bobot molekul lebih besar dari 10 kDa biasanya imunogenik. Walaupun demikian, Almendras (2001) menyatakan bahwa hanya daerah-daerah permukaan tertentu dari molekul itu (epitop) yang menentukan spesifisitas reaksi antigen antibodi dan juga sebagai penentu timbulnya respons imun. Protein dengan bobot molekul yang besar diduga mempunyai jumlah epitop yang banyak. Menurut Anderson (1974) antibodi bekerja dengan cara menghalangi efek antigen dengan cara melakukan blokade, yaitu bereaksi dengan epitop antigen sehingga antigen tidak mampu mengenal reseptor sel inang menyebabkan kegagalan proses perlekatan antigen pada permukaan sel inang. Selain itu antibodi membantu mempercepat eliminasi antigen dengan proses opsonisasi (antibodi sebagai *opsonin*). Antigen dalam keadaan teropsonisasi lebih mudah dikenal makrofag dan lebih efektif untuk dihancurkan, sehingga dari hasil penelitian tersebut diperoleh bahwa peningkatan titer antibodi selalu sejalan dengan peningkatan aktivitas fagositosis.

#### Patologi Klinik Darah Ikan

**Hematokrit (He).** Berdasarkan pengamatan, He ditemukan lebih tinggi dari kontrol 14 hari setelah ujiantang pada ikan yang tidak divaksin, hal ini sejalan dengan adanya peningkatan sel darah putih yang menandakan masih adanya infeksi. Namun,

pada ikan yang divaksin umumnya kadar He mendekati normal. Pada ikan yang divaksin dengan vaksin gabungan ECP dan sel utuh tipe  $\alpha$ -hemolitik kadar He mendekati normal hal ini menandakan bahwa tubuh mampu mencegah adanya penyebaran infeksi bakteri *S. agalactiae*.

**Hemoglobin (Hb).** Kadar Hb ikan yang tidak divaksin ditemukan lebih rendah dari kontrol pada akhir pengamatan. Hal ini menunjukkan adanya infeksi dalam tubuh, bahwa bakteri *S. agalactiae* yang menyebabkan Hb turun. Hemolisin yang dihasilkan bakteri menyebabkan osmolaritas plasma darah lebih rendah, inilah yang menyebabkan kadar Hb ikan turun. Kadar Hb ikan yang divaksin terutama dengan vaksin gabungan ECP dan sel utuh mendekati normal yaitu 11-12 g%. Hasil ini sejalan dengan data kematian ikan bahwa ikan yang divaksin dengan vaksin gabungan ECP dan sel utuh mampu mencegah infeksi *S. agalactiae* sebesar 75-92% (Tabel 1).

#### SIMPULAN

Dari hasil penelitian diketahui bahwa kandidat vaksin terbaik yang dapat digunakan untuk mencegah infeksi bakteri *S. agalactiae* dari tipe  $\alpha$ -hemolitik dan non-hemolitik adalah vaksin gabungan ECP dan sel utuh dari tipe  $\alpha$ -hemolitik.

#### SARAN

Agar vaksin ini bisa diproduksi dan diaplikasikan pada budidaya ikan nila perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai durasi proteksi vaksin terhadap efikasi vaksinasi.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar Sempur, Bogor Jawa Barat dan Laboratorium Kesehatan Ikan Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor yang telah membantu dan memfasilitasi penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Akhlaghi M, Munday B, Whittington R. 1996. Comparison of passive and active immunization of fish against streptococcosis (enterococcosis). *Journal of Fish Diseases* 19:251–258.
- Almendras JME. 2001. Immunity and biological methods of disease prevention and control. In: *Health management in aquaculture*. G.D. Liopo, C.R. Lavilla and E.R. Cruz-Lacierda (Eds.). Aquaculture Departement Southeast Asian Fisheries Development Center. Philippines:111-136.
- Anderson DP, Siwicki AK. 1995. Basic hematology and serology for fish health programs. Paper presented in second symposium on diseases in Asian Aquaculture “Aquatic Animal Health and the Environment”. Phuket, Thailand. 25–29<sup>th</sup> October 1993. 17 pp.
- Anderson DP. 1974. *Fish immunology*. Hongkong: TFH Publication Ltd. Pp 182.
- Baker CJ. 1993. Vaccine prevention of group B streptococcal disease. *Journal Pediatric Annals* 22:711–714.
- Baulny MOD, Quentel C, Fournier V, Lamour F, Gouvello RL. 1996. Effect of long-term oral administration of  $\beta$  glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. *Dis Aquat Org* 26:139e47.
- Eldar A, Bejerano Y, Bercovier H. 1994 *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: two new streptococcal species causing meningoencephalitis in fish. *Curr Microbiol*. 28: 139–143.
- Eldar A, Horovitz A, Bercovier H. 1997. Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. *Journal Veterinary Immunology and Immunopathology* 56:175–183.
- Ellis AE. 1988. Optimizing factors for fish vaccination. In: *Fish vaccination*. Ellis AE (Ed). London. Academic Press Ltd. Pp 32-46.
- Evans JJ, Klesius PH, Glibert PM, Shoemaker CA, Al Sarawi MA, Landsberg J, Duremdez R, Al Marzouk A, Al Zenki S. 2002. Characterization of beta-haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* (L.) and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. *Journal of Fish Diseases* 25:505–513.
- Evans JJ, Klesius PH, Shoemaker CA, Fitzpatrick BT. 2004a. *Streptococcus agalactiae* vaccination and infection stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal Application Aquacultur* 16:105–115.
- Evans JJ, Shoemaker CA, Klesius PH. 2004b. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (Group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. *Journal Vaccine* 22:3769–3773.
- Evans JJ, Shoemaker CA, Klesius PH. 2004c. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (Group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. *Journal Vaccine* 22:3769–3773.
- Hardi EH, Sukenda, Haris E, Lusiastuti AM. 2011a. Karakteristik dan Patogenesis *Streptococcus agalactiae* tipe  $\alpha$ -hemolitik dan non-hemolitik pada ikan nila. *Jurnal Veteriner* 12(2) : 152-164.
- Hardi EH, Sukenda, Haris E, Lusiastuti AM. 2011b. Toksisitas produk ekstraselular (ECP) *Streptococcus agalactiae* pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Natur Indonesia*. 13(3) : 187-199.
- Jennings H. (1992) Further approaches for optimizing polysaccharide protein conjugate vaccines for prevention of invasive bacterial disease. *Journal of Infectious Diseases* 165:S156–S159.
- Klesius PH, Shoemaker CA, Evans JJ. 2000. Efficacy of a single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal Aquaculture* 188:237–246.
- Giordano LGP, Müller EE, de Freitas JC, da Silva VG. 2010. Evaluation on the Pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal Brazilian Archives of Biology and Technology* 53(1) : 87-92.
- Pasaribu FH, Dalimunthe N, Poeloengan M. 1990. Pengobatan dan pencegahan penyakit ikan bercak merah. Prosiding Seminar Nasional II Penyakit Ikan dan Udang 16-18 Januari. Badan penelitian dan Pengembangan Pertanian: 143-152.

- Pasnik DJ, Evans JJ, Panangala VS, Klesius PH, Shelby RA, Shoemaker CA. 2005. Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy. *Journal of Fish Diseases* 28:205–212.
- Romalde JL, Silva R, Riaza A, Toranzo AE. 1996. Longlasting protection against turbot streptococcosis obtained with a toxoid-enriched bacterin. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 16: 169–171.
- Rowley AF. 1990. Collection, separation and identification of fish leucocytes. In: Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Roberson BS, van Muiswinkel WB. (Eds.). *Techniques in Fish Immunology*. Fairhaven. SOS Publications. Pp 113–136.
- Shaperclaus W. 1979. *Fish Diseases*. Vol. 1. Berlin. Akademie Verlag. Pp 570.
- Sheehan B, Lauke L, Lee YS, Lim WK, Wong F, Chan J, Komar C, Wendover N, Grisez L. 2009. Streptococcal diseases in farmed tilapia. *Aquaculture Asia Pacific* 5 : 6.
- Souter BW. 1984. *Immunization with vaccines*. Departement of Fish an Ocean. Winnipeg. Manitoba. Pp 111-117.
- Subowo. 1993. *Imunobiologi*. Bandung. Penerbit Angkasa. Pp. 233.
- Wedemeyer GA, Yasutake WT. 1977. Clinical methods for the assessment of the effect on environmental stress on fish health. Technical Papers of the U.S. Fish and Wildlife Service. US Dept. of the Interior. *Fish and Wildlife Service* 89: 1–17.