

Pengaruh Dosis Terhadap Efektifitas Vaksin POM *Vibrio alginolyticus* 74 kDa pada Ikan Kerapu Macan *Epinephelus fuscoguttatus*

Desrina¹, Arief Taslihan², Ambariyanto³, Budhi Kuncoro Jati¹

¹Study Program Aquaculture, Fisheries Departement, Faculty of Fisheries and Marine Science, Diponegoro University. Jl. Hayam Wuruk no 4A Semarang. Telp/Fax: (024) 8311525. E-mail: Desrina.desrina@alumni.undip.ac.id.

² Brackishwater Aquaculture Development Centre. Jl. Pemandian Kartini PO BOX 1 Jepara

³ Marine Science Departement, Faculty of Fisheries and Marine Science, Diponegoro University Tembalang Campus, Semarang.

Abstrak

Vibrio alginolyticus adalah bakteri patogen penyebab penyakit vibriosis pada ikan kerapu budidaya di Indonesia. Vaksin Protein Outer Membran (POM) *V. alginolyticus* telah terbukti imunogenik pada ikan kerapu. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pengaruh dosis vaksin terhadap kemampuan POM *V. alginolyticus* 74 kDa dalam merangsang kerja sistem kekebalan spesifik ikan dan menentukan efek dosis terhadap perlindungan yang dihasilkan. POM(74 kDa) diisolasi dengan metoda sonikasi dan SDS-PAGE, dan dimurnikan dengan metoda elektroelusi. Vaksin diberikan dengan metoda suntik intraperitoneal ke ikan kerapu ukuran 8–10 cm (berat 10–13 g) dengan dosis 0 (kontrol), 5, 10 dan 15 µg/0,1 ml PBS/ 10 g ikan (n= 30 ekor/dosis). Ikan kontrol disuntik dengan 0,1 ml PBS steril. Satu minggu kemudian ikan disuntik booster dengan cara dan dosis yang sama. Dua minggu setelah booster dilakukan uji tantang dengan menyuntikkan bakteri *Vibrio alginolyticus* 8 secara intramuskular dengan dosis 0,1 ml X 10⁹ sel/ml, dan ikan dipelihara selama 2 minggu. Jumlah ikan yang mati selama masa uji tantang dihitung untuk menentukan Relative Percentage Survival (RPS). Titer antibodi diukur sebelum percobaan dan setiap minggu selama penelitian. Ke 3 dosis yang diberikan efektif dalam merangsang respon kekebalan humoral ikan kerapu dan menghasilkan kekebalan yang melindungi yang hampir sama yang terlihat dari nilai RPS untuk dosis 5, 10 dan 15 µg masing masing 72, 87 dan 72%.

Kata kunci: vaksin POM, kerapu, dosis

Abstract

Vibrio alginolyticus is a causative agent of vibriosis of cultured grouper in Indonesia. It has been reported that the Outer Membrane Protein (OMP) of *V. alginolyticus* vaccine was immunogenic on grouper. Vaccine dose is important in determining the ability of vaccine to conferred protective immunity. The objectives of the present research was to determine effect of vaccine doses on (1) the specific immune response of grouper and (2) conferring protective immunity of grouper. OMP *V. alginolyticus* (74 kDa) was isolated by sonication and SDS-PAGE, and purified by mean electroelution. Vaccine was delivered by intraperitoneal injection to grouper juvenile (8 – 10 cm long and weigh 10 – 13 g) in three doses; 0 (kontrol), 5, 10 dan 15 µg/0,1 ml PBS/ fish (n= 30 fish/dose). Control fish were injected with 0,1 ml sterile PBS steril. One week later, booster was given in the same manner as the primary vaccination. Two weeks following booster (week 4), fish were challenge with *V. alginolyticus* 8 by intramuscular injection (0,1 ml X 10⁹ sel/ml) and fish were maintained for two weeks. Fish mortality pos challenge test was counted to calculate the Relative Percentage Survival (RPS). Antibodi titer was measured before vaccination and weekly for 4 week. All three doses tested were effective to trigger the specific immune response of grouper dan conferred protective immunity with similar degree as shown by the RPS for dose 5, 10 dan 15 µg were 72, 87 dan 72% respectively.

Key words: vaccine, OMP, grouper, dose.

Pendahuluan

Vibriosis merupakan penyakit bakterial utama pada benih kerapu dan sangat merugikan

ikan kerapu budidaya di Asia Tenggara (Bondad-Reantaso et al., 2000). Beberapa spesies vibrio yang patogen pada ikan kerapu adalah *Vibrio anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* dan *V. marinus*.

(Nagasawa & Cruz-Lacierda, 2004). *V. alginolyticus* adalah spesies paling sering diisolasi dari ikan kerapu sakit di Indonesia (Taslihan *et al.*, 2000; Nitimulyo *et al.*, 2005a) dan termasuk bakteri patogen yang ganas ikan kerapu (Desrina *et al.*, 2006). Dewasa ini sudah mulai diteliti calon vaksin untuk mengendalikan vibriosis pada ikan kerapu di Indonesia berupa bakterin polivalen (Nitimulyo *et al.*, 2005b) dan protein outer membran (Desrina *et al.*, 2007).

Protein outer membran (POM) bakteri gram negatif adalah beberapa protein yang merupakan bagian dinding sel bakteri gram negatif yang berhubungan dengan sifat virulensi seperti yang telah dilaporkan pada bakteri *Aeromonas* (Kushiramani *et al.*, 2008) dan bersifat imunogenik. Dalam skala laboratorium, POM terbukti merupakan komponen vaksin yang potensial mengendalikan penyakit ikan (Vinitnantharat *et al.*, 1993; Colquhoun & Sorum 1998; Rahman & Kawai 1999; Collado *et al.*, 2000; Rahman *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2009) dan meningitis pada manusia (Rosenthal & Zimmerman, 2006). Sun *et al.*, (2009) melaporkan bahwa POM *V. harveyi* yang diteliti tidak hanya potensial sebagai vaksin melawan infeksi *V. harveyi*, tapi juga sebagai kerir vaksin melawan bakteri *Edwardsiella tarda* pada ikan Japanese flounder. Hasil penelitian Desrina *et al.* (2007) juga membuktikan bahwa POM bakteri *V. alginolyticus* bersifat lebih imunogenik dari sel utuh pada ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). Outer Membran (POM) bakteri negatif merupakan kandidat vaksin baik karena mengandung Lipoprotein, berbagai faktor virulensi seperti siderofor (Tashima *et al.*, 1996; Deitsch *et al.*, 1997; Ahn *et al.*, 2005), hemolysin, porin (Davey *et al.*, 1998; van der Woude & Baumler, 2004; Finlay & Falkow, 1997); adhesin (Fang *et al.*, 2004) yang merupakan antigenik dan imunogenik kuat (Salati, 1988; Lutwyche *et al.*, 1995) dan resistensi terhadap peptida antimikroba yang dihasilkan inang (Duperthuy *et al.*, 2010).

Salah satu faktor yang menentukan efektifitas suatu vaksin adalah dosis yang diberikan. Pada penelitian terdahulu (Desrina *et al.*, 2007) dosis 5 µg POM *V. alginolyticus* 74 kDa mampu merangsang sistem kekebalan ikan kerapu. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan kemampuan POM *V. alginolyticus* 74 kDa dalam merangsang kerja sistem kekebalan spesifik ikan dan melindungi ikan dari infeksi *Vibrio* dan menentukan efek dosis vaksin terhadap perlindungan yang dihasilkan.

Materi dan Metode

Ikan uji dan pemeliharaannya

Ikan uji yang digunakan berukuran ukuran 8–10 cm (berat 10–13 g) yang berasal dari pemijahan yang sama di pembenihan BBPBAP Jepara. Pada saat aklimatisasi ikan dipelihara di dalam bak fiber glass (volume 1 m³) Selama penelitian, air dalam akuarium diganti 1 kali sehari sebanyak 10% dan disifon 2 kali sehari pada pagi dan sore hari untuk membersihkan sisa pakan. Ikan diberi makan campuran ikan rucah, ikan kakap dan tenggiri, dua kali sehari pada pagi dan sore hari sebanyak 3 % dari total berat.

Isolasi dan purifikasi Protein Outer Membran (POM)

Isolasi dan purifikasi POM dilakukan dengan modifikasi metoda Sprott *et al.* (1994). Bakteri dikultur pada media TSA (selama 18-24 jam, suhu 30 °C), dipanen dan disentrifuse 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang, pellet dicuci dengan PBS steril (pH 7,2) tiga kali, disuspensikan dalam PBS 0,01 M (pH 7,4) dan dipecahkan dengan sonikasi 6 x 30 detik (sonikasi selama 30 detik istirahat 1 menit) pada panjang gelombang 50 Hz. Hasil sonikasi dicuci dengan PBS (pH 7,4) sebanyak 4 kali dan sentrifuse pada 3000 rpm selama 15 menit. Supernatant yang disebut *Crude membrane* diambil. Protein yang diperoleh disuspensikan dalam cariran protease inhibitor 1ml, 0,5% nonidet-P40 dan mM PMSF dan ditambahkan PBS seperlunya sesuai dengan banyaknya protein. Suspensi ini diaduk dengan stirrer selama 2 jam pada 4 °C dan dialysis selama 12 jam dalam PBS dan PBS diganti dua kali. Cairan yang diperoleh disimpan pada suhu 20 °C sampai proses lebih lanjut.

SDS-PAGE Outer membran

Hasil isolasi protein outer membrane (POM) yang diperoleh dideteksi dengan metoda Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) menggunakan 12 % (berat/vol) gel pemisah dan 5 % (berat/vol) *Stacking gel* (Sprott *et al.*, 1994). Berat molekul POM yang ditentukan dengan membandingkannya dengan berat molekul Sigmamaker (Lyophilized) (sigma).

Sebanyak 10 µl marker dimasukan ke dalam sumur pertama dan pada sumur-sumur berikutnya dimasukan POM sebanyak 15 µl. Elektroforesis dilaksanakan pada 100 V. Selanjutnya gel diambil dan diwarnai dengan Comassie blue 0,1 % selama 18 jam dan didestaining dalam campuran methanol 50%, asam asetat 40% dan akuabides 40% (vol/vol) sampai latar belakang jernih. Gel disimpan dalam larutan asam asetat 10%.

Purifikasi POM

Band protein yang diinginkan yaitu 74 kDa

dimurnikan dengan metode elektroelusi (Sprott *et al.*, 1994). Gel yang berisi protein (dari SDS-PAGE) dicuci dengan akuabides dan band protein yang diinginkan dipotong dan dimasukkan kedalam tabung dialysis yang berisi 3 ml larutan buffer TBE dan direndam secara horizontal dalam buffer TBE pH 8,0 dalam ruan elektroforesis. Elektroelusi dilakukan pada 100V pada 10 °C selama 18-24 jam. Protein yang terkumpul ditampung dalam tabung eppendorf. Berat protein yang diperoleh diukur dengan spektrofotometer pada absorpsi 595 nm dan sebagai blanko digunakan campuran Biorad Protein Assay dan akuabides. Hasil bacaan pengukuran protein dimasukkan pada persamaan regresi bacaan Bovine Serum Albumin (yang sudah diketahui beratnya) pada absorpsi yang sama.

Uji vaksinasi

Pembuatan bakterin. Bakteri *V. alginolyticus* 8 dikultur pada media TSA + NaCl 2%, dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam, di panen dan disuspensikan dalam larutan Phosphat buffer Solution Saline (PBS-Saline) steril (pH 7,2) dan divortek untuk membuat suspensi homogen. Suspensi bakteri yang telah homogen diberi formalin 2% dan disimpan dalam refrigador selama 24 jam. Suspensi bakterin yang sudah di formalin kemudian di uji viabilitasnya dengan mengkulturkannya pada media Thiosulfat Citrate Bilesalt Sucrose Agar (TCBSA) untuk memastikan tidak terjadi kontaminasi dan bakteri telah mati. Uji viabilitas dilakukan secara berkala selama penelitian. Larutan bakteri di cuci dengan PBS steril (pH 7,2) dengan cara disentrifuse lagi dengan kecepatan 8000 rpm selama 25 menit dengan suhu 4 °C agar terpisah antara supernatan dan pelet, supernatan dibuang dan pelet disuspensikan lagi dalam PBS steril (pH 7,2), disentrifuse sebanyak 4 kali dengan kecepatan 8000 rpm selama 15 menit. Sehingga pengaruh formalin hilang dari pelet. Bakterin disimpan dalam refrigador sampai digunakan. Bakterin digunakan dalam uji agglutinasia untuk menentukan konsentrasi antibodi.

Vaksinasi

Vaksinasi dilakukan dengan menyuntikkan ikan uji secara intraperitoneal dengan dosis 0 (kontrol), 5, 10, 15 µg/0,1 ml larutan PBS per ekor. Masing masing dosis vaksin menggunakan 30 ekor ikan. Band POM dari *V. alginolyticus* 74 kDa hasil elektroelusi dan telah diukur konsentrasinya dengan spektrofotometer diambil sesuai dosis dan dilarutkan dalam PBS steril. Ikan dipingsankan dengan minyak cengkeh (1,5 ml/ 6 liter air laut), disuntik dengan POM sesuai dengan dosis yang telah ditentukan sebanyak 0,1 ml/ikan. Ikan kontrol disuntik dengan larutan PBS-Saline sebanyak 0,1 ml/ekor. Ikan uji dan

ikan kontrol dikembalikan ke tempat pemeliharaan ke dalam akuarium setelah disuntik sesuai perlakuan dan ulangan. Ikan kemudian dipelihara pada kondisi lingkungan yang memenuhi syarat. Seminggu kemudian dilakukan suntikan kedua (booster) dengan dosis dan cara yang sama seperti pada suntikan pertama. Sample darah diambil setiap minggu selama 4 minggu dan dilakukan pengukuran antibodi dengan metoda microplate aglutinasi. Kualitas air diamati dengan mengukur nilai suhu, salinitas dan pH pada tiap aquarium setiap kali sampling.

Pengukuran titer antibodi

Titer antibodi diukur di awal penelitian dan setiap minggu selama 4 minggu sampai waktu uji tantang (minggu ke 4 penelitian). Sebelum dilakukan vaksinasi 5 ekor ikan uji diperiksa apakah terinfeksi *Vibrio* dengan mengambil isolat bakteri dari ginjal, kemudian dikultur pada media TCBSA. Disamping itu ikan juga diperiksa untuk memastikan tidak terinfeksi parasit maupun bakteri. Darah dari ikan yang sama diambil untuk mengetahui titer antibodi awal (T₀) yang dimiliki oleh ikan uji.

Pengukuran titer antibodi bertujuan untuk menentukan jumlah antibodi yang dihasilkan akibat disuntik dengan vaksin OMP dengan cara titrasi yang disusun dalam seri pengenceran bertingkat. Titrasi dilakukan pada microplate menurut Lam & Mutharia (1994). Darah ikan Kerapu Macan diambil dengan cara memotong ekor ikan dan ditampung dalam tabung haematokrit yang sudah diberi heparin. Tabung haematokrit yang berisi darah disentrifuse (10.000 rpm, 4 menit) sehingga terpisah antara darah (pellet) dan serum (supernatan). Serum yang ada diambil dengan mikropipet secara hati-hati sehingga tidak tercampur lagi dengan sel darah, ditampung dalam tabung eppendorf dan disimpan di refrigador.

Mikroplate lubang 1 diisi dengan 25 µl serum sebagai kontrol negatif serum, lubang 2 diisi dengan 25 µl bakterin dengan konsentrasi 10⁴ sebagai kontrol negatif bakterin dan pada sumur 3-12 dimasukkan 25 µl PBS. Serum yang akan diukur dimasukkan 25 µl pada sumur 3, kemudian diaduk dengan mikropipet hingga homogen. Selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat dengan memindahkan campuran 25 µl dari sumur 3 ke sumur 4 dan seterusnya sampai selesai. Selanjutnya, dimasukkan 25µl bakterin (konsentrasi 10⁴ sel/ ml) ke sumur ke 3-12 yang telah berisi campuran serum dan PBS-saline, dan diaduk-aduk sehingga bakterin dan serum tercampur sempurna. Mikroplate ditutup dengan aluminium foil agar tidak terjadi penguapan dan didiamkan selama 4 jam pada suhu kamar. Titer antibodi dinyatakan positif apabila terjadi pengkabutan yang berarti terdapat antibodi pada

lubang tersebut. Titer antibodi dihitung sebagai log 2 dari pengenceran tertinggi yang masih terjadinya adanya gumpalan (kabut).

Uji tantang

Kultur murni bakteri *Vibrio alginolyticus* 8 yang virulen (hasil pasase) pada media TSA, dipanen, disuspensikan dalam PBS dan disuntikkan sebanyak 0, 1 ml x 10⁹ sel/ml/ ikan (berdasarkan hasil uji patogenisitas) secara intra muskular pada ikan yang divaksin dan ikan kontrol. Ikan dipelihara selama 2 minggu dan dihitung RPS (Relatif Percentage Survival) menurut Ellis (1988)

$$RPS = \left(1 - \frac{\text{mortalitas ikan yang divaksin}}{\text{mortalitas ikan kontrol}} \right) \times 100\%$$

Pemeriksaan bakteri pada ikan yang mati dengan cara bakteri diisolasi dari ginjal ikan dan kemudian di kultur pada media TCBSA untuk mengetahui keberadaan bakteri *Vibrio alginolyticus* 8 di tubuh ikan. Koloni *Vibrio alginolyticus* dipindahkan dan dikultur ke media nutrisi agar yang telah diberi NaCl 1,5 % untuk menentukan sifat swarming dan identifikasi.

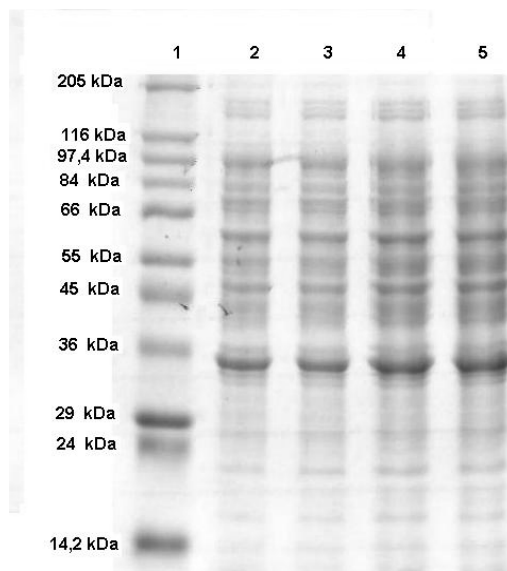
Data yang dikumpulkan adalah titer antibodi sebelum dan sampai 4 minggu pasca vaksinasi; kelulushidupan pasca uji tantang dan titer antibodi ikan sampai 12 minggu pasca vaksinasi. Data penunjang adalah data pengamatan terhadap kualitas air pada media uji, yang meliputi suhu, salinitas, dan pH. Pengamatan kualitas air sebagai data penunjang dilakukan pada waktu sampling pengambilan darah.

Hasil dan Pembahasan

Vaksin (POM) *V. alginolyticus* 74 kDa

Profil POM *V. alginolyticus* tercantum pada gambar 1. POM *V. alginolyticus* 74 kDa yang dipurifikasi dan digunakan dalam vaksinasi adalah yang ditunjukkan oleh panah.

Outer membrane merupakan bagian sel bakteri yang khas yang ditemukan pada bakteri gram negatif dan bersifat antigenik kuat karena mengandung berbagai jenis protein yang merupakan faktor kepatogenan dan virulensi bakteri gram negatif (Neidhardt et al., 1990; Lin et al., 2002,). Contohnya adalah porin (Davey et al., 1998; van der Woude & Baumber, 2004; Finlay dan Falkow 1997), siderofore (Tashima et al., 1996; Deitsch et al., 1997; Ahn et al., 2005). Disamping itu, POM juga penting untuk menghindari peptida antimikroba yang terdapat dalam darah dan permukaan berlendir, dan mengatasi aktivitas bakterisidal komplemen. Sintesa protein outer membran dipengaruhi oleh kondisi niche di tubuh inang (Lin et al., 2002) osmolaritas dan konsentrasi NaCl dalam media dan dalam hal siderofor dipengaruhi ketersediaan zat besi dalam darah inang (Ahn et al., 2005). Colquhoun & Sorum (1998) menemukan terdapat perbedaan jenis protein outer membran *V. salmonicida* yang dikultur *in vitro* dengan yang tumbuh dalam rongga tubuh ikan salmon. Pada kultur *in vitro* protein outer membran berukuran 40 dan 24 kDa sedangkan pada kultur *in vivo* disamping kedua protein diatas juga ditemukan protein dengan berat molekul tinggi (78, 90 dan 99 kDa) yang mungkin merupakan bagian dari sistem pengapit zat besi. Hasil yang hampir sama juga dilaporkan oleh Poobalane et al., (2008)



Gambar 1. Protein Outer Membrane *V. Alginolyticus* 8 74 kDa calon vaksin (lajur2-5) dan lajur 1 marker.

pada *A. hydrophyla*. Melihat ukuran POM yang digunakan dan berasal dari *V. alginolyticus* yang baru dipasase ke ikan kerapu, kemungkinan POM yang dijadikan vaksin adalah dari sistem pengapit zat besi. Namun hal ini perlu dibuktikan dengan sequencing.

Titer antibodi

Titer antibodi ikan sebelum vaksinasi adalah 2² dan pasca vaksinasi tercantum pada (gambar 2). Respon kekebalan humoral ikan Kerapu macan yang disuntik POM 74 kDa setelah minggu ke dua pasca vaksinasi terjadi peningkatan yang tajam, dan titer antibodi ikan yang divaksin secara signifikan lebih tinggi dari ikan kontrol.

Titer antibodi ikan yang divaksin jauh lebih tinggi dari ikan kontrol dan terus meningkat sampai minggu ketiga pasca vaksinasi dan kemudian menurun. Ke 3 dosis yang diberikan mampu merangsang titer antibodi yang tinggi. Dosis 10 µg menghasilkan titer antibodi yang terbanyak dan lebih stabil dibanding ke dua dosis lainnya, diikuti oleh dosis 5 dan 10 µg.

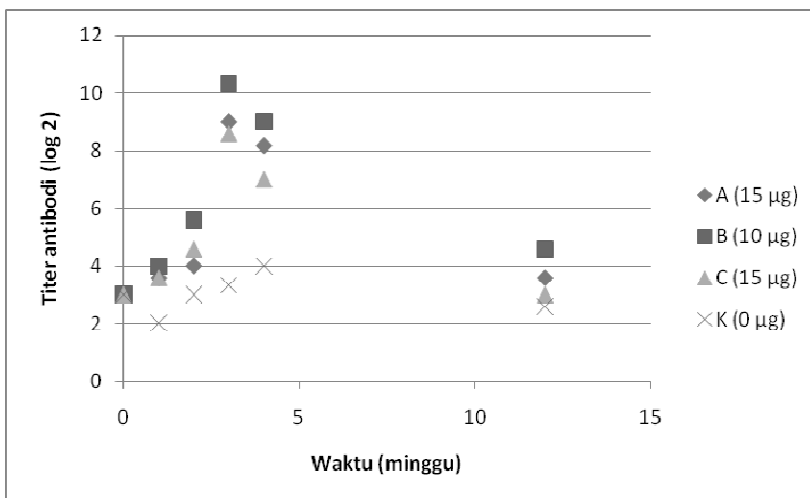
Berdasarkan titer antibodi terlihat bahwa vaksin POM 74 kDa merupakan imunogen kuat dan mampu merangsang terbentuknya antibodi yang cukup tinggi walaupun tanpa bantuan adjuvant. Hal ini karena outer membran mengandung protein integral yang penting dalam faktor virulensi dan LPS pada bagian dalam dan phopolipid pada bagian luar. POM mencapai hampir 50 % massa outer membrane dan meliputi protein membrane integral dan lipoprotein yang tertanam kuat ke outer membrane melalui N terminal lemak. Integral protein ini esensial untuk menjaga integritas dan permiabilitas membrane, dan pathogenesis dengan memperkuat

daya adaptasi bakteri dalam berbagai lingkungan (Lin et al., 2002). POM yang dihasilkan penting dalam proses adaptif bakteri patogen di dalam tubuh inang seperti untuk mengambil zat besi, resistensi terhadap peptida antimicrobial, obat dan enzim empedu dan serum. Hal ini lah yang membuat POM calon vaksin yang baik yang berasal dari bakteri.

Hal yang menarik yang ditemukan adalah titer antibodi ikan kerapu yang divaksin tetap terdeteksi dalam jumlah yang cukup banyak dan lebih tinggi dari ikan kontrol setelah 12 minggu vaksinasi yang menunjukkan vaksin POM *V. Alginolyticus* 74 kDa ini potensial untuk memberikan perlindungan jangka panjang pada ikan kerapu macan. Hal ini sangat menarik untuk diteliti lebih lanjut untuk menentukan berapa lama jangka waktu maksimum dimana vaksin yang diberikan masih dapat memberikan perlindungan.

Kelulus hidupan pasca ujiantang dan Relatif Percentage Survival (RPS)

Uji tantang dilakukan untuk menentukan kemampuan vaksin menghasilkan kekebalan yang melindungi (*protecting immunity*) dari patogen tertentu. Dalam penelitian ini, empat hari pasca ujiantang ikan kontrol mulai menunjukkan gejala klinis terserang Vibriosis yaitu nafsu makan menurun dan terdapat luka yang berkembang menjadi borok pada tubuh. Kematian mulai terjadi pada hari yang sama dan terus meningkat sampai akhir pengamatan (Tabel 1). Sementara ikan yang divaksin tidak menunjukkan adanya gejala klinis dan kematian ikan yang divaksin mulai terjadi pada hari ke 7 dan jumlahnya sangat sedikit dan tidak menunjukkan gejala vibriosis. Hasil isolasi bakteri pada ikan yang divaksin menunjukkan tidak terinfeksi bakteri vibriosis. Kematian ikan kontrol secara signifikan lebih tinggi dari ikan yang divaksin (Gambar 3).

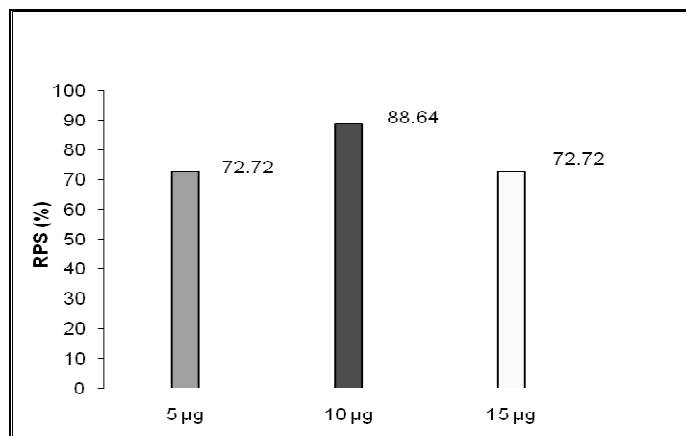


Gambar 2. Titer antibodi ikan kerapu yang divaksin dengan POM *Vibrio alginolyticus* 74 kDa selama penelitian

Tabel 1. Kelulushidupan ikan kerapu macan pasca uji tantang

Perlakuan	Kelulushidupan selama 14 hari pasca uji tantang														SR (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
K1	5	5	5	5	5	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
K2	5	5	5	4	4	3	2	1	1	1	1	1	1	1	20
K3	5	5	5	5	5	4	3	3	3	3	3	3	3	3	60
A1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
A2	5	5	5	5	5	5	5	4	4	3	2	2	2	2	40
A3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	100
B1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
B2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
B3	4	4	4	4	4	4	3	3	3	3	3	3	3	3	75
C1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
C2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
C3	5	5	5	5	5	5	4	3	2	2	2	2	2	2	40

Keterangan: K= Kontrol (dosis vaksin 0 µg);
 A= Dosis vaksin 5 µg
 B= Dosis vaksin 10 µg
 C= Dosis vaksin 15 µg



Gambar 3. Relative Percent Survival (RPS) ikan yang divaksin.

Dari Gambar 3 terlihat ke tiga dosis menghasilkan RPS yang tinggi (70-90%) yang menunjukkan vaksin yang diberikan efektif dalam menghasilkan kekebalan yang melindungi terhadap *V. alginolyticus* pada ikan kerapu macan.

Kualitas air selama uji vaksinasi berada dalam kisaran yang layak untuk memelihara ikan kerapu. Kisaran parameter kualitas air adalah sebagai berikut pH 7.48–7.87, suhu 27-30 °C, salinitas 30 per mil dan DO 5.24-5.90. Kualitas air dijaga untuk selalu optimum sehingga system kekebalan tubuh ikan dapat bekerja dengan baik dan hasil vaksinasi optimum.

Kematian yang terjadi pasca uji tantang konsisten dengan hasil pengukuran titer antibodi. Ikan yang divaksin dengan dosis 10 µg mempunyai antibodi yang tertinggi dan kelulus hidupan yang tertinggi. Hal ini menunjukkan, vaksin yang diberikan

mampu melindungi ikan perlakuan dari infeksi Vibriosis. Kemampuan *POM V. alginolyticus* dalam merangsang antibodi konsisten tinggi selama penelitian ini dilaksanakan.

Efektivitas suatu vaksin dapat dilihat dari nilai Relative Percent Survival (RPS). Vaksin *POM V. alginolyticus* yang diteliti mampu memberikan RPS yang relatif tinggi yaitu 70-80 %. Hasil yang hampir sama juga dilaporkan oleh Rahman dan Kawai (1999) pada ikan mas koki, Collado et al., (2000) pada ikan sidat, Rahman et al. (2002) pada ikan mas, Qian et al., (2008b) pada ikan large yellow croacker dan Cai et al. (2010) pada ikan *Lutjanus erythropterus*. Perlu disampaikan bahwa semua peneliti di atas menggunakan dosis POM yang lebih tinggi dari yang digunakan dalam penelitian ini.

Walaupun secara statistik tidak terdapat perbedaan efek dosis vaksin, akan tetapi diantara ke

tiga dosis yang digunakan, dosis 10 µg memberikan perlindungan yang terbaik karena mempunyai kematian yang terendah dan secara konsisten mampu menghasilkan titer anti bodi yang tinggi selama penelitian, sedangkan kedua dosis lainnya memberikan hasil yang sama.

Kesimpulan

Pada penelitian ini, ditemukan bahwa POM bakteri *V.alginolyticus* 74 kDa mampu memberikan perlindungan terhadap infeksi *Vibrio* pada ikan kerapu macan dan tidak terdapat perbedaan RPS dan titer antibodi yang nyata antara ke 3 dosis vaksin yang diberikan.

Ucapan Terima Kasih

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Sdri Jariah dan Hastuti dari Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan BBPAP Jepara yang telah membantu pelaksanaan uji vaksinasi ini, saudara Arsiah dari Laboratorium Bioteknologi UGM yang telah membantu dalam persiapan vaksin. Penelitian ini didanai Oleh Kementrian RISTEK melalui program Riset Insentif Dasar tahun 2008.

Daftar Pustaka

- Ahn, S., J. Han, J. Lee, K. Park & I. Kong. 2005. Identification of an Iron regulated Hemin-binding Outer Membrane Protein Hup O in *Vibrio fluvialis*: Effects on hemolytic activity and the Oxidative Stress Response. *Infection and Immunity*, 73 (2): 722 – 729.
- Bondad-Reantaso, M.G., S.Kanchanakhan & S. Chinabut. 2000. Review of Grouper Diseases and Health Management Strategies for Grouper and other Marine Finfish Diseases. Regional Workshop on Sustainable Seafarming and Grouper Aquaculture. Collaborate APEC Grouper Research and Development Network. FWG 01/99. 17-20 April 2000. Medan, Indonesia.
- Cai, S., S. Yao, Y. Lu, Z. Wui, J. Jian, & B. Wang. 2010. Immune response in *Lutjanus erythropterus* induced by the major outer membrane protein (OmpU) of *Vibrio alginolyticus*. *Disease of Aquatic organisms*, 90: 63-68
- Collado, R., B. Fouz, E. Sanjuan & C. Amaro. 2000. Effectiveness of different vaccine formulations against vibriosis caused by *Vibrio vulnificus* serovar E (biotype 2) in European eels *Anguilla anguilla* *Diseases Aquatic Organisms* 43:91- 101
- Colquhoun, D.J. & H. Sorum. 1998. Outer membrane protein expression during in vivo cultivation of *Vibrio salmonicida*. *Fish and Shellfish Immunology*, 8: 367 – 377.
- Davey, M.L., R.E.W. Hancock & L.M. Mutharia. 1998. Influence of culture conditions on expression of the 40-kilodalton porin protein of *Vibrio anguillarum* serotype O2. *Applied and Environ. Microbiol.*, 1: 138-146.
- Deane E. E., & N. Y. Woo. Modulated heat shock protein expression during pathogenic *Vibrio alginolyticus* stress of sea bream. *Diseases of Aquatic Organisms* 62 (3) : 205 -215.
- Deitsch, K.W., E.R. Moxon, & T.E. Wellems. 1997. Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal and fungal infections. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 6: 281-293.
- Desrina, A. Taslihan, Ambariyanto, & Susiani Suryaningrum 2006. Uji Keganasan bakteri *Vibrio* pada ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Ilmu Kelautan*, 11(3): 119-125.
- Desrina, A. Taslihan, Ambariyanto, E.Yudiati, Y.D. Casessar, R.B.S. Sumanta, Triyanto, H.J. Situmeang & L. Sembiring. 2007. Isolasi, purifikasi dan immunogenitas protein outer membrane *Vibrio alginolyticus* pada ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). *J. Perikanan*, IX (1):8-16.
- Dupethuy, M., J. Binesse, F. Le Roux, B. Romestand, A. Caro, P. Got, A. Givaudan, D. Mazel, E. Bachere & D. Destoumieux-Garzon. 2010. The major outer membrane protein OmpU of *Vibrio splendidus* contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster *Crassostrea gigas*. *Environmental Microbiology*, 12(4): 951-963.
- Fang, Hao-Ming, R. Ge & Y.M. Sin. 2004. Cloning, characterisation and expression of *Aeromonas hydrophila* major adhesin. *Fish and Shellfish Immunology*, 16: 65-658.
- Finlay, B.B., & S. Falkow. 1997. Common themes in microbial pathogenicity, revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(2): 136– 169
- Kushiramani, R., S.K. Girisha, P.P. Bhowmick, I.

- Karunasagar & Karunasagar. 2008. Prevalence of different outer membrane proteins in isolates of *Aeromonas* species. *World J. Microbiology and Biotechnology*, 24: 2263-2268.
- Lam, J.S. & L.M. Mutharia. 1994. Antigen-antibody reaction. Pages 104-134 *In*: Gerhardt, P., R.G.E. Murray, W. A.Wood & N.R. Krieg (Eds.). *Methods for General and Molecular Microbiology*. American Soc.for Microbiology, Washington D.C.
- Nagasawa, K & E. R. Cruz-Lacierda (editors). *Diseases of Cultured Groupers*. Southeast Asian Fisheries Development Center, Aquaculture Department, Iloilo, Philippines. 81 pp.
- Neidhardt, F.C., J.L. Ingraham & M. Schaechter. 1990. *Physiology of the Bacterial Cell: A Molecular Approach*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 506 pp.
- Nitimulyo, K.H., A. Isnanstyo, Triyanto, I. Istiqomah & M. Murdjani. 2005a. Isolasi, identifikasi dan karakterisasi *Vibrio* spp. Patogen penyebab Vibriosis pada kerapu di Balai Budidaya Air Payau Situbondo. *J. Perikanan*, VII (2): 80 – 94.
- Nitimulyo, K.H., A. Isnanstyo, Triyanto, M. Murdjani & L. Solichah. 2005b. Efektifitas vaksin polivalen untuk pengendalian vibriosis pada kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*). *J. Perikanan*, 2: 95–100.
- Poobalane, S., K.D. Thompson, A. Diab, L. Ardo, G. Jeney & A. Adams. 2008. Protein expression by *Aeromonas hydrophila* during growth *in vitro* and *in vivo*. *Microbial Pathogenesis*, 45(1): 60-69
- Rahman, M.H. & K. Kawai. 2000. Outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila* induce protective immunity in goldfish. *Fish and shellfish immunology*, 10: 379-382.
- Rahman, M.H., A.Kuroda, J.M. Dijkstra, I. Kiryu, T. Nakanishi & M. Ototake. 2002. The outer membrane fraction of *Flavobacterium psychrophilum* induces protective immunity in rainbow trout and ayu. *Fish and shellfish immunology*, 12: 169-179
- Salati, F. 1988. Vaccination against *Edwardsiella tarda*. *In*: Ellis, A.E. (Ed), *Fish vaccination*. Academic Press, San Diego, CA. : 135–151.
- Sprott, G.D., S.F.Koval & C.A. Schnaitman. 1994. Cell Fractionation. Pages 72 – 103 *In*: Gerhardt, P., R.G.E. Murray, W. A.Wood & N.R. Krieg (Eds.). *Methods for General and Molecular Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington D.C. 791 pp
- Sun, K., W. Zang, J. Hou & L. Sun. 2009. Immunoprotective analysis of VhhP2, a *Vibrio harveyi* vaccine candidate. *Vaccine*, : 2733-2740.
- Taslihan, A., M. Murdjani, C. Purbomartono & E. Kusnendar. 2000. Bakteri patogen penyebab penyakit mulut merah pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*). *J. Perikanan*, II(2): 57-62.
- Van derWoude, M.W., & A.J. Baumler. 2004. Phase and antigenic variation in bacteria. *Clinical Microbiology Review*, 17(3): 581– 611.
- Van Muiswinkel, W.B. & B.Vervorn-Van Der wal. 2006. The Immune System of Fish. Pages 678-701. *In*: Woo, P.T.K. (Editor). *Fish diseases and disorders Vol 1. Protozoan and metazoan infection*. CAB International, UK. 800 pp.