

EFIKASI VAKSIN BOOSTER *Streptococcus agalactiae* PADA INDUK IKAN NILA TERHADAP IMUNITAS MATERNAL UNTUK PENCEGAHAN STREPTOCOCCOSIS

Efficacy of Streptococcus agalactiae Booster Vaccine on Tilapia Broodstock to Maternal Immunity in Preventing Streptococcosis

Dendi Hidayatullah¹, Sukenda Sukenda^{1*}, Sri Nuryati¹, Rahma Mulyani², Ardana Kirniaji³

¹Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB University, Indonesia

²Program Studi Budi Daya Ikan, Universitas PGRI Palembang

³Politeknik Kelautan dan Perikanan Bone, Indonesia

*corresponding author: sukenda@apps.ipb.ac.id

ABSTRAK

Bakteri *Streptococcus agalactiae* merupakan patogen utama yang menyerang ikan nila mulai fase benih hingga dewasa. Tujuan penelitian ini yaitu untuk menguji efikasi vaksin booster *S. agalactiae* di induk ikan nila sebelum pemijahan kedua terhadap imunitas maternal untuk pencegahan streptococcosis. Vaksin gabungan sediaan sel utuh dan produk ekstraselular (ECP) *S. agalactiae* diinjeksi sebanyak 0,4 mL/kg induk ikan dengan perbandingan 50:50% (v/v) dari dosis penyuntikan, sedangkan kontrol diinjeksi dengan phosphate buffered saline (PBS). Vaksin diberikan ke induk ikan pada fase tingkat kematangan gonad dua (TKG 2). Perlakuan penelitian yaitu induk diinjeksi PBS (K), induk diinjeksi menggunakan vaksin sebanyak satu kali (A), dan induk diinjeksi menggunakan vaksin booster setelah pemijahan pertama (B). Ujiantang benih dari setiap induk perlakuan dilakukan melalui perendaman *S. agalactiae* 10^7 CFU/mL selama 30 menit pada umur benih 5, 10, 15, dan 20 hari setelah menetas. Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) pada total leukosit dan aktivitas fagositik induk ikan. Level antibodi dan lisozim telur, benih, dan induk dari perlakuan B signifikan lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan terhadap perlakuan induk lainnya. Daya tetas telur dari perlakuan induk B (94,52%) signifikan lebih tinggi ($P < 0,05$) dari pada perlakuan induk lainnya. Nilai Relative percent Survival benih dari perlakuan induk B tidak berbeda signifikan ($P > 0,05$) dengan perlakuan benih dari induk A pada pengamatan hari ke-5 tetapi, signifikan lebih tinggi ($P < 0,05$) pada hari pengamatan ke-10 hingga 20 pascatetas (96,61-54,17%). Pemberian vaksin booster di induk ikan nila sebelum pemijahan kedua dapat menstimulasi peningkatan imunitas dan transfer imunitas maternal ke anaknya untuk pencegahan streptococcosis.

Kata Kunci: imunitas maternal, induk, nila, transfer, vaksin booster.

ABSTRACT

Streptococcus agalactiae is the main pathogen attacking tilapia during the fry-up to an adult phase. The purpose of the research was conducted to assess the efficacy of the *S. agalactiae* booster vaccine in tilapia broodstock before second spawning on the maternal immunity transfer to the fry in preventing streptococcosis. The combined whole cell and extracellular product vaccine of *S. agalactiae* were injected with 0.4 mL/kg of broodstock with a ratio of 50:50% (v/v) of the injection dose, while the control was injected with phosphate-buffered

*saline (PBS). Vaccinated broodstock at gonad developmental stage two. The research treatments were broodstock injected with PBS (K), vaccinated once before the first spawning (A), and vaccinated with a booster vaccine after the first spawning (B). Challenge tests for fry produced on every broodstock were performed by immersion of 10^7 CFU/mL *S. agalactiae* for 30 minutes at fry ages 5, 10, 15, and 20 days after hatching. The results showed that total leukocytes and phagocytic activity from broodstock B were significantly higher than the other broodstock. The antibody and lysozyme levels of broodstock, eggs, and fry from treatment B were significantly higher compared to other treatments. The hatchability of eggs from broodstock B treatment (94.52%) was significantly higher than the other broodstock. The relative percentage survival of fry from broodstock B was significantly highest on days 10 to 20 post-hatching (96.61-54.17%). Giving a booster vaccine in tilapia broodstock before the second spawning can stimulate immunity enhancement and transfer immunity from broodstock to fry for streptococcosis prevention.*

Keywords: booster vaccine, broodstock, maternal immunity, tilapia, transfer.

PENDAHULUAN

Bakteri *S. agalactiae* merupakan patogen utama di ikan nila. Bakteri tersebut menyebabkan kematian massal pada budidaya ikan nila di beberapa negara produsen ikan nila seperti China, Thailand, Malaysia dan Indonesia (Sheehan *et al.*, 2009). Bakteri ini menimbulkan penyakit streptococcosis mulai fase benih hingga fase dewasa pada ikan nila (Jantrakajorn *et al.*, 2014). Infeksi *Streptococcus* pada budidaya ikan nila intensif dapat menyebabkan tingkat kematian mencapai 90% populasi dan lebih dari 90% bakteri disebabkan oleh *S. agalactiae* (Chen *et al.*, 2012). Streptococcosis pada ikan yang disebabkan oleh *S. agalactiae* menyebabkan septicemia dan meningoencephalitis (Mian *et al.*, 2009). Hardi *et al.*, (2011) melaporkan bahwa ikan yang terserang patogen *S. agalactiae* memiliki gejala seperti pembengkakan pada mata (*exophthalmia*), kekeruhan pada mata (*opacity*), mata memutih (*purulens*), perubahan pola renang (*whirling*), dan penjernihan operkulum (*Clear operculum*).

Aspek yang berpengaruh terhadap keberhasilan budidaya ikan nila salah satunya adalah kualitas benih. Hal ini erat hubungannya dengan kualitas induk ikan.

Menurut Swain dan Nayak (2009), kesehatan dan status imun induk ikan sangat penting bukan hanya pada saat pemijahan tetapi juga untuk kesehatan benih yang dihasilkan. Adanya imunitas maternal yang ditransfer oleh induk menjadi esensial pada fase awal pertumbuhan benih. Hal ini penting karena pada awal pertumbuhan, kemampuan embrio dan benih ikan masih belum dapat mengembangkan respon imun dengan baik (Magnadottir *et al.*, 2005; Zapata *et al.*, 2006).

Vaksinasi ikan merupakan salah satu upaya pencegahan yang dapat dilakukan dalam mengatasi masalah penyakit dengan cara menginduksi kekebalan spesifik (Yi *et al.*, 2014). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa pemberian vaksin dari sediaan antigen sel utuh dan produk ekstraselular *S. agalactiae* mampu merangsang terbentuknya antibodi spesifik dan memproteksi ikan nila dari infeksi *S. agalactiae* (Hardi *et al.*, 2013; Amrullah *et al.*, 2014; Dwinanti *et al.*, 2014). Vaksin gabungan antara sel utuh dan produk ekstraselular *S. agalactiae* telah diketahui bersifat lebih imunogenik dibandingkan jika diberikan secara tunggal (Hardi *et al.*, 2013). Akan tetapi vaksinasi pada stadia benih melalui perendaman belum

menghasilkan perlindungan yang optimal terhadap nilai kelangsungan hidup yang relatif masih rendah (Sukenda et al., 2014). Padahal meningkatkan kekebalan pada ikan sedini mungkin adalah pendekatan yang lebih baik karena memberi proteksi terhadap serangan penyakit sedini mungkin (Bowden et al., 2005; Magnadottir et al., 2005).

Rekayasa transfer kekebalan maternal yang dilakukan pada induk ikan merupakan upaya dalam mencegah tingginya angka mortalitas anak ikan pada umur kurang dari satu bulan (Wang et al., 2012; Mingming et al., 2014). Salah satu alternatif yang dapat dilakukan yaitu melalui vaksinasi induk (Zhang et al., 2013; Sukenda et al., 2018). Penelitian pada beberapa spesies ikan telah menunjukkan bahwa antibodi dan lisozim induk ikan ditransfer dari induk ke

anaknyanya dan memberikan proteksi yang baik (Wang et al., 2012; Mulyani et al., 2018).

Vaksinasi induk ikan nila sebelum memijah pertama telah menunjukkan transfer imunitas maternal yang baik kepada benih di pemijahan pertama (Nisaa et al., 2016; Sukenda et al., 2018). Namun transfer imunitas maternal pada pemijahan kedua dari induk yang telah divaksin ke anaknya mengalami penurunan. Hal ini disebabkan karena dalam jangka waktu tertentu keberadaan antibodi dalam tubuh ikan dan tingkat proteksinya semakin menurun (Sukenda et al., 2015). Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian terkait pemberian vaksin booster di induk ikan nila pada pemijahan kedua dalam upaya meningkatkan transfer imunitas maternal induk ke anak ikan nila.

METODE PENELITIAN

Penyiapan induk ikan dan bakteri uji

Induk ikan nila yang digunakan adalah ikan nila strain Nirwana yang diperoleh dari Balai Pengembangan Benih Ikan Air Tawar, Wanayasa, Jawa Barat. Bobot induk ikan nila yang digunakan berukuran 200-300 gram. Induk ikan dipisahkan antara jantan dan betina. Induk ikan dipelihara dalam bak berukuran 3×2×1 m³ pada temperatur air 24-30 °C; pH 6,58-7,76; OD 4,5-6,7 ppm. Induk ikan diberi pakan dengan kadar protein 35-40% sebanyak dua kali dalam sehari secara *at satiation* dan dilakukan pergantian air setiap tiga hari sekali.

Bakteri *S. agalactiae* diperoleh dari koleksi Laboratorium Kesehatan Ikan, Instalasi Penelitian dan Pengembangan Pengendalian Penyakit Ikan BPPBAT Bogor. Bakteri *S. agalactiae* yang digunakan dalam penelitian dilakukan pemulihan virulensi dengan cara difasase. Bakteri *S. agalactiae* hasil fasase kemudian

dikarakterisasi menggunakan Kit API 20 Strept. Setelah bakteri dikarakterisasi ulang kemudian siap digunakan untuk pembuatan vaksin dan ujiantang.

Rancangan percobaan

Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimen menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan tiga perlakuan dan tiga ulangan. Perlakuan yang diberikan yaitu K; induk tanpa vaksinasi, A; induk divaksinasi satu kali sebelum pemijahan pertama, dan B; induk divaksinasi *booster* setelah pemijahan pertama atau sebelum pemijahan kedua.

Penyediaan vaksin uji

Vaksin yang digunakan adalah vaksin gabungan antara sel utuh dan produk ekstraselular (ECP) *S. agalactiae*. Metode pembuatan vaksin mengacu pada Hardi et al., (2013). Preparasi masing-masing vaksin dijelaskan sebagai berikut.

Preparasi vaksin sel utuh: Bakteri

dikultur dalam media *brain heart infusion* (BHI, BD Bacto™) cair dengan masa inkubasi 72 jam pada suhu 28-30 °C. Kepadatan akhir bakteri yang didapatkan yaitu 10⁹ CFU/mL. Media yang telah ditumbuhi bakteri ditambahkan 3% *neutral buffered formalin* dan diinkubasi selama 24 jam. Suspensi kemudian disentrifugasi 7.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4 °C. Endapan bakteri hasil sentrifugasi dicuci dengan *phosphate buffered saline* (PBS) sebanyak dua kali. Terakhir ditambahkan PBS sebanyak volume awal biakan bakteri. Vaksin yang telah jadi diuji viabilitasnya dengan menggores vaksin pada media BHI agar dalam cawan petri. Jika bakteri tidak tumbuh dalam waktu 72 jam, maka vaksin dapat digunakan untuk vaksinasi induk ikan.

Preparasi vaksin produk ekstraselular (ECP): Bakteri dikultur dalam media *brain heart infusion* (BHI, BD Bacto™) cair dengan masa inkubasi 72 jam pada suhu 28-30 °C. Media yang telah ditumbuhi bakteri ditambahkan 3% *neutral buffered formalin* dan diinkubasi selama 24 jam. Kemudian suspensi disentrifugasi 7.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4 °C. Vaksin ECP diperoleh dengan menyaring supernatan dengan filter saring 0,22 µm. Vaksin ECP kemudian diuji keamanannya dengan cara menyuntik vaksin ECP pada lima ekor ikan nila berukuran 10 gram sebanyak 0,1 mL/ekor. Jika hingga jam ke-72 tidak muncul kematian dan gejala streptococcosis maka vaksin ECP aman untuk digunakan.

Vaksinasi dan pemijahan induk ikan nila

Induk yang akan divaksinasi diambil sampel untuk dilihat tingkat kematangan gonadnya dengan metode kanulasi yaitu memasukkan selang kateter berdiameter 1 mm ke dalam lubang genital sedalam 2 – 4 cm lalu dihisap dan

dicabut secara perlahan-lahan. Vaksinasi induk diberikan pada fase tingkat kematangan gonad dua (TKG2). Vaksin diberikan melalui injeksi intraperitoneal. Vaksin diberikan ke induk ikan nila dengan dosis 0,4 mL/kg ikan. Vaksin sel utuh diberikan dengan konsentrasi 10⁹ CFU/mL. Kombinasi vaksin sel utuh dan ECP adalah 50:50% (v/v) dari dosis penyuntikan, sedangkan kontrol diinjeksi dengan PBS. Sebelum divaksinasi induk ikan dipingsankan terlebih dahulu dengan bus. Interval waktu vaksinasi pertama dan kedua yaitu satu bulan atau satu minggu setelah pemijahan pertama. Pemijahan dilakukan dalam hapa berukuran 1×1×1 m³ dengan perbandingan satu jantan dan tiga betina. Pemijahan dilakukan secara alami. Jarak antara waktu vaksinasi dan pemijahan yaitu tiga minggu.

Penetasan telur dan pemeliharaan benih

Ikan yang telah memijah dihitung fekunditas dan daya tetas telurnya. Telur yang telah dibuahi diperoleh dengan membuka mulut induk betina. Telur ikan nila kemudian ditetaskan dalam wadah akuarium berukuran 60×35×30 cm³ dan diberi aerasi yang cukup. Setelah telur menetas benih diberi pakan alami berupa cacing sutra secara *ad libitum* yang dimulai pada hari ke-7 (setelah kuning telur habis). Suhu pemeliharaan benih dijaga pada temperatur 28-29 °C; pH 6,85-7,68; dan OD 4,1-6,1 ppm. Pergantian air dilakukan setiap hari.

Uji tantang benih

Uji tantang benih dilakukan dari induk yang sebelumnya telah divaksin perlakuan dan kontrol melalui perendaman menggunakan konsentrasi bakteri patogen *S. agalactiae* 10⁷ CFU/mL selama 30 menit. Uji tantang dilakukan pada umur benih 5, 10, 15, dan 20 hari setelah menetas. Selanjutnya

benih dipelihara dalam akuarium berukuran 20×20×20 cm³ dengan kepadatan 30 ekor setiap akuarium. Kemudian mortalitas benih diamati setelah ujiantang selama 10 hari.

Preparasi sampel serum dari induk, telur, dan benih

Induk dan benih ikan dipingsankan dahulu menggunakan pembius ikan. Darah dari induk dikumpulkan melalui pembuluh vena dipangkal ekor. Darah disimpan dalam suhu ruang selama 1 jam dan selanjutnya disimpan semalaman pada suhu 4 °C. Serum dikumpulkan dengan cara disentrifugasi 5000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Serum kemudian dipisahkan ke dalam tabung mikro dan disimpan pada suhu -20 °C untuk digunakan pada pengujian antibodi dan lisozim.

Telur dikumpulkan sesaat setelah induk memijah, sedangkan sampel benih diambil pada hari ke-5, ke-10, ke-15, dan ke-20 setelah menetas. Telur dan benih yang terkumpul dihomogenkan dalam larutan PBS-T (PBS+0,05% Tween-20) dengan perbandingan 1:4. Selanjutnya disentrifugasi 5000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Supernatan kemudian dipisahkan ke dalam tabung mikro dan disimpan pada suhu -20 °C untuk digunakan pada pengujian antibodi dan lisozim.

Parameter penelitian

Parameter yang diamati pada induk yaitu level antibodi (Shelby et al., 2001), aktivitas lisozim (Ellis, 1990), gambaran darah (total eritrosit dan total leukosit (Blaxhall dan Daisley, 1973), hemoglobin (Wedemeyer dan Yasutake 1977), hematokrit, aktivitas fagositik (Anderson dan Siwicki, 1995)) serta fekunditas telur. Parameter yang diamati pada telur dan benih meliputi daya tetas telur, level antibodi, aktivitas lisozim,

mortalitas benih setelah ujiantang, *relative percent survival* (RPS) benih, dan patologi anatomi mikroskopis jaringan otak benih ikan.

Fekunditas dan daya tetas telur

Nilai fekunditas dilakukan dengan cara menghitung jumlah telur yang dihasilkan dari satu ekor induk ikan nila. Selanjutnya daya tetas telur dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut.

$$\text{Daya tetas telur (\%)} = \frac{\text{Jumlah telur menetas}}{\text{Total jumlah telur}} \times 100$$

Tingkat mortalitas benih

Tingkat mortalitas benih dihitung setelah ujiantang dengan *S. agalactiae*. Tingkat mortalitas benih dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Mortalitas (\%)} = \frac{\text{Jumlah ikan mati}}{\text{Jumlah populasi}} \times 100$$

Relative percent survival (RPS)

Relative percent survival benih dihitung untuk mengetahui efikasi transfer kekebalan maternal dari induk yang divaksin setelah ujiantang dengan *S. agalactiae*. Nilai RPS dihitung pada akhir ujiantang. Berikut merupakan rumus perhitungan RPS menurut Amend (1981):

$$\text{RPS (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Persentase mortalitas perlakuan}}{\text{Persentase mortalitas kontrol}}\right) \times 100$$

Patologi anatomi mikroskopis

Pengamatan patologi anatomi mikroskopis yang diamati yaitu perubahan jaringan otak benih ikan nila setelah ujiantang *S. agalactiae*. Pengamatan dilakukan dengan membuat preparat histologi dari jaringan otak benih ikan normal dan terserang *S. agalactiae*. Organ otak diambil dan difiksasi dalam larutan *neutral buffered formalin* 10% selama 24 jam yang selanjutnya dipindahkan dalam alkohol 70% sampai dilakukan proses pembuatan preparat

histologi dengan menggunakan pewarnaan hematoxylin dan eosin (Geten *et al.*, 2009).

Analisis data

Penelitian akan dilakukan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan tiga perlakuan dan tiga ulangan. Data yang diperoleh ditabulasi dengan menggunakan program *MS. Office Excel 2007*. Data dianalisis dengan menggunakan ANOVA melalui program Minitab versi 16 dengan tingkat selang kepercayaan 95%, jika signifikan maka akan diuji lanjut dengan uji lanjut Tukey's. Histologi jaringan otak benih ikan nila di analisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Gambaran Darah Induk Ikan Nila

Total eritrosit, hemoglobin, dan hematokrit tidak berbeda signifikan ($P>0,05$) antara semua perlakuan. Namun terdapat perbedaan ($P<0,05$) pada total leukosit dan aktivitas fagositik. Jumlah eritrosit induk ikan berkisar antara $2,03-2,35 \text{ sel/mm}^3$. Kadar hemoglobin berkisar antara $7,33-8,33 \text{ G\%}$. Kadar persentase hematokrit berkisar antara $30,76-32,78\%$. Jumlah leukosit tertinggi terdapat pada perlakuan B ($14,27 \times 10^4 \text{ sel/mm}^3$). Aktivitas fagositik tertinggi terdapat pada perlakuan B ($69,02\%$). Jumlah leukosit dan aktivitas fagositik pada perlakuan B tidak berbeda signifikan ($P<0,05$) dengan perlakuan lainnya. Gambaran darah induk ikan nila disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Gambaran darah induk ikan nila setelah vaksinasi: eritrosit, leukosit, hemoglobin (Hb), hematokrit (Hc), dan aktivitas fagositik (AF)

| Perlakuan | Σ Eritrosit ($\times 10^6$ sel/ mm^3) | Σ Leukosit ($\times 10^4$ sel/ mm^3) | Hb (G%) | Hc (%) | AF (%) |
|-----------|---|---|-------------------|--------------------|--------------------|
| K | $2,03 \pm 0,27^a$ | $7,97 \pm 0,86^c$ | $7,33 \pm 0,81^a$ | $30,76 \pm 3,45^a$ | $24,51 \pm 2,02^c$ |
| A | $2,11 \pm 0,19^a$ | $12,03 \pm 0,57^b$ | $7,47 \pm 0,70^a$ | $31,43 \pm 1,82^a$ | $49,75 \pm 3,24^b$ |
| B | $2,35 \pm 0,08^a$ | $14,27 \pm 0,55^a$ | $8,33 \pm 0,40^a$ | $32,78 \pm 1,26^a$ | $69,02 \pm 1,53^a$ |

Keterangan: Huruf superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan yang berbeda nyata (Uji Tukey's; $P<0,05$).

Penelitian vaksinasi ikan terkait total eritrosit, hemoglobin, dan hematokrit pada ikan nila yang divaksin telah dilaporkan juga tidak berbeda signifikan (Sukenda *et al.*, 2014). Namun, terdapat perbedaan gambaran darah total leukosit dan aktivitas fagositik (Hardi *et al.*, 2013). Hardi *et al.*, (2013) dan Amrullah *et al.*, (2014) melaporkan terjadi peningkatan total leukosit dan aktivitas fagositik pada ikan nila yang diberi vaksin. Sel leukosit seperti neutrofil dan monosit merupakan sel-sel fagosit yang aktif ketika ada benda asing yang masuk kedalam tubuh sebagai pertahanan nonspesifik (Katzenback & Belosevic, 2009).

Level antibodi induk, telur, dan benih

Level antibodi tertinggi terdapat pada perlakuan induk B (OD: 0,20) dan terendah terdapat pada perlakuan induk K (OD: 0,10). Level antibodi perlakuan induk yaitu OD: 0,14. Level antibodi telur hasil pemijahan induk yang divaksin *booster* memiliki nilai yang signifikan lebih tinggi ($P<0,05$) dari pada perlakuan lainnya yaitu OD: 0,23. Level antibodi benih dari semua perlakuan induk yang divaksin mengalami penurunan dari hari ke-5 hingga hari ke-20. Level antibodi tertinggi dihari ke-5 terdapat pada benih

dari perlakuan induk B (OD: 0,20) dan menurun pada hari ke-20 (OD: 0,12).

Level antibodi dari induk, telur, dan benih ikan nila disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Level antibodi induk, telur dan benih ikan nila

| Perla kuan | OD <i>Indirect-ELISA</i> pada $\lambda=405$ | | | | | |
|---------------|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Induk | Telur | Benih | | | |
| | | | 5 hari | 10 hari | 15 hari | 20 hari |
| K | 0,100±0,005 ^c | 0,111±0,007 ^c | 0,087±0,015 ^c | 0,09±0,009 ^c | 0,086±0,006 ^c | 0,87±0,005 ^b |
| A | 0,139±0,007 ^b | 0,176±0,007 ^b | 0,148±0,004 ^b | 0,119±0,008 ^b | 0,104±0,004 ^b | 0,098±0,004 ^b |
| B | 0,202±0,009 ^a | 0,226±0,010 ^a | 0,196±0,005 ^a | 0,149±0,007 ^a | 0,124±0,004 ^a | 0,117±0,007 ^a |

Keterangan: Huruf superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan yang berbeda nyata (Uji Tukey's; $P < 0,05$).

Pemberian vaksin gabungan sel utuh dan ECP pada ikan nila mampu menginduksi tubuh untuk memproduksi antibodi spesifik (Hardi *et al.*, 2013). Sukenda *et al.*, (2018) melaporkan bahwa induk yang divaksin dengan sediaan vaksin gabungan sel utuh dan ECP mampu meningkatkan level antibodi induk dan benih yang dihasilkan. Zhang *et al.*, (2014) menjelaskan bahwa level antibodi ikan meningkat ketika diberi vaksin *booster*.

Antibodi ditemukan dalam konsentrasi yang tinggi pada serum ikan (Magnadottir, 2010). Antibodi dari induk ikan ditransfer bersama dengan vitelogenin ke dalam telur pada proses vitelogenesis (Swain & Nayak, 2009; Wang *et al.*, 2011). Penelitian pada beberapa spesies ikan menunjukkan bahwa antibodi dapat ditransfer dari induk ke anaknya (Swain *et al.*, 2006). Nilai level antibodi spesifik terhadap *S. agalactiae* pada benih secara perlahan mengalami penurunan hingga hari ke-20 diseluruh perlakuan. Zhang *et al.*, (2013) dan Kurniaji *et al.*, (2018) menjelaskan bahwa antibodi spesifik yang ditransfer oleh induk ikan ke anaknya

melalui imunitas maternal secara alami ikut termetabolisme bersama dengan kuning telur sehingga kadarnya semakin menurun.

Aktivitas lisozim induk, telur, dan benih ikan nila

Aktivitas lisozim tertinggi terdapat pada perlakuan induk B (291,11 U/mL) dan tidak berbeda signifikan ($P > 0,05$). Aktivitas lisozim telur perlakuan induk B berbeda signifikan lebih tinggi ($P < 0,05$) dari telur perlakuan induk A (93,78 U/mL) dan K (63,56 U/mL). Aktivitas lisozim benih dari perlakuan induk K, A, dan B menurun dihari ke-10 dan kemudian meningkat hingga hari ke-20. Aktivitas lisozim benih dari induk perlakuan B memiliki aktivitas lisozim yang signifikan ($P < 0,05$) lebih tinggi dibandingkan perlakuan lainnya hingga hari ke-20 yaitu 100,44-228,71 U/mL. Aktivitas lisozim benih dari induk perlakuan A tidak berbeda signifikan ($P > 0,05$) dengan perlakuan K mulai hari ke-5 hingga hari ke-20. Aktivitas lisozim induk, telur, dan benih ikan nila disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Aktivitas lisozim induk, telur, dan benih ikan nila

| Perlakuan n | Aktivitas Lisozim (U/mL) | | | | | |
|----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Induk | Telur | Benih | | | |
| | | | 5 hari | 10 hari | 15 hari | 20 hari |
| K | 167,78±15,69 ^c | 63,56±17,35 ^b | 25,78±11,95 ^c | 41,78±7,34 ^b | 80,89±13,42 ^c | 132,44±11,34 ^b |
| A | 235,67±23,14 ^b | 93,78±16,07 ^b | 84,44±6,01 ^b | 57,78±5,55 ^b | 107,11±7,34 ^b | 150,67±8,11 ^b |
| B | 291,11±18,83 ^a | 151,56±21,43 ^a | 118,22±10,69 ^a | 100,44±6,84 ^a | 204,89±15,57 ^a | 228,60±8,29 ^a |

Keterangan: Huruf superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan yang berbeda nyata (Uji Tukey's; P<0,05).

Beberapa penelitian menjelaskan bahwa pemberian vaksin bukan hanya meningkatkan respon imun spesifik tetapi juga meningkatkan respon imun non-spesifik (Swain dan Nayak, 2009; Wang et al., 2013). Enzim lisozim mengandung muramidase yang dapat merusak ikatan antara asam N-asetilglukosamin dengan N-asetilmuramic dalam dinding sel bakteri gram positif (Marsh dan Rice, 2010). Pada tahap awal, lisozim adalah salah satu protein penting yang terlibat dalam pertahanan non-spesifik (Huttenhuis et al., 2006; Wang & Zhang, 2010). Lisozim muncul di awal pengembangan ikan, sebelum atau segera setelah menetas dan keberadaannya sangat penting terhadap kekebalan benih ikan (Magnadottir, 2006).

Fekunditas dan daya tetas telur

Fekunditas telur dari semua induk perlakuan tidak berbeda signifikan (P>0,05) pada semua perlakuan. Fekunditas telur dari induk yang divaksin berkisar antara 1362,67-1527,33 butir. Namun, terdapat perbedaan yang signifikan (P<0,05) terhadap daya tetas telur. Perlakuan induk K memiliki aktivitas lisozim yang signifikan lebih rendah (P<0,05) dibandingkan perlakuan lainnya. Daya tetas telur tertinggi terdapat pada perlakuan induk B (94,52%). Namun, daya tetas telur dari induk perlakuan B signifikan lebih tinggi (P<0,05) dibandingkan induk A dan K. Daya tetas telur perlakuan induk K berbeda signifikan dengan perlakuan induk A (84,64%). Fekunditas dan daya tetas telur disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Fekunditas dan daya tetas telur ikan nila

| Perlakuan | Fekunditas Telur (Butir) | Daya Tetas Telur (%) |
|-----------|-----------------------------|-------------------------|
| K | 1362,67±123,84 ^a | 73,72±6,38 ^c |
| A | 1372,33±148,50 ^a | 84,64±4,58 ^b |
| B | 1527,33±80,16 ^a | 94,52±1,98 ^a |

Keterangan: Huruf superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan yang berbeda nyata (Uji Tukey's; P<0,05).

Jika dibandingkan dengan perlakuan K, telur dari induk yang divaksin *booster* (B) terjadi peningkatan daya tetas telur, namun tidak terjadi penurunan pada perlakuan induk A. Hal ini menunjukkan komponen lisozim dan antibodi yang ditransfer oleh induk telah memberikan pertahanan antibakteri untuk telur dan meningkatkan keberhasilan

penetasan dan sintasan (Hanif et al., 2005).

Relative percent survival (RPS) benih

Benih dari perlakuan induk K + dan B tidak berbeda signifikan (P>0,05), dan memiliki nilai RPS lebih tinggi (P<0,05) dibandingkan dengan benih perlakuan induk A pascauji tantang *S. agalactiae*. Nilai RPS benih hari ke-5 dari perlakuan

induk A dan B berturut-turut yaitu 85,60% dan 98,33%. Nilai RPS benih perlakuan induk A dan B menurun hingga hari ke-20

yaitu berturut-turut 19,93% dan 54,17%. Nilai RPS benih ikan nila disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Tingkat mortalitas setelah infeksi *S. agalactiae* dan *relative percent survival* benih ikan nila pada pemijahan kedua dari perlakuan induk diinjeksi PBS (K), induk diinjeksi vaksin satu kali (A), dan induk diinjeksi vaksin *booster* dengan selang waktu satu bulan (B)

| Umur Benih (Hari) | Mortalitas(%) | | | RPS(%) | |
|-------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | K | A | B | A | B |
| 5 | 61,11±5,09 ^a | 8,89±3,33 ^b | 1,11±1,92 ^b | 85,60±7,75 ^a | 98,33±2,89 ^a |
| 10 | 70,00±3,33 ^a | 22,22±5,09 ^b | 6,67±3,33 ^c | 68,43±5,88 ^b | 90,61±4,32 ^a |
| 15 | 76,67±3,33 ^a | 37,78±6,94 ^b | 17,78±5,09 ^c | 50,86±7,84 ^b | 81,20±1,80 ^a |
| 20 | 77,78±5,09 ^a | 62,22±3,85 ^b | 35,56±5,09 ^c | 19,93±6,18 ^b | 54,17±7,53 ^a |

Keterangan: Huruf superskrip yang berbeda pada umur benih dan parameter yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan yang berbeda nyata (Uji Tukey's; P<0,05).

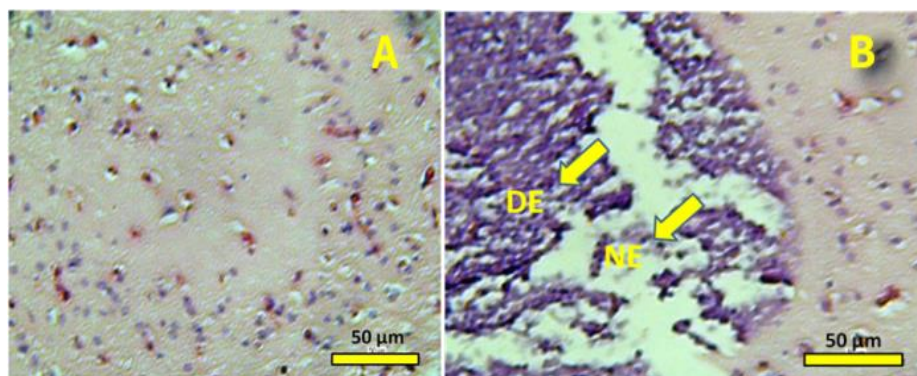
Terjadi penurunan tingkat proteksi benih hasil pemijahan kedua dari perlakuan induk A. Benih dari induk perlakuan B memiliki nilai RPS yang lebih tinggi dari benih perlakuan induk A. Pemberian vaksin pada induk ikan telah diketahui mampu meningkatkan proteksi benih yang dihasilkan dari serangan patogen (Wang et al., 2012; Sukenda et al., 2017).

Tingginya nilai RPS benih dari perlakuan induk B disebabkan oleh tingginya antibodi dan lisozim yang ditransfer oleh induk ikan nila. Transfer antibodi maternal ke telur dan embrio juga dilaporkan dapat bertindak sebagai opsonin yang dapat memfasilitasi proses fagositosis bakteri oleh sel fagosit serta mengaktifkan komplemen (Magnadottir

et al., 2005). Antibodi maternal dari induk ikan dapat mengurangi resiko kematian selama masa perkembangan benih ikan (Grindstaff, 2008; Nisaa et al., 2017). Hal ini menunjukkan bahwa antibodi spesifik memainkan peran penting dalam perlindungan ikan terhadap infeksi patogen.

Patologi anatomi mikroskopis

Hasil histologi organ otak benih ikan setelah uji tantangan menunjukkan adanya perubahan patologi anatomi mikroskopis. Otak ikan yang terinfeksi *S. agalactiae* terlihat mengalami nekrosis dan degenerasi, sedang tidak terlihat pada otak ikan normal. Hasil histologi jaringan otak benih ikan nila disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Patologi anatomi mikroskopis pada jaringan otak benih ikan nila setelah infeksi *S. agalactiae*: A) Jaringan otak normal; B) Jaringan otak terserang *S. agalactiae* mengalami nekrosis (Ne) dan Degenerasi (De)

Nekrosis adalah hilangnya jaringan setelah terjadinya degenerasi jaringan, degenerasi jaringan biasanya dapat dilihat pada tepian jaringan yang mengalami kerusakan. Filho *et al.*, (2009) melaporkan bahwa *S. agalactiae* menyerang organ otak, hati, mata, dan ginjal ikan nila. Hardi *et al.*, (2011) juga menjelaskan bahwa jaringan otak ikan nila yang terserang *S. agalactiae* mengalami degenerasi dan nekrosis sehingga menyebabkan ikan mengalami perubahan pola renang (*whirling*).

SIMPULAN

Pemberian vaksin booster *S. agalactiae* di induk ikan nila sebelum pemijahan kedua dapat menstimulasi peningkatan imunitas dan transfer imunitas maternal ke anaknya untuk pencegahan streptococcosis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Kesehatan Organisme Akuatik FPIK IPB atas bantuan fasilitas yang diberikan selama penelitian serta Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan, Bogor, Jawa Barat, Indonesia atas bantuannya dalam penyediaan isolate *Streptococcus agalactiae*.

DAFTAR PUSTAKA Amend, D.F. 1981. Potency testing of fish vaccines. *Developments in biological standardization*, 49: 447-454.

Amrullah, Sukenda, Harris, E., Alimuddin, & Lusiastuti, A.M. 2014. Immunogenicity of the 89 kDa toxin protein from extracellular products of *Streptococcus* in *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fisheries & Aquatic Science*, 9: 176-186.

Anderson, D.P., & Siwicki, A.K. 1995. Basic haematology and serology for fish health programs. Paper presented at the 2nd symposium on disease in Asia aquaculture. *Aquatic animal health and the environment*, Phuket, p 17.

Blaxhall, P.C., & Daisley, K.W. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology*, 5: 577-581.

Bowden, T.J., Cook, P., Rombout, J.H.W.M. 2005. Development and function of the thymus in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology*, 19: 413-427.

Chen, M., Li, L.P., Wang, R., Liang, W.W., Huang, Y., Li, J., Lei, A.Y., Huang, W.Y., Gan, X. 2012. PCR detection and PFGE genotype analyses of streptococcal clinical isolates from tilapia in China. *Veterinary Microbiology*, 159: 526-530.

Dwinanti, S.H., Sukenda, Yuhana. M., & Lusiastuti, A.M. 2014. Toksisitas dan imunogenisitas produk ekstraseluler *Streptococcus agalactiae* tipe non-hemolitik pada ikan nila *Oreochromis niloticus*. *Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia*, 2: 105-116.

Ellis, A. I. 1990. Lysozyme assays. *Techniques in Fish Immunology*, 1: 101-103.

Filho, C.I., Muller, E.E., Pretto-Giordano, L.G., & Bracarense, A.P. 2009. Histological finding of experimental *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Brazilian*

- Journal of Veterinary Pathology*, 2: 12-15.
- Genten, F., Terwinghe, E., & Danguy, A. 2009. Atlas of fish histology. New Hampshire US: Science Publishers.
- Grindstaff, J.L. 2008. Maternal antibodies reduce costs of an immune response during development. *Journal of Experimental Biology*, 211: 654-660.
- Hanif, A., Bakopoulos, V., & Dimitriadis, G.J. 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.
- Hardi, E.H., Sukenda, Harris, E., & Lusiastuti, A.M. 2011. Karakteristik dan patogenisitas *Streptococcus agalactiae* tipe β -hemolitik dan non-hemolitik pada ikan nila. *Jurnal Veteriner*, 12: 151-164.
- Hardi, E.H., Sukenda, Harris, E., & Lusiastuti, AM. 2013. Kandidat vaksin potensial *Streptococcus agalactiae* untuk pencegahan penyakit streptococcosis pada ikan nila *Oreochromis niloticus*. *Jurnal Veteriner*, 14: 408-416.
- Huttenhuis, H.B.T., Grou, C.P.O., Taverne-Thiele, A.J., Taverne, N., & Rombout, J.H.M.W. 2006. Carp *Cyprinus carpio* L. innate immune factors are present before hatching. *Fish & Shellfish Immunology*, 20: 586-596.
- Jantrakajorn, S., Maisak, H., & Wongtavatchai, J. 2014. Comprehensive investigation of streptococcosis outbreaks in cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, and red tilapia, *Oreochromis* sp., of Thailand. *Journal of the World Aquaculture Society*, 45: 392-402.
- Katzenback, B.A., & Belosevic, M. 2009. Isolation and functional characterization of neutrophil-like cells, from goldfish *Carassius auratus* L. kidney. *Developmental and Comparative Immunology*, 33: 601-611.
- Magnadottir, B., Lange, S., Gudmundsdottir, S., & Bogwald, J., Dalm, RA. 2005. Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 19: 429-439.
- Magnadottir, B. 2006. Innate immunity of fish: overview. *Fish & Shellfish Immunology*, 20: 137-151.
- Magnadottir, B. 2010. Immunological control of fish diseases. *Journal of Marine Biotechnology*, 12: 361-379.
- Marsh, M.B., & Rice, C.D. 2010. Development, characterization, and technical applications of a fish lysozyme-specific monoclonal antibody (mAb M24-2). *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 33: 15-23.
- Mian, G.F., Godoy, D.T., Leal, C.A.G., Yuhara, T.Y., Costa, G.M., & Figueiredo. 2009. Aspect of the natural history and virulence of *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia. *Journal of*

- Veterinary Microbiology*, 136: 180-183.
- Mingming, H., FuHong, D., Zhen, M., & Jilin, L. 2014. The effect of vaccinating turbot broodstocks on the maternal immunity transfer to offspring immunity. *Fish & Shellfish Immunology*, 39: 118-124.
- Mulyani, R., Sukenda, S., & Nuryati S. 2019. Efficacy of *Aeromonas hydrophila* formalin-killed cells and lipopolysaccharides vaccines in maternal immunity of tilapia broodstock and the offspring resistance. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 18: 141-151.
- Nisaa, K., Sukenda, Junior, M.Z., Lusiastuti, A.M., & Nuryati, S. 2016. Resistance of tilapia *Oreochromis niloticus* fry vaccinated at different gonadal developmental stages toward *Streptococcus agalactiae* infection. *Jurnal Veteriner*, 17: 355-364.
- Nisaa, K., Sukenda, Junior, M.Z., Lusiastuti, A.M., & Nuryati, S. 2017. Fry tilapia *Oreochromis niloticus* antibodi improvment against *Streptococcus agalactiae* trough broodstock vaccination. *Pakistan Journal of Biotechnology*, 14: 9-16.
- Sukenda, Febriansyah, T.R., & Nuryati, S. 2014. Efikasi vaksin sel utuh *Streptococcus agalactiae* pada ikan nila *Oreochromis niloticus* melalui perendaman. *Jurnal Akuakultur Indonesi*, 13: 83-93.
- Sukenda, Rusli, Nuryati, S., & Hidayatullah, D. 2015. Durasi proteksi vaksin *Streptococcus agalactiae* untuk pencegahan streptococcosis pada ikan nila. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 14: 192-201.
- Sukenda, Carman, O., Rahman, Hidayatullah, D., & Yumaidawati, N.S. 2017. Vaccination in tilapia broodstock with whole cell and disease resistance in its offspring against *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 16: 268-276.
- Sukenda, Rahman, Nisaa, K., Hidayatullah, D., & Vinasiam, A. 2018. The efficacy of *Streptococcus agalactiae* vaccine preparations, administered to tilapia broodstock, in preventing streptococcosis in their offspring, via transfer of maternal immunity. *Aquaculture International*, 26: 785-798.
- Swain, P., Dash, S., Bal, J., Routray, P., Sahoo, P.K., Sahoo, S.K., Saurabh, S., Gupta, S.D., & Meher, P.K. 2006. Passive transfer of maternal antibodies and their existence in eggs, larvae and fry of Indian major carp, *Labeo rohita*. *Fish & Shellfish Immunology*, 20: 519-527.
- Swain, P., & Nayak, S.K. 2009. Role of maternally derived immunity in fish. *Fish and Shellfish immunology*, 27: 89-99.
- Wang, Z.P., & Zhang, S.C. 2010. The role of lysozyme and complement in the antibacterial activity of zebrafish *Danio rerio* egg cytosol. *Fish & Shellfish Immunology*, 29: 773-777.
- Wang, S.H., Wang, Y., Ma, J., Ding, Y.C., Zhang, S.C. 2011. Phosvitin plays a critical role in the immunity of zebrafish embryos via acting as a pattern recognition receptor and an

- antimicrobial effector. *Journal of Biological Chemistry*, 286: 22653–22664.
- Wang, H., Ji, D., Shao, J., & Zhang, S. (2012). Maternal transfer and protective role of antibodies in zebrafish *Danio rerio*. *Molecular Immunology*, 51: 332–336.
- Wang, N., Yang, Z., Zang, M., Liu, Y., & Lu, C. 2013. Identification of Omp38 by immunoproteomic analysis and evaluation as a potential vaccine antigen against *Aeromonas hydrophila* in Chinese breams. *Fish & Shellfish Immunology*, 34: 74-81.
- Wedemeyer, I.W.T., & Yasutake, W.T. 1977. Clinical methods for the assessment of the effect on environmental stress on fish health. *Journal Fish Wildlife Service*, 89: 1–17.
- Yang, W., & Li, A. 2009. Isolation and characterization of *Streptococcus dysgalactiae* from diseased *Acipenser schrenckii*. *Aquaculture*, 294: 14-17.
- Yi,T., Li, W.Y., Liu, L., Xiao, X.X., & Li, A.X. 2014. Protection of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. against *Streptococcus agalactiae* following immunization with recombinant FbsA and α -enolase. *Aquaculture*, 428–429: 35–40.
- Zapata, A., Díez, B., Cejalvo, T., Gutiérrez-de, C.F., & Cortés, A. 2006. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 20: 126–136.
- Zhang, S., Wang, Z., & Wang, H. 2013. Maternal immunity in fish: Review. *Developmental & Comparative Immunology*, 39: 72–78.
- Zhang, Z.H., Wu, H.Z., Xiao, J.F., Wang, O.Y., Liu, Q., & Zhang, Y.X. 2014. Booster vaccination with live attenuated *Vibrio anguillarum* elicits strong protection despite weak specific antibody response in zebrafish. *Journal of Applied Ichthyology*, 30: 117–120.