



**PENYIMPANAN VAKSIN INAKTIF *WHOLE CELL*  
*Aeromonas salmonicida* DENGAN PENAMBAHAN GLISEROL<sup>©</sup>**

Rinda Aryani Putri<sup>\*</sup>, Wardiyanto<sup>†</sup> dan Agus Setyawan<sup>†,‡</sup>

**ABSTRAK**

Vaksin inaktif *whole cell A. salmonicida* memiliki tingkat imunogenesitas yang cukup tinggi pada ikan mas (*Cyprinus carpio*). Untuk menjaga stabilitas imunogenesitas vaksin tersebut, perlu dilakukan penyimpanan yang baik. Gliserol diketahui mampu menjaga keutuhan sel dalam penyimpanan dingin. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui dosis gliserol terbaik dalam penyimpanan vaksin *whole cell A. salmonicida*. Vaksin diinaktifasi dengan formalin 1% dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu ruang. Kepadatan vaksin dihitung lalu ditambahkan gliserol dengan dosis 0,25%, 0,5%, 0,75% dan 2 perlakuan lain sebagai kontrol positif (vaksin tanpa gliserol) dan negatif (tanpa vaksin, berisi PBS). Vaksin diujikan pada 10 ekor ikan mas per perlakuan dengan cara penyuntikan *intraperitoneal* ( $10^7$  sel/ikan). Seminggu berikutnya dilakukan *booster* dengan metode dan dosis yang sama. Vaksinasi dan booster dilakukan pada penyimpanan vaksin 0 hari dan 30 hari dengan menggunakan ikan mas yang berbeda. Titer antibodi diamati sebelum vaksinasi, seminggu setelah vaksinasi, dan seminggu setelah *booster*, baik pada penyimpanan 0 hari dan 30 hari. Parameter pendukung kualitas air akuarium diamati setiap hari meliputi DO, pH dan suhu. Hasil penelitian menunjukkan tingkat titer antibodi tertinggi pada vaksin dengan penambahan dosis gliserol 0,5% dengan rata-rata 256 kali pengenceran pada uji penyimpanan vaksin 30 hari. Hasil pengukuran kualitas air, secara umum masih berada dalam kisaran normal untuk kelangsungan hidup ikan mas. Kesimpulan dari penelitian ini yaitu dosis gliserol terbaik dalam mempertahankan tingkat imunogenesitas vaksin *A. salmonicida* adalah vaksin dengan penambahan gliserol 0,50%.

Kata kunci : *Aeromonas salmonicida*, gliserol, vaksin, titer antibodi, ikan mas

---

© e-JRTBP 2013

\* Mahasiswa Jurusan Budidaya Perairan

† Staf Pengajar Jurusan Budidaya Perairan Fakultas pertanian Unila

‡ Alamat Korespondensi : agus.san@gmail.com

## Pendahuluan

Penyakit pada ikan merupakan masalah yang umum dihadapi para pembudidaya ikan. Kerugian yang diakibatkan seperti penurunan kualitas ikan bahkan dapat mencapai kematian pada ikan. Cara menanggulangi permasalahan tersebut kebanyakan dilakukan dengan penggunaan bahan kimia dan antibiotika. Namun penggunaan bahan tersebut secara terus menerus dapat menyebabkan timbulnya resistensi dan bersifat residu pada ikan (Astuti *et al.*, 2003). Oleh sebab itu pencegahan penyakit dengan menggunakan bahan-bahan yang dapat menimbulkan kekebalan baik dengan menggunakan vaksin maupun imunostimulan telah banyak dilaksanakan.

Vaksin inaktif *whole cell* *A. Salmonicida* memiliki tingkat imunogenesitas yang cukup tinggi, ditunjukkan dengan titer antibodi mencapai  $2^7$  pada ikan mas (Setyawan *et al.*, 2012). Belum diketahui metode penyimpanan vaksin yang tepat untuk menghindari kerusakan pada vaksin tersebut, karena vaksin dapat rusak dengan cepat apabila kondisi tempat penyimpanan tidak baik (Meek, 2004). Selama ini penyimpanan vaksin dilakukan dengan menyimpan dalam lemari es (*refrigerator*) (suhu  $\pm 4^\circ\text{C}$ ). Namun penyimpanan yang terlalu lama dalam *refrigerator* dapat menyebabkan perubahan struktur sel bakteri terutama bagian antigen karena terjadi dehidrasi. Gliserol merupakan salah satu bahan kimia yang mampu melindungi kerusakan sel dalam penyimpanan pada suhu dingin. Beberapa penelitian menunjukkan aplikasi penambahan gliserol dalam penyimpanan sperma domba (Rizzal, *et al.*, 2002), sel darah (Areman *et al.*, 1988) dan pengenceran

tris semen beku kambing peranakan Etawa (Tambing *et al.*, 2000) serta vaksin polivalen *Vibrio* (Retmonojoati, 2007). Tujuan dilakukannya penelitian ini yaitu untuk mengetahui dosis gliserol terbaik untuk penyimpanan vaksin *Aeromonas salmonicida*.

## Bahan dan Metode

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai dengan Mei 2012 di Laboratorium Budidaya Perikanan Fakultas Pertanian Universitas Lampung.

### Pembuatan Vaksin *A. salmonicida* dengan Penambahan Gliserol

Isolat bakteri *A. salmonicida* dikultur pada media cair TSB, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Pengkayaan dilakukan dengan memindahkan inokulum *A. salmonicida* dari media TSB ke TSA lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Kemudian bakteri *A. salmonicida* dipanen dan dimasukkan ke dalam *erlenmeyer*. Vaksin diinaktifasi dengan formalin 1% kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Uji viabilitas bakteri dilakukan pada medium spesifik GSP dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Jika bakteri sudah tidak tumbuh, formalin dicuci menggunakan PBS dengan cara disentrifuse dengan kecepatan 3500 rpm selama 30 menit. *Sentrifuse* dilakukan sebanyak 3 kali, setiap kali *sentrifuse*, *supernatant* dibuang. Kepadatan vaksin inaktif dihitung dengan *spektrofotometer* ( $\lambda=625$  nm) mengacu pada standar McFarland. Gliserol ditambahkan ke dalam vaksin sesuai perlakuan, kemudian vaksin disimpan dalam *refrigerator* selama 30 hari. Penelitian menggunakan gliserol yang ditambahkan ke dalam vaksin inaktif *A.*

*salmonicida* dalam 5 perlakuan yaitu, 3 perlakuan penambahan gliserol dan 2 perlakuan sebagai kontrol. Setiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Dosis pemberian vaksin mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Retmonoaji (2007). Perlakuannya adalah sebagai berikut :

Perlakuan A : Kontrol negatif tanpa pemberian vaksin maupun gliserol (berisi PBS)

Perlakuan B : Kontrol positif pemberian vaksin tanpa gliserol

Perlakuan C : Penambahan vaksin dengan gliserol 0,25%

Perlakuan D : Penambahan vaksin dengan gliserol 0,50%

Perlakuan E : Penambahan vaksin dengan gliserol 0,75%

#### **Pemeliharaan Ikan Uji**

Ikan mas (*Cyprinus carpio*) berasal dari Pagelaran, Kabupaten Peringsewu dengan ukuran  $\pm$  30 gr sebanyak 200 ekor, berat total  $\pm$  6000 gr . Ikan mas diadaptasikan selama 1 minggu di bak terkontrol. Ikan mas lalu dimasukkan ke dalam akuarium berukuran 60 x 40 x 40 cm dengan kepadatan 10 ekor per akuarium. Ikan dipelihara dan diberi aerasi serta diberi pakan pelet 2–3 kali sehari dengan pelet komersial secara *ad libitum*. Selama masa pemeliharaan dilakukan penyiponan dan pergantian air setiap hari.

#### **Vaksinasi**

Vaksin diberikan untuk setiap ikan uji dengan metode penyuntikan secara intraperitoneal (i.p) dengan dosis pemberian vaksin 0,1 ml/ikan dengan kepadatan bakteri  $10^7$  sel/ikan (Kamiso, *et al.*, 2005). Vaksinasi dilakukan 2 periode yaitu pada penyimpanan vaksin 0 hari dan 30 hari. Masing-masing periode vaksinasi menggunakan ikan uji yang berbeda.

Vaksinasi II (*booster*) dilakukan seminggu setelah vaksinasi I, baik pada penyimpanan 0 hari maupun 30 hari. Pengambilan sampel darah untuk uji titer antibodi dilakukan sebelum vaksinasi, seminggu setelah vaksinasi I, dan seminggu setelah vaksinasi II (*booster*), baik periode 0 hari maupun 30 hari. Pengambilan darah ikan dilakukan dengan menggunakan spuit 1ml,  $\frac{1}{2}$  in<sup>26</sup> G (Therumo<sup>TM</sup>) yang telah dibilas dengan larutan EDTA 10%. Darah diambil dari *vena caudalis*. Darah dimasukkan ke dalam *ependorph* 1,5 ml lalu disentrifuse pada kecepatan 3500 rpm selama 15 menit untuk mendapatkan serumnya. Serum disimpan dalam *freezer* (suhu -10°C) untuk digunakan dalam uji titer antibodi.

#### **Pengamatan**

##### **Titer Antibodi**

Pengujian titer antibodi dilakukan dengan metode mikro aglutinasi mengacu pada prosedur standar mikroaglutinasi (Robersson, 1990) dengan modifikasi. Prosedur secara lengkap yaitu 25 ml serum dimasukkan ke dalam sumuran 1 dan 2. Kemudian PBS 25 ml dimasukkan ke dalam sumuran 2 - 12. Pada sumuran 2 sampai 11 *direpipeting* untuk mengencerkan serum. Selanjutnya antigen 25 ml dimasukkan ke dalam sumuran 1-12, *mikrodilution plate* digoyang selama 3 menit dengan membentuk pola angka 8. Hasil titer diinkubasi dalam *refrigerator* selama 24 jam. Keesokan harinya dilakukan pengamatan reaksi aglutinasi pada masing-masing sumur. Adanya kabut berwarna putih yang menyebar ke seluruh sumuran berarti antibodi telah terbentuk

### Analisis Kualitas air

Parameter pendukung kualitas air meliputi DO, pH, dan suhu diukur setiap hari untuk mengetahui bahwa kisaran kualitas air masih berada dalam kisaran standar kehidupan ikan mas.

### Parameter Uji

Parameter utama yang diamati dalam penelitian ini adalah pengaruh penambahan gliserol yang dilihat dari titer antibodi dan parameter pendukung berupa kualitas air (suhu, DO, dan pH).

### Analisis Data

Data titer antibodi dan kualitas air akan disajikan dalam bentuk grafik dan tabel kemudian dianalisis secara deskriptif.

### Hasil dan Pembahasan

Pemilihan gliserol sebagai bahan yang ditambahkan dalam penyimpanan vaksin *A. salmonicida* dikarenakan gliserol dapat masuk ke dalam sel (*permeating agent*), berbeda dengan bahan lainnya yang tidak dapat masuk ke dalam sel (*non permeating agent*) seperti sukrosa dan gula alkohol (manitol, sorbitol). Gliserol merupakan bahan yang biasa digunakan untuk memelihara keutuhan membran dan meningkatkan potensi osmotik media sehingga cairan di dalam sel mengalir keluar dan terjadi dehidrasi (Tambunan dan Ika, 2003).

Suatu saat potensi vaksin akan hilang terutama bila terpapar panas, sinar matahari dan beberapa kasus terpapar oleh suhu dingin (Kristini, 2008). Sejauh ini vaksin memang disimpan dalam *refrigerator* untuk mempertahankan imunogenesitasnya. Namun disisi lain dampak penyimpanan dalam *refrigerator* terhadap sel akan mempengaruhi struktur dan fungsi seluler, misalnya penurunan proses metabolisme (Gazali dan Tambing, 2002). Apabila struktur

selnya mengalami perubahan maka tingkat imunogenesitas vaksin akan menurun. Sehingga diperlukan penanganan tertentu untuk meminimalisir terjadinya kerusakan vaksin, salah satu caranya yaitu dengan penambahan gliserol. Gliserol dapat mencegah kerusakan vaksin yang disimpan dalam *refrigerator* karena sel yang terdapat dalam vaksin akan terlapisi oleh gliserol, sehingga sel akan menjadi lebih elastis dan tidak mudah pecah (Retmonoaji, 2007).

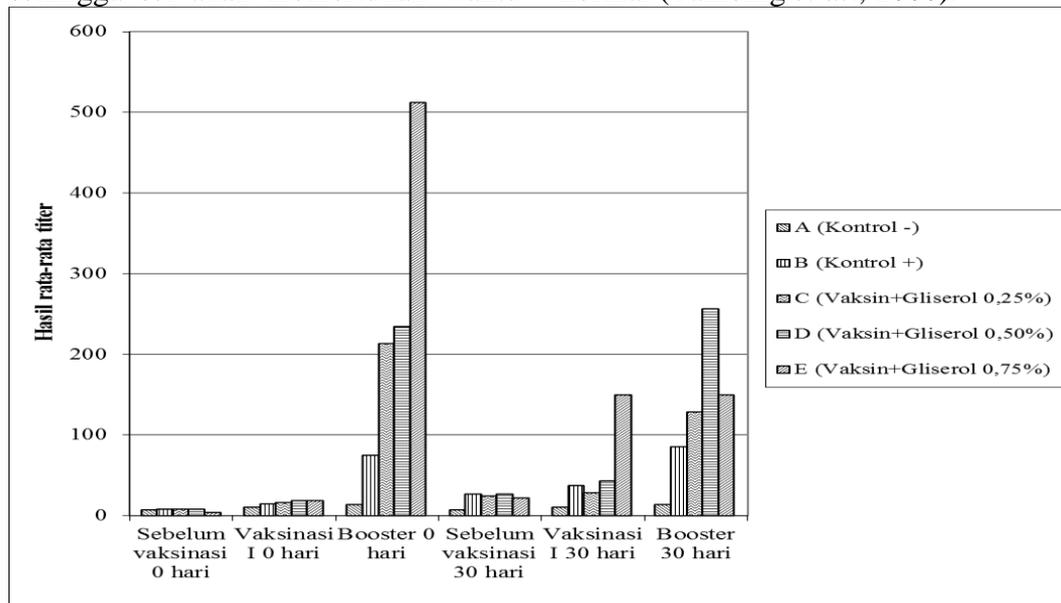
Vaksin yang ditambahkan gliserol disuntikkan ke dalam tubuh ikan akan masuk ke ginjal bagian depan dan dapat menghasilkan respon imun bawaan dalam meningkatkan respon imun aktif terhadap vaksin. Dalam ginjal bagian depan vaksin yang telah masuk *difagosit* oleh *makrofag* dan *neutropil* kemudian dibawa menuju timus yang mengandung sel T. Sel T merespon antigen tersebut ke reseptor khusus yang dikenali sebagai kompleks histokompatibilitas utama *Major Histocompatibility Sitokinin Complex* (MHC). Lalu antigen tersebut dibawa menuju limpa terjadi pelepasan *sitokinin* membentuk sel B. Sel B sebagian melakukan proliferasi atau memperbanyak diri dan sebagian lagi berdeferensiasi menjadi sel plasma dan sel B memori sebagai sistem kekebalan humoral. Antibodi akan terbentuk apabila sel penghasil antibodi yaitu sel limfosit (sel B) telah berfungsi dengan baik (Firdaus, 2004).

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa kecenderungan hasil titer antibodi semua perlakuan penambahan gliserol pada awal penyimpanan vaksin tinggi. Hal tersebut menunjukkan bahwa penambahan gliserol dengan dosis 0,25%, 0,5% dan 0,75% tidak akan

mengganggu aktivitas vaksin untuk merespon pembentukan antibodi dalam tubuh hewan yang divaksinasi (Retmonojati, 2007).

Hasil titer antibodi pada penyimpanan vaksin setelah 30 hari menunjukkan peningkatan hasil titer antibodi yang relatif stabil berada pada perlakuan D yaitu vaksin dengan penambahan gliserol 0,5% (Gambar 1). Sel yang disimpan dalam suhu dingin akan mengalami dehidrasi. Gliserol dapat mencegah terjadinya dehidrasi karena memiliki daya ikat yang kuat terhadap air (Supriatna dan Pasaribu, 1992) sehingga sel akan memerlukan waktu

yang cukup lama untuk mengeluarkan air. Gliserol masuk ke dalam membran plasma dengan menyesuaikan konsentrasi intraseluler dan ekstraseluler. Sehingga air yang keluar dari membran akan masuk kembali ke dalam membran dan selanjutnya akan menyeimbangkan kandungan air intraseluler dan ekstraseluler. Jadi respons membran plasma setelah terkena gliserol adalah terjadi pengeluaran air dari dalam sel terlebih dahulu, terjadi pengkerutan sel, kemudian gliserol masuk ke dalam sel sehingga ukuran sel dapat kembali normal (Tambing *et al.*, 2000).



Gambar 1. Grafik Titer Antibodi Penyimpanan Vaksin Selama 0 Hari sampai 30 Hari

Hasil titer antibodi pada perlakuan C yaitu vaksin dengan penambahan gliserol 0,25% dan perlakuan E yaitu vaksin dengan penambahan gliserol 0,75% meningkat tinggi pada awal penyimpanan vaksin dan setelah dilakukan penyimpanan selama 30 hari hasil titer antibodinya mengalami penurunan. Hal ini mungkin

disebabkan karena gliserol pada dosis 0,25% belum mampu mengurangi terjadinya dehidrasi karena konsentrasi molekul di luar sel tinggi, sehingga air di dalam sel keluar untuk mengencerkan molekul di luar sel (Rusiyantono *et al.*, 2000). Pada dosis 0,75% mungkin disebabkan karena konsentrasi molekul di dalam sel lebih

tinggi sehingga air masuk dengan cepat ke dalam sel yang mengakibatkan sel akan mengembang dan pecah (McLaughlin *et al.*, 1992).

Dosis gliserol optimum yang didapatkan dari hasil penelitian sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya dengan menggunakan vaksin polivalen *Vibrio*. Hasil yang didapatkan pada penelitian tersebut rata-rata titer antibodi semua perlakuan penambahan gliserol pada awal penyimpanan vaksin tinggi dan mengalami penurunan setelah memasuki bulan kedua, ketiga, dan keempat. Penurunan kualitas vaksin

yang relatif stabil berada pada vaksin dengan penambahan dosis gliserol 0,5% pada suhu *refrigerator* (Retmonoajati, 2007).

Faktor lingkungan dalam penelitian ini yang diamati yaitu kualitas air. Kualitas air media budidaya merupakan salah satu faktor yang berperan penting bagi timbulnya suatu penyakit pada ikan. Beberapa parameter kualitas air yang diamati yaitu suhu, DO dan pH. Semakin tinggi temperatur suhu maka semakin cepat produksi antibodi dan tingginya reaksi antibodi yang dihasilkan, begitu juga sebaliknya (Firdaus, 2004).

Tabel 1. Data Kualitas Air Selama Penelitian

Perlakuan	Parameter		
	DO (ppm)	Suhu ( $^{\circ}$ C)	pH
A	3,86 – 6,72	28 – 30	6 – 7
B	3,44 – 6,15	28 – 30	6 – 7
C	3,47 – 6,13	28 – 30	6 – 7
D	4,21 – 6,81	28 – 30	6 – 7
E	4,7 – 7,01	29 – 30	6 – 7
Baku Mutu *)	> 3	25 – 30	7 – 8

\*) Menurut Cholik, *et al.*, 1986

Hasil pengukuran kualitas air selama penelitian secara umum masih dalam kisaran optimum untuk kelangsungan hidup ikan mas (Tabel 1). Data yang didapatkan antara lain kisaran pH antara 6 - 7, kisaran DO 3 - 7,01 dan suhu air berkisar antara 28 - 30 $^{\circ}$ C. Hal ini sesuai dengan Cholik, *et al* (1986) yang menyebutkan bahwa kisaran optimum pH 7 - 8, DO > 3 dan suhu optimum 25 - 30 $^{\circ}$ C. Sesuai dengan pernyataan yang dikemukakan oleh Firdaus (2004) bahwa produksi antibodi akan tinggi pada suhu yang tinggi pula. Pengukuran pH dari hasil penelitian berkisar 6-7 sedikit dibawah kisaran optimum hidup ikan mas 6,5-9 (Tossin *et al.*, 2008) namun tidak

menimbulkan efek negatif bagi ikan mas selama masa pemeliharaan.

### Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa penambahan gliserol 0,50% dalam vaksin inaktif *A. salmonicida* merupakan dosis terbaik dalam penyimpanan pada lemari es (*refrigerator*) selama 30 hari. Berdasarkan penelitian ini kami menyarankan agar dilakukan penelitian lanjut dengan waktu yang lebih lama untuk penyimpanan vaksin dan dengan metode penyimpanan yang berbeda.

**Daftar Pustaka**

- Areman, E.M., Simonis, T.B., Carter, C.S., Read, E.J., dan Klein, H.G. 1988. Bulk Cryopreservation of Lymphocytes in Glycerol. *Transfusion* 28(2): 151 – 156.
- Astuti, P., Alam, G., Pratiwi, S.U.T., Hertiani, T., dan Wahyuono, S. 2003. Skrining senyawa anti infeksi dari spons yang dikoleksi dari Bunaken, Manado. *Biota*. 127: 47-52.
- Cholik, F., Artati dan Arifudin R. 1986. *Pengelolaan Kualitas Air Kolam*. INFIS Manual Seri Nomor 36. Dirjen Perikanan. Jakarta. 52 hal.
- Firdaus, A. 2004. *Pengaruh Pemberian Vitamin C Dalam Percobaan Immunoprolifaksis Terhadap Infeksi Bakteri Streptococcus iniae Pada Ikan Nila (Oreochromis niloticus Linne)*. Program Studi Teknologi Dan Managemen Akuakultur. Departemen Budidaya Perikanan. Fakultas Perikanan Dan Kelautan. Institut Pertanian Bogor.
- Gazali, M. dan Surya, N. T. 2002. Kriopreservasi Sel Spermatozoa. *Jurnal Hayati* 9(1): 27-32.
- Kamiso, N. H., Isnansetyo, A., Triyanto., Murdjani, M. dan Sholichah, L. 2005. Efektifitas vaksin polivalen untuk pengendalian vibriosis pada kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*). *Jurnal Perikanan* 7(2): 95-100.
- Kristini, T. D. 2008. *Faktor-Faktor Risiko Kualitas Pengelolaan Vaksin yang Buruk di Unit Pelayanan Swasta (Studi Kasus di Kota Semarang)*. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Mclaughlin, E.A., Ford, W.C.L., dan Hull, M.G.R. 1992. *The contribution of the toxicity of a glycerol-egg yolkcitrate cryopreservative to the decline in human sperm motility during cryopreservation*. *J. Reprod. Fert.*, 95 : 749-754.
- Meek. 2004. *Effect of Heat and Cold on Vaccines*. Proceeding of The National Vaccine Storage Whorkshop. Brisbane. <<http://www.pdfio.com/k-292092.html>>. Diakses tanggal 9 Desember 2011.
- Retmonoajati, K. 2007. *Penyimpanan Vaksin Polivalen Vibrio dengan Penambahan Adjuvant dan Gliserol*. Skripsi Jurusan Perikanan. Fakultas Pertanian, Universitas Gajahmada, Yogyakarta.
- Rizzal M., Toelihere. M.R., Yusuf, T.L., Purwantara, B. dan Situmorang, P. 2002. Kualitas Semen Beku Domba Garut dalam Berbagai Konsentrasi Gliserol. *J. Ilmu Ternak dan Veteriner* 7 (3): 194-199.
- Robersson, B.S. 1990. *Bacterial Agglutination*. In: J. S. Stolen, T. C. Fletcher, D.P. Anderson, B. S. Roberson, and W. B. Van Muiswinkle (eds). *Techniques In Fish Immunology*. SOS Publication, Fair Heaven, New Jersey. Hal 81-86.
- Rusiyantono, Y., Ahmad, B. Y., Sukra, M.R. Toelihere, Supriatna, dan B. Purwantara, 2000. *Pemakaian Etthylen Glicol dan Glicerol untuk Vitrifikasi Embrio Kambing In Vitro*. Direktorat Pembinaan Penelitian dan

- Pengabdian Pada Masyarakat Dirjen Dikti Diknas, Bogor.
- Setyawan A., Siti H., Zulfikar S., dan Sumino. 2012. *Imunogenesitas Vaksin Inaktif Whole Cell Aeromonas salmonicida Pada Ikan Mas (Cyprinus carpio)*. *Aquasains* 1(1) : 18-21.
- Supriatna, I. dan Pasaribu, F.H. 1992. *In Vitro Fertilisasi, Transfer Embrio dan Pembekuan Embrio*. Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Tambing, S.N., Mozes, R.T., Tuty, L.Y., Dan I-K. S. 2000. Pengaruh gliserol dalam pengencer Tris terhadap kualitas semen beku kambing Peranakan Etawah. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 5 (2) : 1-8
- Tambunan, I. R., dan Ika, M. 2003. Pemanfaatan Teknik Kriopreservasi dalam Penyimpanan Plasma Nutfah Tanaman. *Buletin Plasma Nutfah* 9 (2): 10-18.
- Tossin, M. R., Sunarto dan Sabariah. 2008. Pengaruh Dosis Pakan Berbeda Terhadap Pertumbuhan Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) dan Ikan Baung (*Macrones sp.*) dengan Sistem Cage-Cum-Cage. *J. Akuakultur Indonesia* 7(1): 59-64.