

## **Benih Keturunan Induk Ikan Nila yang Divaksinasi pada Tingkat Kematangan Gonad-2 Lebih Tahan Terhadap Infeksi *Streptococcus agalactiae***

*(RESISTANCE OF TILAPIA (OREOCHROMIS NILOTICUS) FRY  
VACCINATED AT DIFFERENT GONADAL DEVELOPMENTAL STAGES  
TOWARD STREPTOCOCCUS AGALACTIAE INFECTION)*

**Khairun Nisaa<sup>1</sup>, Sukenda<sup>2\*</sup>, Muhammad Zairin Junior<sup>3</sup>,  
Angela Mariana Lusiasuti<sup>4</sup>, Sri Nuryati<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Mahasiswa Program Pascasarjana Ilmu Akuakultur,

<sup>2</sup>Laboratorium Kesehatan Organisma Akuatik,

<sup>3</sup>Laboratorium Pengembangbiakan dan Genetika Ikan,  
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor,  
Jl. Agathis Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680.

<sup>4</sup>Instalasi Litbang Pengendalian Penyakit Ikan,  
Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar,  
Bogor, Jawa Barat, Indoensia  
Email: [sukenda67@gmail.com](mailto:sukenda67@gmail.com).

### **ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efektivitas vaksinasi berdasarkan tingkat kematangan gonad (TKG) yang berbeda pada induk betina dan menyebabkan transfer imunitas ke benih yang dihasilkan. Vaksinasi induk betina dilakukan pada TKG-2 dan TKG-3 menggunakan gabungan vaksin sel utuh dan *extracellular product* (ECP) dengan konsentrasi vaksin adalah  $10^9$  CFU/mL sebanyak 0,4 mL/kg ikan. Kontrol adalah induk ikan yang tidak diberi vaksin. Benih umur 7, 14, 21, dan 28 hari setelah menetas dari induk yang divaksin dan kontrol selanjutnya diuji tantang melalui perendaman dengan konsentrasi  $10^7$  CFU/mL selama 30 menit menggunakan bakteri *Streptococcus agalactiae*. Parameter yang dievaluasi yaitu titer antibodi induk, telur, dan benih, dan *Relative Percent Survival* (RPS) benih dari masing-masing perlakuan. Perlakuan vaksin yang diberikan pada TKG-2 memberikan hasil titer antibodi yang signifikan lebih baik pada serum induk yaitu  $0,166 \pm 0,001$ ; telur ( $0,165 \pm 0,003$ ), dan benih umur 7, 14, 21, dan 28 hari pascapenetasan yaitu berturut-turut  $0,164 \pm 0,002$ ;  $0,162 \pm 0,006$ ;  $0,155 \pm 0,006$ ; dan  $0,14 \pm 0,008$  dibandingkan dengan perlakuan lainnya ( $P < 0,05$ ). Uji tantang benih dengan bakteri *S. agalactiae* umur 7, 14, 21, dan 28 hari didapatkan RPS tertinggi pada perlakuan penyuntikan vaksin TKG-2 berturut-turut sebesar 95,24%; 83,33%; 72,22%; dan 56,02%. Pemberian vaksin pada induk ikan nila TKG-2 dapat menyebabkan transfer kekebalan maternal dan memberikan ketahanan benih yang lebih baik melawan infeksi *S. agalactiae*.

Kata-kata kunci: ikan nila; *Streptococcus agalactiae*; tingkat kematangan gonad; vaksin; transfer imunitas

### **ABSTRACT**

The aim of this study was to evaluate the effectiveness of vaccination based on gonad maturation stages on tilapia brood stocks in which the released antibodies was able to be transferred to the seed. Vaccine composed with whole cells and extracellular product (ECP) was injected at stage 2 and stage 3 of the gonad development stages at concentration of  $10^9$  CFU mL<sup>-1</sup> as much as 4 mL to 1 kg of brood fish. Control fish was unvaccinated treatment. Challenge study at seed was conducted by immersing *S. agalactiae* for 30 minutes at 7, 14, 21, and 28 days post hatching (DPH) in  $10^7$  CFU/mL. Antibody levels on brood stocks, eggs, and body fluids of seed, and relative percentage survival (RPS) of seed post challenge study were evaluated. The results showed that stage 2 of gonad developmental stages was found on 7 days post initial spawning and stage 3 found on 14 days post initial spawning of brood fish. Vaccinated done in stage

2 of gonad developmental stages gave immunoglobulin serum in brood (0,166±0,001), egg (0,165±0,002), and seed aged 7, 14, 21, and 28 days post hatching (0,164±0,002, 0,162±0,005, 0,155±0,006, and 0,14±0,008 respectively) were significantly higher ( $P<0,05$ ) compared to other treatment. Challenged test that done by immersing with *S. agalactiae* suspension on larval aged 7, 14, 21, and 28 days had highest RPS (95,24%, 83,33%, 72,22%, and 56,02% respectively) formed on seed from brood stock vaccination in gonad development stage 2. Vaccination in tilapia brood stocks at stage 2 of gonad developmental stages gave highest protection by maternal immunity to the seed against *S. agalactiae*.

Keywords: tilapia; *Streptococcus agalactiae*; gonad developmental stage; vaccine, maternal immunity.

## PENDAHULUAN

Bakteri *Streptococcus agalactiae* termasuk Gram positif dan mempunyai bagian yang bersifat virulen adalah eksotoksin dari *extracellular product/ECP* (Pasnik *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2003). Menurut Evans *et al.* (2006), penularan *Streptococcosis* dapat terjadi melalui persinggungan dengan ikan sakit. Gejala yang ditimbulkan tergantung pada tingkat serangan, yaitu kronis atau akut. Pada tingkat kronis, gejala yang nampak yaitu adanya memar seperti luka di permukaan tubuh, bercak merah pada sirip, berenang lambat dan lebih sering berada di dasar akuarium, juga menyebabkan nafsu makan menurun. Gejala lain yang sering muncul adalah mata menonjol (*exophthalmia*) dan berenang memutar (*whirling*). Pengamatan histopatologi menunjukkan adanya hipertrofi dan gejala nekrosis pada jaringan atau organ seperti pada ginjal. Nekrosis yang terjadi pada kapsula Bowman diduga sebagai akibat dari toksin yang dikeluarkan oleh bakteri. Kerusakan jaringan juga terjadi pada otak yang ditemukan adanya perdarahan pada bagian telensefalon dan serebelum (Hardi, 2011).

Sheehan *et al.* (2009) mengelompokkan bakteri *S. agalactiae* dalam dua tipe yaitu tipe-1 (α-hemolitik) dan tipe-2 (non-hemolitik). Bakteri tipe-1 tumbuh baik pada suhu inkubasi 37°C dan mampu menghidrolisis gula lebih banyak, sedangkan tipe-2 memiliki sifat yang bertolak belakang dengan tipe-1, yaitu tumbuh relatif lebih lambat pada suhu inkubasi 37°C dan hanya gula tertentu yang mampu dihidrolisis. Selain itu, penyebaran bakteri tipe-2 bersifat lebih luas dan ditemukan di beberapa wilayah di Asia seperti Cina, Vietnam, Filipina, dan Indonesia. Di Indonesia kedua tipe bakteri tersebut ditemukan pada setiap ada wabah *Streptococcosis* pada budidaya ikan nila (Lusiastuti *et al.*, 2010a).

Upaya pencegahan melalui vaksinasi terhadap penyakit *Streptococcosis* telah

dilakukan beberapa peneliti sebelumnya dan menunjukkan hasil proteksi yang cukup baik. Vaksin yang berkembang saat ini adalah vaksin sel utuh dan produk ekstraseluler (ECP), dan telah terbukti berhasil meningkatkan kekebalan tubuh ikan nila terhadap penyakit *Streptococcosis* (Evans *et al.*, 2004a; Evans *et al.*, 2004b; Pasnik *et al.*, 2005; Sugiani *et al.*, 2012; Amrullah *et al.*, 2014). Lebih lanjut, Hardi *et al.* (2013) berhasil membuktikan bahwa vaksin dari kombinasi protein sel utuh dan ECP bakteri *S. agalactiae* isolat N<sub>14</sub>G yang diaplikasikan pada ikan nila memberikan proteksi sebesar 79% pada infeksi dari *S. agalactiae* isolat N<sub>14</sub>G dan 42% pada infeksi isolat NK<sub>1</sub>.

Aspek yang memengaruhi keberhasilan dari budidaya ikan nila salah satunya adalah kualitas benih ikan nila yang ditebar. Hal ini erat hubungannya dengan kualitas induk ikan. Menurut Swain dan Nayak (2009), kesehatan dan status sistem imun induk ikan sangat penting bukan hanya pada saat pemijahan tetapi juga untuk kesehatan larva yang dihasilkan. Hal tersebut penting karena pada fase awal pertumbuhan, kemampuan embrio dan larva ikan masih terbatas atau belum mampu mensintesis antibodi spesifik. Setelah beberapa minggu menetas, tergantung dari spesiesnya, adanya imun yang diturunkan oleh induk ke anak menjadi esensial pada fase awal pertumbuhan larva. Sistem imun spesifik pada induk ikan mampu dirangsang pembentukannya melalui pemberian vaksin. Hanif *et al.* (2004), melaporkan bahwa imunisasi induk *sea bream (Sparus auratus L.)* menggunakan vaksin *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* SK7 (*Phdp*) mampu meningkatkan secara signifikan aktivitas antiprotease, lisosim dan level total imunoglobulin yang terdeteksi pada telur dari induk yang diimunisasi. Selain itu, titer antibodi terhadap *Phdp* terdeteksi hanya pada telur dari induk yang diimunisasi. Benih dari induk yang diimunisasi juga menunjukkan level antibodi humoral spesifik dan non-spesifik yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol.

Transfer kekebalan maternal pada induk ikan merupakan teknik alternatif dalam upaya mengantisipasi tingginya angka kematian benih ikan pada umur kurang dari satu bulan. Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini bertujuan melakukan kajian efektivitas pemberian vaksin berdasarkan tingkat kematangan gonad yang berbeda pada induk betina ikan nila. Harapan ke depan, hasil dari penelitian ini mampu mendukung keberhasilan produksi benih ikan nila yang berkualitas.

## METODE PENELITIAN

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

Penelitian ini terdiri atas dua tahap kegiatan. Tahap pertama bertujuan untuk menentukan waktu vaksinasi berdasarkan tingkat kematangan gonad induk ikan betina. Induk ikan nila betina yang digunakan memiliki bobot 266,44 g, sedangkan tahap kedua (uji efikasi vaksinasi induk terhadap kualitas benih yang dihasilkan), menggunakan benih berdasarkan umur yaitu 7, 14, 21, dan 28 hari pascatetas. Pada proses adaptasi dan pemeliharaan, calon induk dipelihara dalam bak beton berukuran 2 x 2 x 1 m dan dipisahkan antara jantan dan betina mengikuti SNI 7550: 2009 Produksi Ikan Nila (*Oreochromis niloticus* Bleeker) Kelas Pembesaran di Kolam Air Tenang.

Setelah siap memijah, ikan dipindahkan kedalam bak beton lain yang diberi sekat jaring berbentuk kotak (hapa) berukuran 1 x 1 x 1 m dengan rasio jantan betina 1 : 2 yang diberi aerasi. Selama masa pemeliharaan, ikan diberi pakan komersial dengan kandungan protein sekitar 32% dua kali sehari.

Isolat yang digunakan adalah bakteri *S. agalactiae*-N<sub>14</sub>G dari Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar Bogor. Sebelum digunakan, bakteri ditingkatkan patogenesisnya melalui prosedur Koch's Postulate terhadap populasi ikan nila. Reisolasi dilakukan terhadap individu ikan uji yang menunjukkan gejala klinis, selanjutnya isolasi bakteri tersebut direkarakterisasi menggunakan API 20 STREP System.

### Pembuatan Vaksin

Bakteri dibiakan 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.

Proses pembuatan vaksin berdasarkan metode Hardi *et al.* (2013). Vaksin sel utuh dibuat dengan cara suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 g selama 30 menit, sehingga membuat *pellet* dan supernatan terpisah. *Pellet* dicuci dua kali dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS), dan terakhir ditambahkan PBS sebanyak volume awal biakan bakteri. Sampel vaksin ditanam pada media BHI agar, jika tidak ada bakteri yang tumbuh dalam waktu 72 jam, vaksin aman untuk digunakan.

Vaksin ECP dibuat dengan cara supernatan disaring dengan filter saring 0,22 µm (membran solution MS® CA syringe filter). Vaksin yang digunakan adalah kombinasi 50% sel utuh dan 50% ECP (v/v).

### Penentuan Waktu Vaksinasi Induk Betina Berdasarkan Tingkat Kematangan Gonad

Penentuan TKG induk betina didasarkan pada deskripsi yang dijelaskan oleh Suwa dan Yamashita (2007); McMillan (2007); dan Núñez dan Duponchelle (2009). Induk ditempatkan secara individu dalam akuarium berukuran 60x35x40 cm. Setiap individu dicatat waktu memijahnya. *Sampling* gonad dimulai sesaat setelah induk betina memijah, selanjutnya dilakukan setiap tujuh hari hingga induk betina memijah kembali. Pengamatan perkembangan gonad secara makroskopik dilakukan langsung di lapangan dengan menggunakan sampel segar, dan selanjutnya sampel gonad diletakkan dalam larutan *Neutral Buffer Formalin* (NBF) 10% untuk pembuatan preparat histologi. Kegiatan ini dilakukan dengan tiga kali ulangan. Konfirmasi dilakukan kembali dengan melakukan *stripping* untuk melihat perkembangan telur dalam gonad sebelum melakukan penyuntikan vaksin pada induk.

### Vaksinasi

Perlakuan dibagi menjadi tiga kelompok yaitu kelompok kontrol atau tanpa vaksinasi, kelompok induk yang divaksin pada TKG-2, dan kelompok induk yang divaksin pada TKG-3. Penentuan waktu vaksinasi induk berdasarkan TKG merujuk pada hasil tahap pertama penelitian ini, yaitu TKG-2 adalah tujuh hari pascapemijahan sebelumnya dan TKG-3 adalah 14 hari pascapemijahan sebelumnya. Vaksinasi induk menggunakan vaksin gabungan sel utuh dan ECP dengan konsentrasi 10<sup>9</sup> CFU/mL yang

diinjeksikan secara intra-peritoneal (IP) sebanyak 0,4 mL/kg induk betina ikan nila.

### **Preparasi Antibodi Sampel Serum dari Induk, Telur dan Benih**

Darah dari induk dikumpulkan melalui vena caudalis yang berada di pangkal sirip ekor sebelum divaksin dan 15 hari pascavaksinasi. Darah disimpan dalam suhu ruang selama 1-2 jam dan selanjutnya disimpan semalam pada suhu 4°C. Serum dikumpulkan setelah disentrifugasi pada 5000 g selama 10 menit, sampel dipisahkan dalam beberapa wadah penyimpanan dan disimpan pada suhu minus 20°C.

Telur dikumpulkan sesaat setelah pemijahan. Benih dikumpulkan pada hari ke-7 pascatetas, dan dilanjutkan setiap tujuh hari hingga benih berusia 28 hari. Telur dan benih yang terkumpul dibilas sebanyak tiga kali ulangan menggunakan PBS steril pH 7,2, selanjutnya dihomogenkan dalam larutan PBS-T (*Phosphate-Buffer Saline* plus 0,05% Tween-20) sebanyak empat kali volume dan disentrifugasi pada 5000 g selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dikumpulkan, kemudian dilakukan sentrifugasi dua kali pada 5000 g selama lima menit dan selanjutnya disimpan pada suhu minus 20°C.

### **Pembuatan Antiserum Ikan Nila**

Pembuatan antibodi kelinci antinila berdasarkan metode Swain *et al.* (2007). Serum diambil sebanyak 10-15 mL dari ikan nila sehat berbobot 250-300 g. Serum tersebut kemudian ditambahkan larutan amonium sulfat jenuh setetes demi setetes dalam suhu 4°C (*on ice*) menggunakan konsentrasi hasil hitung dari kalkulator amonium sulfat (EnCor Biotechnology Inc. 2014), diaduk semalam menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu 4 °C. Dilakukan sentrifugasi dengan 10000 g pada suhu 4°C 10 selama menit. Presipitat (endapan) dilarutkan dalam 5 mL karbonat-bikarbonat bufer (pH 9,6). Dilakukan sentrifugasi kembali dengan 10000 g pada suhu 4°C selama 10 menit. *Pellet* lalu dikumpulkan dan dibuat volume 2 mL dengan buffer karbonat-bikarbonat bufer (pH 9,6). Larutan globulin tersebut didialisis menggunakan membran dialisis dalam PBS (pH 7,2) selama 72 jam pada suhu 4°C. Untuk menguji amonium sulfat yang tersisa dalam proses dialisis, dapat menggunakan larutan 10% barium dichloride (BaCl<sub>2</sub>), jika masih terdapat endapan berarti masih terdapat amonium sulfat

sehingga proses dialisis perlu dilanjutkan kembali sampai bebas dari amonium sulfat. Globulin murni yang telah diperoleh kemudian dikumpulkan dalam tabung steril dan disimpan pada suhu minus 20°C.

Produksi globulin antinila dilakukan pada kelinci (*New Zealand White Bred*) berdasarkan metode Lund *et al.* (1991). Serum yang dipanen selanjutnya dimurnikan seperti tahapan sebelumnya. Untuk penyimpanan dalam waktu yang lama, antibodi kelinci antinila disimpan pada suhu minus 40°C.

### **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

Serum ikan sampel diuji antibodinya menggunakan metode *indirect* ELISA berdasarkan Shelby *et al.* (2002); Hanif *et al.* (2004); dan Pasnik *et al.* (2006); dengan beberapa modifikasi. Antigen sebanyak 100 µL dimasukkan pada mikrotiter, ditambahkan 100 µL buffer carbonate-bicarbonate (pH 9,6) pada setiap sumur mikrotiter, diinkubasi pada suhu 4°C selama 24 jam. Mikrotiter dicuci dengan menggunakan PBS-T (PBS pH 7,4 + 0,05% Tween-20). *Bovine Serum Albumin* (BSA, Sigma) 3% dalam H<sub>2</sub>O w/v ditambahkan sebanyak 100 µL dan disimpan pada suhu 25°C selama satu jam. Sampel serum nila diencerkan 1:50 pada PBS-T untuk serum induk, dan 1:4 untuk telur dan larva. Sampel nila yang telah diencerkan ditambahkan ke dalam mikrotiter 100 µL dengan tiga kali ulangan. *Plate* diinkubasi pada suhu 25°C selama satu jam. Imunoglobulin (Ig) antinila diencerkan 1:200 pada PBS-T dan 100 µL ditambahkan ke setiap sumur mikrotiter. *Plate* diinkubasi pada suhu 25°C selama satu jam. *Peroxidase-conjugated rabbit anti rabbit* (Sigma) diencerkan menjadi 1:5000 pada PBS-T dan 100 µL ditambahkan pada setiap sumur mikrotiter. *Plate* diinkubasi pada suhu 25°C selama satu jam. *One-Step Ultra TMB-ELISA* (Sigma) (TMB 5 mg + 10 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 38% dalam 5 mL asetat buffer pH 5) sebanyak 100 µL ditambahkan pada setiap sumur mikrotiter. Setelah 20 menit, reaksi ELISA dihentikan dengan menambahkan 50 µL 3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Pengamatan *optical density* (OD) dilakukan pada *absorbance* 405 nm. Untuk *blanko*, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ditambahkan sebanyak 100 µL kedalam sumur pertama dari mikrotiter dan didiamkan selama 20 menit, kemudian ditambahkan 100 µL substrat TBM-ELISA. Jumlah antibodi spesifik dinyatakan dalam nilai OD.

### **Relative Percent Survival (RPS)**

Pengukuran tingkat kelangsungan hidup (*Relative Percent Survival/RPS*) dilakukan terhadap benih yang dihasilkan dari induk yang diberi vaksin sebelumnya. Ujiantang dilakukan pada benih berumur 7, 14, 21, dan 28 hari setelah menetas masing-masing sebanyak 30 ekor dengan dua ulangan. Konsentrasi bakteri yang digunakan pada ujiantang adalah sesuai dengan hasil penentuan LD50 (penelitian pendahuluan) pada benih ikan nila yaitu  $10^7$  CFU/mL. Ikan direndam dalam larutan bakteri selama 30 menit, selanjutnya mortalitas diamati tujuh hari pascaujiantang. Penghitungan RPS selama penelitian dilakukan dengan menggunakan rumus Ellis (1988):  $RPS = 1 - (\% \text{ mortalitas ikan divaksin}) \times (\% \text{ mortalitas ikan kontrol})^{-1} \times 100\%$

### **Analisa Data**

Data yang diperoleh dalam penelitian ini berupa kelangsungan hidup relatif (RPS), persentase mortalitas, dan titer antibody, dianalisis menggunakan program statistika dan dilanjutkan dengan uji Tukey. Data tingkat perkembangan gonad dan patologi klinik dianalisis secara deskriptif.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Penentuan Waktu Vaksinasi Induk Berdasarkan Tingkat Kematangan Gonad**

Berdasarkan hasil pengamatan, diketahui bahwa waktu yang dibutuhkan untuk mencapai tahap TKG-2 adalah sekitar tujuh hari pascapemijahan awal. Sementara itu, untuk mencapai tahap TKG-3 induk betina membutuhkan waktu sekitar 14 hari pascapemijahan awal.

Pada pengamatan secara makroskopik (Gambar 1), oosit dalam gonad TKG-2 memiliki warna hijau kekuningan dengan tekstur cangkang oosit agak lunak sehingga pada saat dilakukan *stripping*, ditemukan beberapa butir yang pecah. Secara mikroskopik berdasarkan hasil pengamatan histologi, oosit yang umumnya dijumpai adalah yang memiliki *germinal vesicle* (nucleus) berada di tengah oosit. Komposisi lemak masih mendominasi dalam oosit menandakan oosit dalam fase awal vitelogenesis. Menurut Núñez dan Duponchelle (2009), TKG-2 mengindikasikan permulaan vitelogenesis dan mudah dibedakan dari TKG-1 melalui keberadaan *lipid droplet* dan *yolk*

*granule* kadang sulit untuk ditemukan pada tahap ini. Ditambahkan lagi bahwa TKG-2 umumnya diidentifikasi melalui keberadaan bintik kuning atau putih kecil tergantung dari spesies ikan.

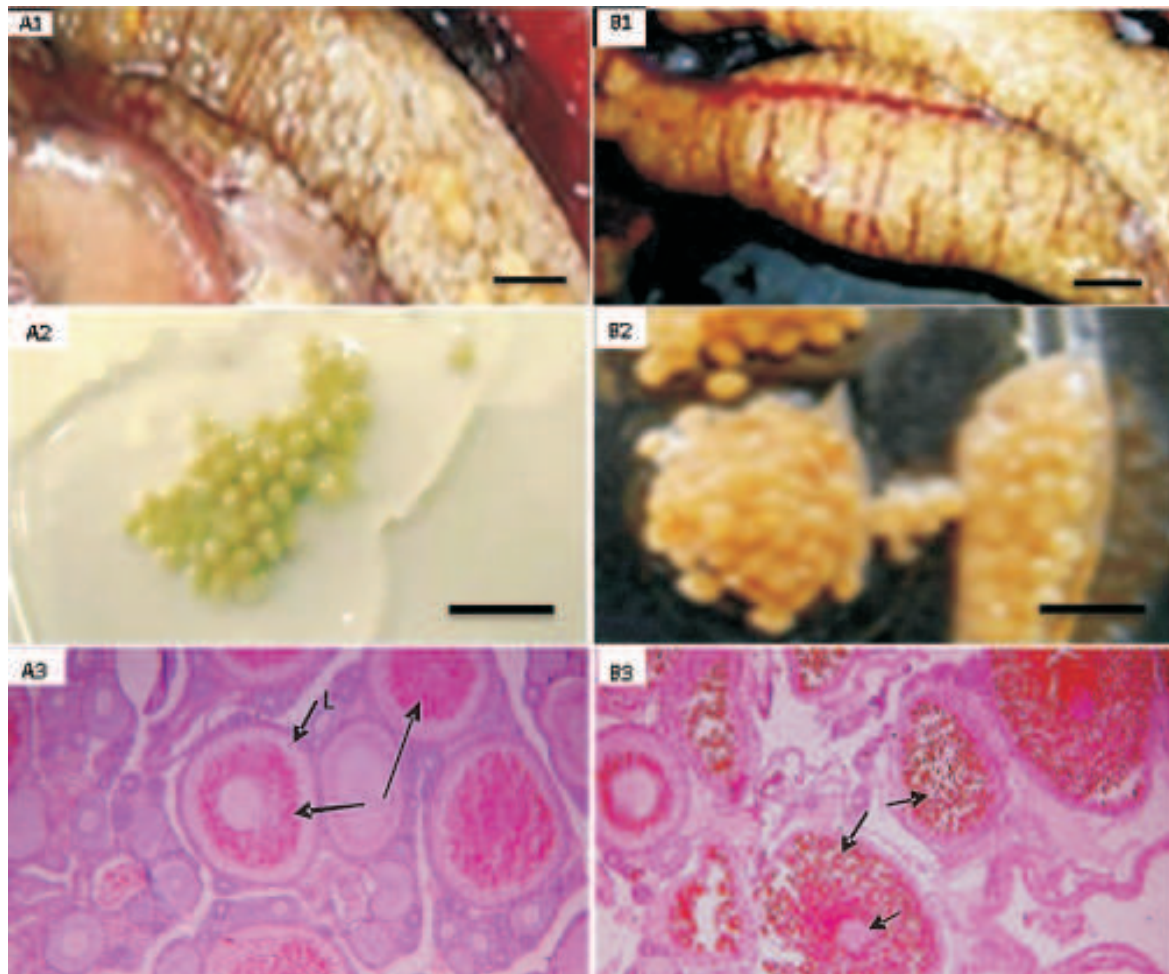
Pada TKG-3, oosit gonad berwarna agak kekuningan dan cangkang oosit lebih kokoh sehingga pada saat dilakukan *stripping*, jumlah oosit yang pecah tidak sebanyak pada TKG-2. Pada pengamatan histologi, TKG-3 memiliki ciri-ciri akumulasi *yolk* atau kuning telur mulai tampak dan *germinal vesicle* pada tahap ini masih berada di tengah oosit menandakan proses vitelogenesis sedang berlangsung. Menurut Suwa dan Yamashita (2007), *germinal vesicle* (GV) atau nukleus oosit umumnya berlokasi di tengah oosit. Akibat pengaruh hormon, GV pada proses maturasi akan bermigrasi ke arah kutub atau pinggir oosit tempat *germinal vesicle breakdown* (GVBD) berlokasi. Keberadaan GVBD seringkali dijadikan sebagai tanda dari perkembangan maturasi oosit.

### **Total Level Immunoglobulin Serum, Telur, dan Benih**

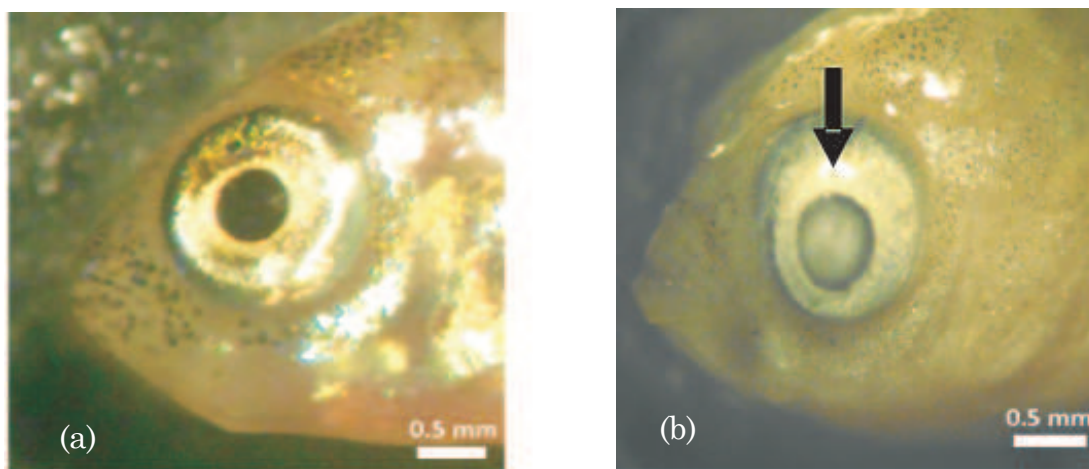
Nilai absorbansi imunoglobulin tertinggi diperoleh pada serum induk yang divaksin pada saat TKG-2 yaitu  $0,166 \pm 0,001$ , dan nilai ini secara signifikan ( $P < 0,05$ ) lebih tinggi dari perlakuan vaksinasi induk pada TKG-3 dan tanpa vaksinasi. Hal yang serupa juga ditemukan pada telur dan benih. Nilai absorbansi imunoglobulin tertinggi ditemukan pada telur ( $0,165 \pm 0,002$ ) dan benih umur 7, 14, 21, dan 28 hari pascatetas yang berasal dari induk yang divaksin pada saat TKG-2 yaitu berturut-turut  $0,164 \pm 0,002$ ;  $0,162 \pm 0,005$ ;  $0,155 \pm 0,006$ ; dan  $0,14 \pm 0,008$ .

Pada benih, nilai absorbansi antibodi spesifik mengalami penurunan hingga akhir pengamatan. Nilai absorbansi terendah ditemukan pada benih umur 28 hari pascapemijahan (Gambar 2). Hal serupa juga dilaporkan Lusastuti dan Hadie (2010), bahwa vaksinasi *Aeromonas hydrophila* pada induk ikan patin dengan ajuvan komplit pada TKG-2 memberikan imun turunan bawaan pada larva hingga umur tiga minggu. Titer antibodi menurun pada minggu ke empat. Vaksinasi tersebut mampu meningkatkan sintasan benih 60–70 % dengan ukuran lebih seragam.

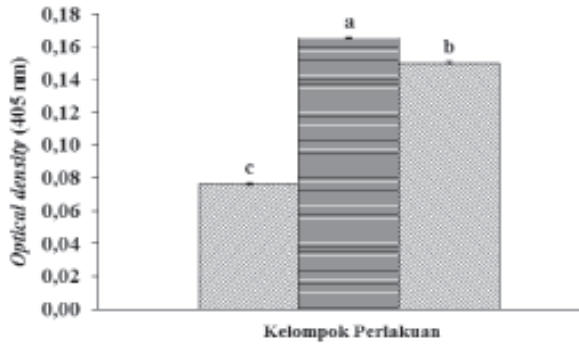
Penelitian ini telah berhasil menunjukkan bahwa dengan melakukan vaksinasi pada induk ikan dengan menggunakan vaksin kombinasi



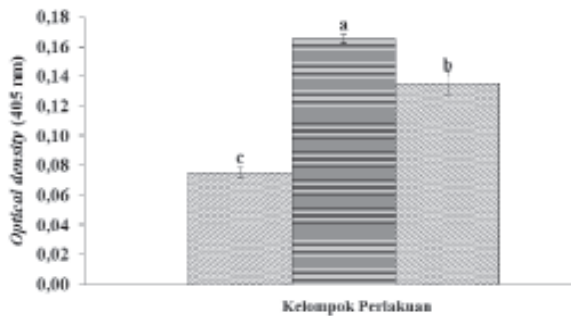
Gambar 1. Perkembangan gonad induk betina ikan nila pada Tingkat Kematangan Gonad (TKG)-2 dan TKG-3, (A1) Gonad induk betina TKG-2; (A2) oosit induk betina TKG-2; (A3) histologi gonad induk betina TKG-2, *lipid droplet* (L) tampak dominan dibanding *yolk* (Y) dalam oosit (100 kali); (B1) Gonad induk betina TKG-3; (B2) oosit induk betina TKG-3; (B3) histologi gonad induk betina TKG-3, *yolk* (Y) dominan dalam oosit dan *germinal vesicle* (GV) berada di tengah oosit (100 kali) (skala bar: 0,5 cm)



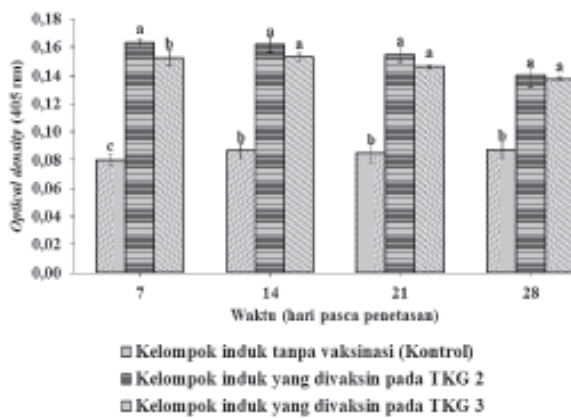
Gambar 3. Perubahan mata benih ikan nila (*Oreochromis niloticus*) setelah diuji tantang dengan bakteri *Strepto-coccus agalactiae*-N<sub>14</sub>G; (a) mata normal; (b) mata keruh (panah).



(a)



(b)



(c)

Gambar 2. Optical Density (OD)-ELISA titer antibodi setelah vaksinasi induk ikan nila (rata-rata dan standar deviasi). Keterangan : (a) Pada induk, (b) Pada telur, (c) Pada benih

ECP dan sel utuh dari bakteri *S. agalactiae* mampu meningkatkan konsentrasi imunoglobulin (IgM) dalam telur dan benih yang dihasilkannya sebagai imunitas turunan. Peneliti lain sebelumnya juga telah berhasil membuktikan bahwa melalui vaksinasi induk, beberapa spesies ikan mampu memberikan

imunitas turunan kepada anaknya seperti pada tilapia (*Oreochromis mosambicus*) (Takemura dan Tanaka, 1997), ikan nila (*Oreochromis niloticus*) (Nur *et al.*, 2004), dan sea bream (*Sparus aurata*) (Hanif *et al.*, 2005).

Nilai absorbansi imunoglobulin tertinggi ditemukan pada induk yang divaksin pada TKG-2. Hal serupa juga ditemukan pada telur dan benih yang dihasilkannya. Hal tersebut menunjukkan bahwa dengan pemberian vaksinasi pada saat TKG-2 memberi peluang yang lebih lama terhadap imunoglobulin sebagai *respons* dari vaksinasi pada induk untuk ikut masuk bersama vitelogenin ke dalam telur selama proses vitelogenesis. Pada TKG-2, gonad mengalami proses awal vitelogenesis. Menurut Swain dan Nayak (2009) proses vitelogenesis mencakup lokalisasi dari protein serum spesifik mendekati lapisan sel *theca*. Protein tersebut setelah melalui saluran mencapai dinding oosit dan selanjutnya bergabung ke dalam ooplasma melalui reseptor spesifik. Oleh karenanya dianggap bahwa IgM kemungkinan bergabung ke dalam oosit bersamaan dengan vitelogenin (VTG). Konsep ini utamanya didasarkan pada pembatasan IgM ke ovarium matang dan konsentrasinya yang meningkat dalam oosit selama vitelogenesis. Tetapi, keberadaan IgM dalam ooplasma dari awal oosit vitelogenetik tampak sebelum masuknya VTG ditemukan seperti pada ikan seperti *sea bass* (Swain dan Nayak, 2009).

**Tingkat Mortalitas dan *Relative Percent Survival* (RPS) Benih Ikan Nila Pascauji Tantang**

Proteksi imunoglobulin sebagai *respons* dari vaksin terhadap benih yang diuji tantang disajikan dalam Tabel 1. Persentase mortalitas tertinggi diperoleh pada benih kontrol pascauji tantang hingga akhir pengamatan. Berdasarkan hasil uji statistika, diketahui bahwa nilai tersebut secara signifikan berbeda dengan benih yang berasal dari induk yang divaksin pada TKG-2 dan TKG-3. Persentase terendah diperoleh pada benih yang berasal dari induk yang divaksin pada TKG-2. Hal tersebut menunjukkan bahwa perlakuan vaksinasi induk TKG-2 mampu memberikan proteksi sebagai kekebalan bawaan pada benih yang lebih baik dibandingkan dengan perlakuan lain.

Nilai RPS seperti disajikan pada Tabel 1, pada hari ke-7, 14, dan 21 perlakuan vaksin pada saat TKG-2 dan TKG-3 tidak berbeda signifikan ( $P < 0.05$ ). Namun, berbeda pada hari ke-28.

Tabel 1. Tingkat mortalitas dan *relative percent survival* (RPS) benih ikan pascauji tantang dengan bakteri *Streptococcus agalactiae*-N<sub>14</sub>G

| Umur benih (hari) | Mortalitas (%)          |                         |                          | RPS(%)                  |                         |
|-------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                   | Kontrol                 | TKG 2                   | TKG 3                    | TKG 2                   | TKG 3                   |
| 7                 | 73,33±5,77 <sup>a</sup> | 3,33±5,77 <sup>b</sup>  | 6,67±5,77 <sup>b</sup>   | 95,24±8,25 <sup>a</sup> | 91,07±7,78 <sup>a</sup> |
| 14                | 80,00±0,00 <sup>a</sup> | 13,33±5,77 <sup>b</sup> | 20,00±10,00 <sup>b</sup> | 83,33±7,22 <sup>a</sup> | 75,00±7,78 <sup>a</sup> |
| 21                | 83,33±5,77 <sup>a</sup> | 23,33±5,77 <sup>b</sup> | 30,00±10,00 <sup>b</sup> | 72,22±4,81 <sup>a</sup> | 64,35±9,85 <sup>a</sup> |
| 28                | 83,33±5,77 <sup>a</sup> | 36,67±5,77 <sup>c</sup> | 46,67±5,77 <sup>b</sup>  | 56,02±6,26 <sup>a</sup> | 43,98±6,26 <sup>b</sup> |

Keterangan : Angka pada kolom yang sama, kemudian diikuti oleh huruf kecil yang berbeda menerangkan perbedaan nyata taraf 95% melalui uji *Tukey* antar perlakuan per waktu pengamatan TKG-2 = benih dari induk betina ikan nila yang divaksin pada tingkat kematangan gonad 2 (tujuh hari pasca pemijahan sebelumnya) TKG-3 = benih dari induk betina ikan nila yang divaksin pada tingkat kematangan gonad 3(14 hari pasca pemijahan sebelumnya)

Perlakuan vaksin TKG-2 memiliki nilai RPS lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) berturut-turut 95,24%; 83,33%; 72,22%; dan 56,02%. Berdasarkan data tersebut, mengindikasikan bahwa level antibodi dalam tubuh benih semakin berkurang dengan bertambahnya umur benih. Selain itu, vaksinasi induk pada TKG-2 mampu memberi proteksi benih terhadap infeksi *S. agalactiae* hingga hari ke-28 pascatetas. Hasil ini sesuai dengan pengukuran absorbansi imunoglobulin pada benih.

Hingga akhir pengamatan, benih yang berasal dari induk yang divaksin pada TKG-2 memiliki nilai RPS 56,02% lebih tinggi dibandingkan dengan RPS benih dari induk yang divaksin pada TKG-3 yaitu 43,98%. Hal ini menunjukkan efikasi vaksinasi induk yang divaksin pada TKG-2 lebih baik terhadap benih yang dihasilkan dibandingkan dengan induk yang divaksin pada TKG-3 dan kontrol. Nilai RPS yang tinggi pada benih TKG-2 mengindikasikan bahwa akumulasi antibodi yang terdapat pada kuning telur lebih tinggi sehingga mampu memberikan proteksi terhadap infeksi *S. agalactiae* lebih baik. Hal tersebut erat kaitannya dengan waktu vaksinasi yaitu TKG-2, dan berdasarkan Núñez dan Duponchelle (2009), ini merupakan awal terjadinya proses vitelogenesis, sedangkan TKG-3 tergolong vitelogenesis akhir dan dilanjutkan ke TKG-4 yaitu tahap maturasi oosit.

### Gejala Klinis Benih Pascauji Tantang

Gejala klinis yang teramati pada benih ikan pascauji tantang dengan *S. agalactiae* meliputi warna tubuh pucat, mata menonjol keluar

(*exophthalmia*), kekeruhan pada mata (*opacity*), mata memutih, perubahan pola renang (*whirling* atau gerakan berputar-putar), dan pembengkokan bagian tubuh (*scoliosis*). Gejala klinis *exophthalmia*, *purulens*, dan *opacity* disajikan pada Gambar 3. Gejala klinis yang timbul pada benih pascauji tantang dengan *S. agalactiae*-N<sub>14</sub>G, sama pada setiap perlakuan benih dari induk tanpa vaksin, induk yang divaksin pada TKG-2, dan induk yang divaksin pada TKG-3 hingga akhir pengamatan.

Menurut Filho *et al.* (2009), peradangan akibat infeksi *S. agalactiae* terjadi pada hari ke-3 dan ke-7 setelah infeksi. Perbedaan gejala yang muncul dapat dikaitkan dengan organ target *S. agalactiae* (mata, otak, dan ginjal). Keberadaan bakteri pada organ mata dapat menyebabkan perubahan pada mata (*opacity*, *purulens*, dan *eksophthalmia*). Keberadaan bakteri pada organ otak dapat menyebabkan ikan berenang abnormal (*gaspings*, berenang miring bahkan *whirling*), sedangkan keberadaan bakteri pada ginjal ikan dapat menyebabkan perubahan warna tubuh menjadi lebih hitam (Hardi, 2011).

### SIMPULAN

Dari hasil penelitian diketahui bahwa vaksinasi induk ikan nila mampu memberi proteksi yang lebih baik pada benih yang dihasilkannya. Waktu pemberian vaksin terbaik pada induk betina ikan nila untuk meningkatkan kualitas benih yang tahan terhadap infeksi bakteri *S. agalactiae* adalah pada saat TKG-2 atau tujuh hari setelah pemijahan.



## SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai vaksinasi benih ikan nila dari induk yang divaksin pada TKG-2 menggunakan vaksin gabungan sel utuh dan produk ekstraseluler (ECP) dari bakteri *S. agalactiae*, dan dilanjutkan dengan uji tantangan dengan bakteri homolog guna mengetahui potensi aplikasi vaksinasi tersebut dalam peningkatan sistem kekebalan tubuh ikan nila yang dihasilkan.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan Tinggi yang telah memberi dana bantuan penelitian melalui program Bantuan Operasional Nasional Perguruan Tinggi Negeri (BOPTN) tahun 2014; Laboratorium Kesehatan Ikan, Departemen Budidaya Perairan, Laboratorium Pengembangbiakan dan Genetika Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan IPB; Laboratorium Immunologi, Fakultas Kedokteran Hewan IPB; dan Instalasi Litbang Pengendalian Penyakit Ikan, Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar, Bogor, Jawa Barat, yang telah membantu dan memfasilitasi penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amrullah, Sukenda, Harris E, Alimuddin, Lusiastuti AM. 2014. Immunogenicity of the 89 kDa toxin protein from extracellular products of *Streptococcus agalactiae* in *Oreochromis niloticus*. *J Fish Aquat Sci* 9: 176-186.
- Buller. 2004. *Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals : A Practical Identification Manual*. Cambrige. CABI Publishing. Hlm. 394.
- Ellis AE. 1988. *Fish Vaccination*. London. Academic Press Ltd. Hlm. 255.
- EnCor Biotechnology Inc. 2014. Ammonium Sulfate Calculator. <http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>
- Evans JJ, Shoemaker CA, Klesius PH. 2004a. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (Group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. *Vaccine* 22: 3769-3773.
- Evans JJ, Klesius PH, Shoemaker CA, Fitzpatrick BT. 2004b. *Streptococcus agalactiae* vaccination and infection stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied Aquaculture* 16: 105-115.
- Evans JJ, Klesius PH, Shoemaker CA, Al-Ahlani S. 2006. First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garviae* from a wild bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Journal of Aquatic Animal Health* 18: 212-216.
- Filho CI, Müller EE, Pretto-Giordano LG, Bracarense APFRL. 2009. Histological findings of experimental *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Braz J Vet Pathol* 2(1): 12-15.
- Hardi EH, Sukenda, Harris E, Lusiastuti AM. 2011. Karakteristik dan Patogenesis *Streptococcus agalactiae* Tipe  $\alpha$ -hemolitik dan Non-hemolitik pada Ikan Nila. *J Veteriner* 12(2):151-164.
- Hardi EH, Sukenda, Harris E, Lusiastuti AM. 2013. Kandidat vaksin potensial *Streptococcus agalactiae* untuk pencegahan penyakit Streptococcosis pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *J Veteriner* 14(4): 408-416.
- Hanif A, Bakopoulos V, Dimitriadis GJ. 2004. Maternal transfer of humoral specific and non-specific immune parameters to sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Fish and Shellfish Immunology* 17: 411-435.
- Hanif A, Bakopoulos V, Leonardos I, Dimitriadis GJ. 2005. The effect of sea bream (*Sparus aurata*) broodstock and larval vaccination on the susceptibility by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and on the humoral immune parameters. *Fish & Shellfish Immunology* 19: 345-361
- Kanlis G, Suzuki Y, Tauchi M, Numata T, Shirojo Y, Kawano K. 1995. Immunoglobulin concentration and specific antibody activity in oocytes and eggs of immunized red sea bream. *Fisheries Science* 61: 791-795.
- Lund V, Jorgensen T, Holm KO, Eggset G. 1991. Humoral immune response in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., to cellular and

- extracellular antigens of *Aeromonas salmonicida*. *J Fish Dis* 14: 443-452.
- Lusiastuti AM, Handayani ES, Sukenda, Taukhid, Harris E. 2010a. Vaksin *Streptococcus agalactiae*: Kajian perbandingan metode preparasi sel utuh (*whole cell*) tipe non hemolitik untuk pencegahan streptococcosis pada ikan nila *Oreochromis niloticus*. Prosiding Simposium Nasional Bioteknologi Akuakultur III. Hlm. 48-5.
- Lusiastuti AM, Hadie W. 2010b. Penggunaan vaksin *Aeromonas hydrophila*: Pengaruhnya terhadap sintasan dan imunitas larva ikan patin (*Pangasionodon hypophthalmus*). *Berita Biologi* 10(2): 151-158.
- McMillan DB. 2007. *Fish Histology: Female Reproductive Systems*. Netherland Springer. Hlm. 598
- Núñez J, Duponchelle F. 2009. Towards a universal scale to assess sexual maturation and related life history traits in oviparous teleost fishes. *Fish Physiology and Biochemistry* 35(1): 167-180.
- Nur I, Sukenda, Dana D. 2004. Ketahanan benih ikan nila gift (*Oreochromis niloticus* LINN.) dari hasil induk yang diberi vaksin terhadap infeksi buatan *Streptococcus iniae*. *Jurnal Akuakultur Indonesia* 3(1): 37-43
- Pasnik DJ, Evans JJ, Panangala VS, Shelby RA. 2005. Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficiency. *Journal of Fish Diseases* 28: 205-212.
- Pasnik DJ, Evans JJ, Klesius PH. 2006. Passive immunization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) provides significant protection against *Streptococcus agalactiae*. *Fish and Shellfish Immunology* 21: 365-371
- Standar Nasional Indonesia SNI 7550:2009. Produksi Ikan Nila (*Oreochromis niloticus* Bleeker) Kelas Pembesaran di Kolam Air Tenang.
- Sheehan B, Labrie L, Lee YS, Wong FS, Chan J, Komar C, Wendover N, Grisez L. 2009. Streptococcal diseases in farmed tilapia. *Aquaculture Asia Pacific* 5: 26-29.
- Shelby RA, Klesius PH, Shoemaker CA, Evans JJ. 2002. Passive immunization of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), with anti-*Streptococcus iniae* whole sera. *Journal of Fish Diseases* 25: 1-6.
- Suwa K, Yamashita M. 2007. Regulatory mechanisms of oocyte maturation and ovulation, Dalam: Babin PJ, Cerdà J, Lubzens E. (Ed). *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*. Netherland. Springer. Hlm. 323-347.
- Sugiani D, Sukenda, Harris E, Lusiastuti AM. 2012. Pengaruh ko-infeksi bakteri *Streptococcus agalactiae* dengan *Aeromonas hydrophila* terhadap gambaran histopatologi ikan tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Riset Akuakultur* 7(1): 85-89.
- Swain P, Behura A, Dash S, Nayak SK. 2007. Short communication : Serum antibody response of Indian major carp, *Labeo rohita* to three species of pathogenic bacteria; *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* and *Pseudomonas fluorescens*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 117: 137-141.
- Swain P, Nayak SK. 2009. Role of maternally derived immunity in fish. *Fish and Shellfish Immunology* 27: 89-99.
- Takemura A, Takano K. 1997. Transfer of maternally-derived immunoglobulin (IgM) to larvae in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Fish & Shellfish Immunology* 7: 355-363.
- Williams ML, Azadi P, Lawrence ML. 2003. Comparison of cellular and extracellular products expressed by virulent and attenuated strains of *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Aquatic Animal Health* 5: 264-273.