

TOKSISITAS DAN IMUNOGENISITAS PRODUK EKSTRASELULER *Mycobacterium fortuitum* PADA IKAN GURAME (*Osphronemus gouramy*)

Siti Fatimah^{*)}#, Agustin Indrawati^{**)}, dan Angela Mariana Lusiastuti^{***)}

^{*)} Direktorat Kesehatan Ikan dan Lingkungan, Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya

^{**)} Departemen Ilmu Penyakit Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

^{***)} Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar

(Naskah diterima: 26 September 2014; Revisi final: 1 Desember 2014, Disetujui publikasi: 5 Juni 2015)

ABSTRAK

Mycobacterium fortuitum merupakan bakteri patogen dengan kejadian penyakit bersifat kronis. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi tingkat toksisitas dan imunogenisitas produk ekstraseluler *M. fortuitum* pada ikan gurame. Pengujian toksisitas dilakukan pada ikan dengan bobot 15 g yang diinjeksi secara intraperitoneal (i.p) dengan konsentrasi ECP berbeda yaitu 7,15 µg/ikan; 14,3 µg/ikan; 28,6 µg/ikan; 57,2 µg/ikan; sedangkan kontrol dengan menggunakan PBS. Pengujian imunogenisitas dilakukan dengan menggunakan ikan seberat 25-30 g. Ikan dibagi dalam tiga perlakuan yaitu: ECP dengan Freund Incomplete Adjuvant (FIA), ECP, dan kontrol (sauthon broth). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa ECP *M. fortuitum* hingga konsentrasi 57,2 µg/ikan tidak toksik pada ikan gurame. Sementara, tingkat imunogenisitas menunjukkan bahwa ikan yang diinjeksi dengan ECP ditambah FIA dan ECP saja memiliki respons imun non-spesifik dan spesifik yang lebih tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa ECP *M. fortuitum* bersifat imunogenik pada ikan gurame sehingga berpotensi untuk dikembangkan sebagai vaksin guna penanggulangan mycobacteriosis.

KATA KUNCI: *M. fortuitum*, produk ekstraseluler, gurame

ABSTRACT: *Toxicity and immunogenicity of extracellular product Mycobacterium fortuitum in giant gouramy (Osphronemus gouramy). By: Siti Fatimah, Agustin Indrawati, and Angela Mariana Lusiastuti*

Mycobacterium fortuitum is a pathogenic bacterium with a chronic disease course on giant gouramy. This study was aimed to evaluate the toxicity and immunogenicity of ECP *M. fortuitum* on giant gouramy. Toxicity assay was conducted using fish with a weight of 15 g and the ECP be divided into four concentrations i.e 7.15 µg/fish, 14.3 µg/fish, 28.6 µg/fish, 57.2 µg/fish, the controls used PBS. All of them was injected by intraperitoneal injection (i.p). Immunogenicity assay using fish with a weight of 25-30 g on three groups, i.e ECP in Freund's Incomplete Adjuvant emulsion (FIA), ECP and control (sauthon broth). The results indicated that the concentration of ECP up to 57.2 µg/ fish non toxic to giant gouramy. Meanwhile, immunogenicity assay showed that the fish was injected by ECP and ECP with FIA revealed specific and non-specific immunity that higher than the control. There were statistically significant differences ($P < 0.05$) between treatments with a control. This suggested that the ECP *M. fortuitum* was immunogenic on giant gouramy and can be used as one of the candidate vaccine for the prevention of mycobacteriosis.

KEYWORDS: *M. fortuitum*, extraceluller product, giant gouramy

PENDAHULUAN

Gurame (*Osphronemus gouramy*) adalah ikan asli Indonesia dan merupakan salah satu komoditas unggulan pada budidaya ikan air tawar. Sentra budidaya ikan gurame di Indonesia antara lain: di Jawa, Nusa

Tenggara Barat, dan Sumatera. Ikan gurame memiliki nilai ekonomi yang cukup tinggi, berukuran besar, dan berpotensi tumbuh cepat. Salah satu kendala yang dihadapi pada budidaya ikan gurame adalah adanya penyakit bakterial yang disebabkan oleh *Mycobacterium* spp.

Mycobacterium spp. merupakan bakteri intraseluler yang dapat hidup di dalam sel fagosit sehingga sulit untuk dieliminasi dari inang. Salah satu jenis *Mycobacterium* spp. yang ditemukan menginfeksi ikan

Korespondensi: Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya. Gedung Menara 165, Lantai 15, Jl. T.B. Simatupang Kavling 1, Cilandak Timur, Jakarta Selatan 12560, Indonesia.
E-mail: fa_koe@yahoo.com

gurame adalah *M. fortuitum*. Selain mampu menginfeksi ikan, *Mycobacterium* spp. juga mampu menginfeksi manusia (*M. tuberculosis*, *M. leprae*) dan hewan besar seperti sapi (*M. avium* subspecies *paratuberculosis*). Menurut Gauthier & Rhodes (2009), *Mycobacterium* spp. yang sering ditemukan menginfeksi ikan antara lain: *M. fortuitum*, *M. chelone*, *M. marinum*. Keberadaan *Mycobacterium* spp. dapat ditemukan di tanah, debu, batu, dan air. *Mycobacterium* spp. selain menginfeksi ikan gurame (Rukmono, 2003), juga dapat menginfeksi ikan air laut maupun air tawar lainnya seperti ikan kakap (Bozzetta *et al.*, 2010), bandeng (Chang *et al.*, 2006), salmon (Brackelbank *et al.*, 2003) dan ikan hias (Zanoni *et al.*, 2008).

Penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium* spp. dikenal dengan mycobacteriosis dan bersifat kronis progresif (Decostere *et al.*, 2004). Pada ikan gurame kematian akibat penyakit tersebut berkisar antara 30%-60% (Rukmono, 2010). Gejala klinis pada ikan gurame yang terinfeksi bakteri tersebut terlihat berenang lemah, adanya luka pada kulit dan mata menonjol (exophthalmia) (Purwaningsih *et al.*, 2009). Selain gejala tersebut menurut Rukmono (2003), ikan gurame yang terserang mycobacteriosis memperlihatkan gejala klinis seperti lesi nekrotik pada ekor dan perdarahan di bagian bawah sirip. Secara patologi anatomi pada organ yang terinfeksi terlihat adanya tuberkel dan secara histopatologi terlihat adanya radang granuloma pada berbagai organ internal seperti: hati, ginjal, limpa.

Penanganan infeksi bakterial sering dilakukan dengan menggunakan antibiotika. Namun demikian, efektivitas pengobatan dengan antibiotika untuk bakteri intraseluler seringkali memberikan keberhasilan yang rendah. Hal ini disebabkan oleh ketidakmampuan obat tersebut untuk mencapai patogen dan ketidakefektifan obat bekerja dalam lingkungan intraseluler. Penggunaan antibiotika yang tidak tepat sasaran dapat mengakibatkan terjadinya resistensi dan residu antibiotika. Sehubungan dengan tidak efektifnya penggunaan antibiotika untuk pengobatan mycobacteriosis, pencegahan penyakit tersebut dengan menggunakan vaksin menjadi salah satu alternatif yang dapat dikembangkan. Penggunaan vaksin pada ikan menurut Sommerset *et al.* (2005), telah menurunkan ketergantungan penggunaan antibiotika pada budidaya ikan.

Vaksin mengandung antigen yang mampu merangsang terbentuknya kekebalan tubuh. Kekebalan tubuh yang terbentuk diharapkan mampu melindungi tubuh dari serangan penyakit dengan jenis patogen yang sama. Vaksinasi dengan vaksin *M. bovis bacillus Calmette-Guerin* (BCG) untuk pencegahan terhadap tuberculososis pada manusia dan sapi cukup efektif dilaku-

kukan (Thom *et al.*, 2012). Upaya pencegahan mycobacteriosis pada ikan telah diupayakan oleh Pasnik & Smith (2006) pada *striped bass* (*Morone saxatilis*) menggunakan vaksin Ag85A, dengan nilai RPS antara 88%-91% setelah diuji tantang dengan *M. marinum*. Upaya pengembangan vaksin untuk mencegah mycobacteriosis pada ikan gurame telah diteliti oleh Bangkit (2011) dengan menggunakan vaksin sediaan broth dan diperoleh sintasan relatif pada ikan sebesar 80% setelah uji tantang. Purwaningsih (2013) juga telah melakukan uji coba vaksin sediaan sel utuh dengan nilai *relatif percent survival* (RPS) sebesar 78%.

Bakteri memiliki kemampuan untuk mengeluarkan produk metabolisme pada lingkungan hidupnya yang dikenal dengan nama produk ekstraseluler (*extracellular product/ECP*). Produk ekstraseluler mudah dikenali oleh inang sehingga berpotensi untuk dikembangkan sebagai vaksin (Zou *et al.*, 2011). *Mycobacterium* spp. memiliki antigen potensial yaitu *secreted* protein dan *heat shock* protein (Hsp) (Mikkelsen *et al.*, 2011). Studi tentang proteksi vaksin ECP dari *secreted* protein *M. fortuitum* pada ikan gurame telah dilakukan oleh Tauhid *et al.* (2013), dengan nilai RPS sebesar 26,67% dan 40%. Potensi ECP yang berasal dari Hsp *M. fortuitum* pada ikan gurame sampai saat ini belum diketahui, sehingga perlu dilakukan kajian tentang potensi ECP dari Hsp *M. fortuitum* terutama tentang toksisitas dan imunogenisitas ECP tersebut sebagai salah satu kandidat vaksin untuk pencegahan mycobacteriosis.

BAHAN DAN METODE

Ikan Uji

Ikan uji berupa ikan gurame. Ikan gurame yang digunakan untuk uji toksisitas memiliki bobot 15,06 ± 0,77 g; sedangkan untuk uji imunogenisitas menggunakan ikan dengan bobot 25-30 g. Ikan yang digunakan telah melewati masa aklimatisasi selama 20 hari.

Preparasi ECP

Isolat bakteri yang digunakan untuk produksi ECP adalah *M. fortuitum* isolat 31 koleksi BPPBAT Bogor. Bakteri diinokulasi pada media sauthon cair dan diinkubasi selama 12 hari pada 28°C dan dilanjutkan dua hari pada suhu 37°C. Isolasi ECP mengacu pada metode Chen *et al.* (1997) dengan modifikasi dan hasil kultur bakteri kemudian diinaktivasi pada suhu 75°C selama 15 menit. Hasil inaktivasi disentrifugasi pada kecepatan 7.000 g selama satu jam pada suhu 4°C. Supernatan yang berisi ECP *crude* kemudian disaring dengan menggunakan kertas Whatman No. 1 dengan *pore size* 11 µm dilanjutkan dengan *syringe* filter steril 0,22 µm. ECP kemudian dikonsentrasikan menggunakan polietilen glikol (PEG) 6.000, hasil

konsentrasi disimpan pada suhu -20°C hingga digunakan untuk analisis lebih lanjut. Penentuan kadar protein dilakukan menggunakan metode Bradford.

Pengujian Toksisitas ECP

Uji toksisitas ECP menggunakan perlakuan dengan konsentrasi ECP yang berbeda, yaitu: 7,15 µg/ikan; 14,3 µg/ikan; 28,6 µg/ikan; dan 57,2 µg/ikan; serta kontrol dengan PBS (0,1 mL) dengan tiga kali ulangan. Sebanyak 30 ekor ikan uji masing-masing diinjeksi secara intraperitoneal (i.p) sesuai dengan perlakuan. Ikan dipelihara selama dua minggu pada bak berukuran 60 cm x 70 cm x 40 cm. Pakan komersial diberikan dua kali sehari dengan kandungan protein 31%-33% dan kadar lemak 3%-5%.

Pengambilan sampel untuk uji performa darah dilakukan pada hari ke-1, 4, 7, 10, dan 13 pasca injeksi ECP yang meliputi hematokrit (Docan *et al.*, 2010) dan hemoglobin dengan metode Sahli. Pengambilan sampel untuk uji histopatologi (HP) dilakukan pada hari ke-7 dan ke-13 pasca injeksi ECP. Pewarnaan preparat uji HP menggunakan *haematoxyllin eosin* (HE).

Pengujian Imunogenisitas ECP

Uji imunogenisitas dilakukan menggunakan tiga perlakuan yaitu: ECP dengan adjuvan (*Freund incomplete adjuvant/FIA*), ECP tanpa adjuvan dan kontrol (sauthon broth). Masing-masing perlakuan menggunakan 45 ekor ikan uji dan ikan diinjeksi sebanyak 0,15 mL secara i.p dan dipelihara selama lima minggu pada bak berukuran 60 cm x 70 cm x 40 cm. Setiap perlakuan dengan tiga kali ulangan. Pengambilan sampel darah untuk melihat respons imun spesifik dan non-spesifik dilakukan pada minggu ke-1, 2, 3, 4, dan 5 pasca injeksi. Pakan yang diberikan adalah pakan komersial sebanyak dua kali sehari dengan kandungan protein 31%-33% dan kadar lemak 3%-5%. Parameter uji yang diamati adalah *respiratory burst* (uji NBT), aktivitas lisosim, persentase fagositosis, dan titer antibodi.

Uji Respiratory Burst (NBT)

Sebanyak 50 µL darah dengan antikoagulan diletakkan pada sumur mikroplate berbentuk "U", diinkubasi selama satu jam pada suhu 37°C, kemudian dibilas dengan 100 µL PBS sebanyak tiga kali dan ditambahkan 50 µL 0,2% nitroblue tetrazolium (NBT) dan diinkubasi selama satu jam pada suhu 25°C. Setelah itu, larutan difixasi dengan 50 µL metanol 100% selama 2-3 menit, kemudian dibilas tiga kali dengan 50 µL metanol 30% sebanyak tiga kali. Kemudian dikering-anginkan, selanjutnya ditambahkan 60 µL kalium hydroxide, serta 70 µL dimethylsulfoxide (DMSO). Selanjutnya dibaca dengan menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 540 nm.

Aktivitas Lisosim

Aktivitas lisosim diuji dengan menggunakan *Micrococcus lysodekticus* (0,2 mg/mL dalam 0,05 M NaH₂PO₄). Serum sebanyak 10 µL dimasukkan pada sumur mikroplate berbentuk "U", kemudian ditambahkan 190 µL suspensi bakteri. Pembacaan absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 540 nm setelah 30 detik dan 4,5 menit inkubasi menggunakan ELISA reader.

Persentase Fagositosis

Persentase fagositosis dievaluasi menggunakan metode Anderson & Siwicki (1995). Sebanyak 50 µL suspensi *Staphylococcus aureus* kepadatan 10⁷ cfu/mL dimasukkan ke dalam tabung mikrotub, ditambahkan 50 µL darah, kemudian diinkubasi selama 20 menit. Setelah itu, dibuat preparat ulas, selanjutnya difixasi dengan metanol selama lima menit dan diwarnai dengan Giemsa selama 15 menit. Preparat diamati di bawah mikroskop. Persen fagositosis (PP) dihitung menggunakan rumus:

$$PP = (N1 / 100) \times 100$$

N1 = Total proses fagositosis yang dilakukan oleh sel fagosit dari 100 sel fagosit yang terhitung

Titer Antibodi

Pengujian titer antibodi dilakukan dengan metode aglutinasi, menggunakan mikroplate berbentuk "U". Sebanyak 25 µL PBS dimasukkan ke dalam sumur No. 1 sampai sumur No. 12, kemudian ditambahkan 25 µL serum pada sumur No. 1, kemudian homogenkan dan dilakukan pengenceran serial sampai sumur No. 11. Sumur No. 12 digunakan sebagai kontrol negatif. Sebanyak 25 µL bakteri *M. fortuitum* dimasukkan pada semua sumur dan dihomogenkan dengan cara digoyang membentuk angka delapan. Plate diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama dua jam dan kemudian dilanjutkan pada refrigerator 4°C semalaman, selanjutnya titer aglutinasi dihitung dan nilai titer dimasukkan dalam hitungan log 2.

Analisis Data

Nilai hematokrit, hemoglobin, *respiratory burst*, aktivitas lisosim, persentase fagositik, dan titer antibodi dianalisis dengan ANOVA pada selang kepercayaan 95% menggunakan program SPSS 16. Hasil uji histopatologi dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN BAHASAN

Pengujian Toksisitas ECP

Performa darah

Selama pengamatan tidak terjadi adanya kematian ikan uji pada empat konsentrasi ECP yang digu-

nakan (7,15 µg/ikan; 14,3 µg/ikan; 28,6 µg/ikan; dan 57,2 µg/ikan). Pengamatan terhadap performa darah dapat digunakan untuk melihat perubahan fisiologi yang disebabkan oleh stres dan status kesehatan ikan. Dilihat dari kadar hematokrit, pada hari ke-13 terjadi penurunan kadar hematokrit pada ikan yang diinjeksi ECP dengan konsentrasi protein 28,6 µg/ikan ($16,52 \pm 2,25\%$) dan 57,2 µg/ikan ($18,62 \pm 1,24\%$) yang berbeda nyata ($P < 0,05$) jika dibandingkan dengan kontrol ($21,93 \pm 0,99\%$) (Gambar 1 kiri).

Nilai terendah kadar hemoglobin pada hari pertama setelah injeksi ECP sebesar $6 \pm 0,2$ g/dL; penurunan kadar hemoglobin terjadi pada empat hari setelah injeksi ECP dengan nilai hemoglobin terendah yaitu $5,33 \pm 0,5$ g/dL; setelah itu, kadar hemoglobin naik kembali dan tidak ada perbedaan yang signifikan dengan kontrol (Gambar 1 kanan). Menurut Chen *et al.* (1997), ECP *M. fortuitum* tidak memiliki kandungan enzim hemolisin yang dapat melisis sel darah merah dan mengakibatkan rendahnya nilai hemoglobin darah akibat terjadi anemia. Pengamatan terhadap kadar hematokrit dan hemoglobin memperlihatkan bahwa ECP *M. fortuitum* memengaruhi kondisi fisiologis ikan. Hasil pemeriksaan hematokrit dan hemoglobin dapat dijadikan indikator untuk menentukan kesehatan ikan.

Performa histopatologi

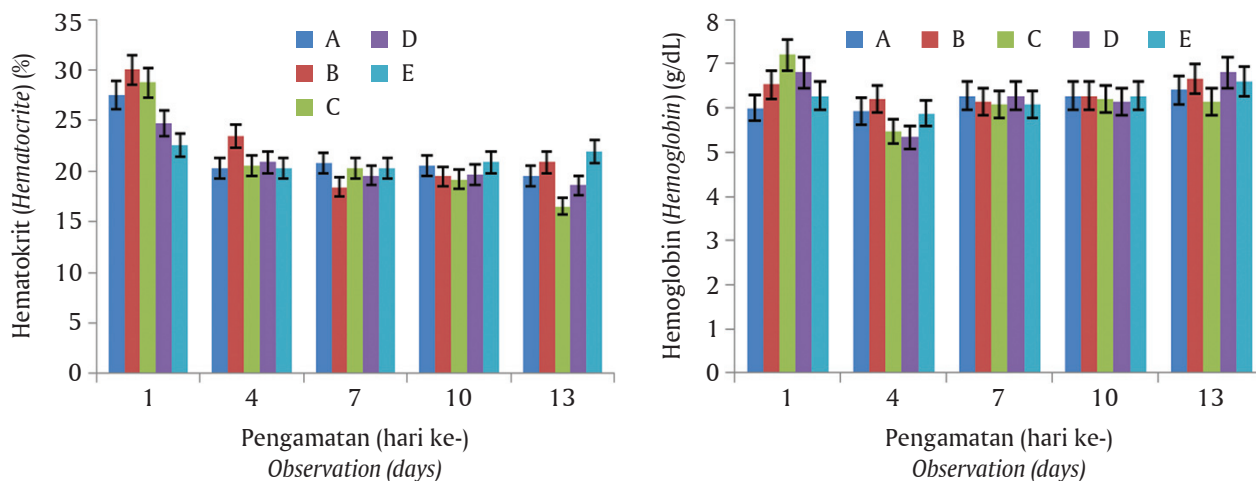
Pengamatan histopatologi dilakukan pada organ hati dan ginjal untuk melihat ada tidaknya kerusakan pada organ tersebut akibat injeksi ECP *M. fortuitum*. Hasil pengamatan terlihat adanya degenerasi lemak dan inti sel yang tidak seragam pada organ hati (Gambar 2 dan Tabel 1) dan ginjal (Gambar 3 dan Tabel 2), tetapi tidak menunjukkan adanya nekrosis. Degene-

rasi lemak terjadi baik pada ikan kontrol maupun perlakuan. Degenerasi lemak tidak selalu mengindikasikan adanya proses patologi. Dunlop & Malbert (2004) menyatakan bahwa degenerasi lemak dapat terlihat pada kondisi fisiologi seperti adaptasi atau disfungsi patologi.

Degenerasi lemak merupakan akumulasi lemak pada sitoplasma sel, sel tidak mampu melakukan metabolisme lemak dengan baik sehingga terjadi akumulasi lemak dalam sel. Degenerasi lemak terjadi pada sel hidup dan bersifat *reversible*, serta tidak membahayakan fungsi organ (Jones *et al.*, 2006). Menurut Haschex & Rousseaux (1998), degenerasi lemak yang bersifat sedang (*moderate*) tidak mengganggu fungsi hati. Perubahan patologi yang terdapat pada organ ginjal merupakan lanjutan dari kondisi yang terlihat di organ hati, karena darah akan dinetralisir terlebih dahulu di organ hati dan selanjutnya difiltrasi di organ ginjal.

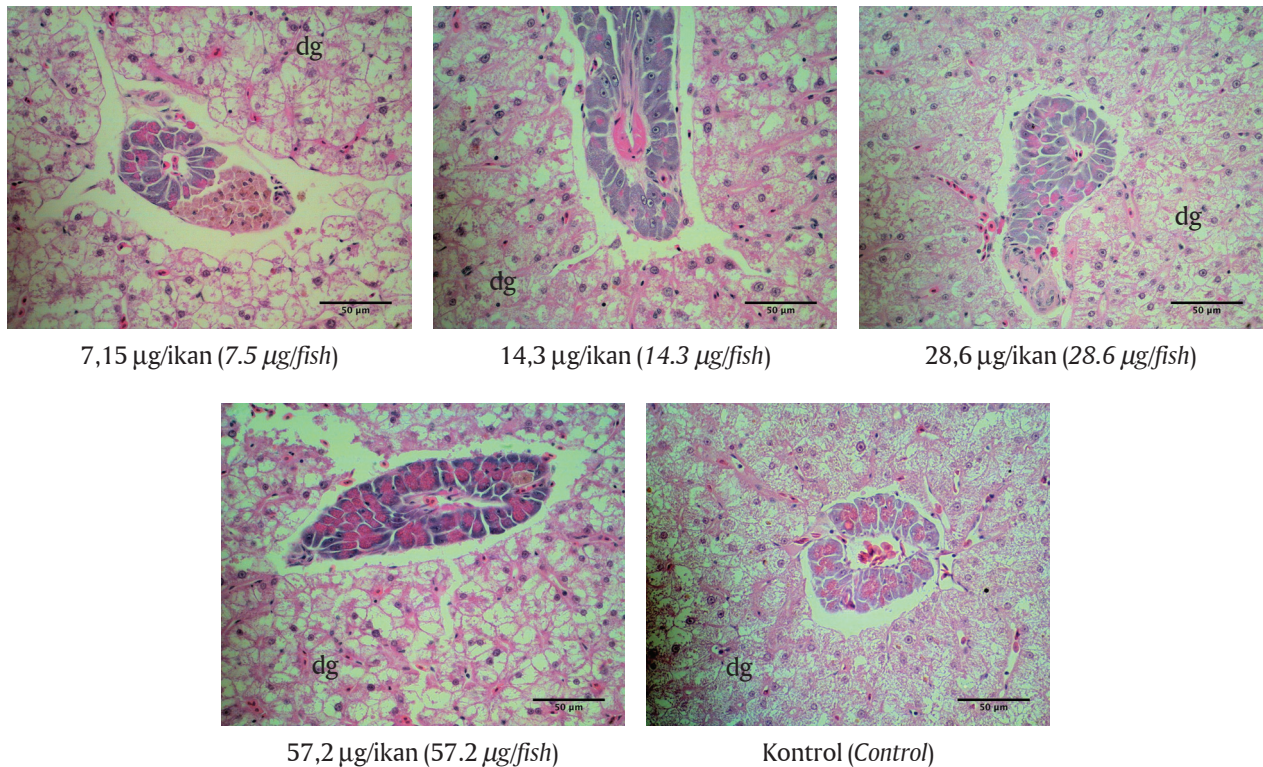
Berbeda dengan mamalia, sel hati ikan lebih bervakuola karena berisi lemak dan glikogen (Ferguson, 1989 dalam Wolf & Wolfe, 2005), tetapi proporsi lemak dan glikogen yang disimpan dalam sel hati pada setiap jenis ikan berbeda-beda. Degenerasi lemak pada ikan dapat disebabkan karena ikan memiliki kemampuan menyimpan lemak dalam jumlah besar di dalam organ hati atau juga karena faktor nutrisi (Wolf & Wolfe, 2005).

Dilihat dari inti sel organ hati, terlihat mulai adanya ketidakseragaman sel inti pada ikan yang diinjeksi ECP dengan konsentrasi 14,3 µg/ikan. Sementara di organ ginjal, inti sel tubulus terlihat tidak seragam pada ikan yang diinjeksi ECP sebesar 57,20 µg/ikan. Ketidakseragaman inti sel merupakan respons awal



Gambar 1. Kadar hematokrit (kiri) dan hemoglobin (kanan) ikan gurame yang diinjeksi ECP dengan konsentrasi: (A) 7,15 µg/ikan; (B) 14,3 µg/ikan; (C) 28,6 µg/ikan; (D) 57,2 µg/ikan; dan (E) kontrol

Figure 1. Hematocrite (left) and hemoglobin level (right) of giant gourami injected with ECP at a concentration of (A) 7.15 µg/fish; (B) 14.3 µg/fish; (C) 28.6 µg/fish; (D) 57.2 µg/fish; and (E) control



Gambar 2. Histopatologi organ hati ikan gurame yang diinjeksi ECP *M. fortuitum* menunjukkan adanya degenerasi lemak (dg)

Figure 2. Histopathological of liver giant gouramy injected with ECP *M. fortuitum* showed that fatty degeneration (dg)

Tabel 1. Hasil pengamatan histopatologi organ hati ikan gurame yang diinjeksi ECP *M. fortuitum*
Table 1. Histopatological result of liver giant gouramy injected with ECP *M. fortuitum*

Konsentrasi ECP ($\mu\text{g ikan}^{-1}$) Concentration of ECP ($\mu\text{g fish}^{-1}$)	Degenerasi lemak Fatty degeneration	Inti sel tidak seragam Nucleus ununiform	Nekrosa Necrosis
7.15	+	-	-
14.3	+	+	-
28.6	+	+	-
57.2	+	+	-
0	+	-	-

Keterangan (Note):

+ = Ditemukan perubahan (Changed happen); - = Tidak ditemukan perubahan (No changed happen)

dari kerusakan organ, hal ini menunjukkan bahwa ECP berpengaruh terhadap keseragaman inti sel organ hati maupun inti sel tubulus organ ginjal.

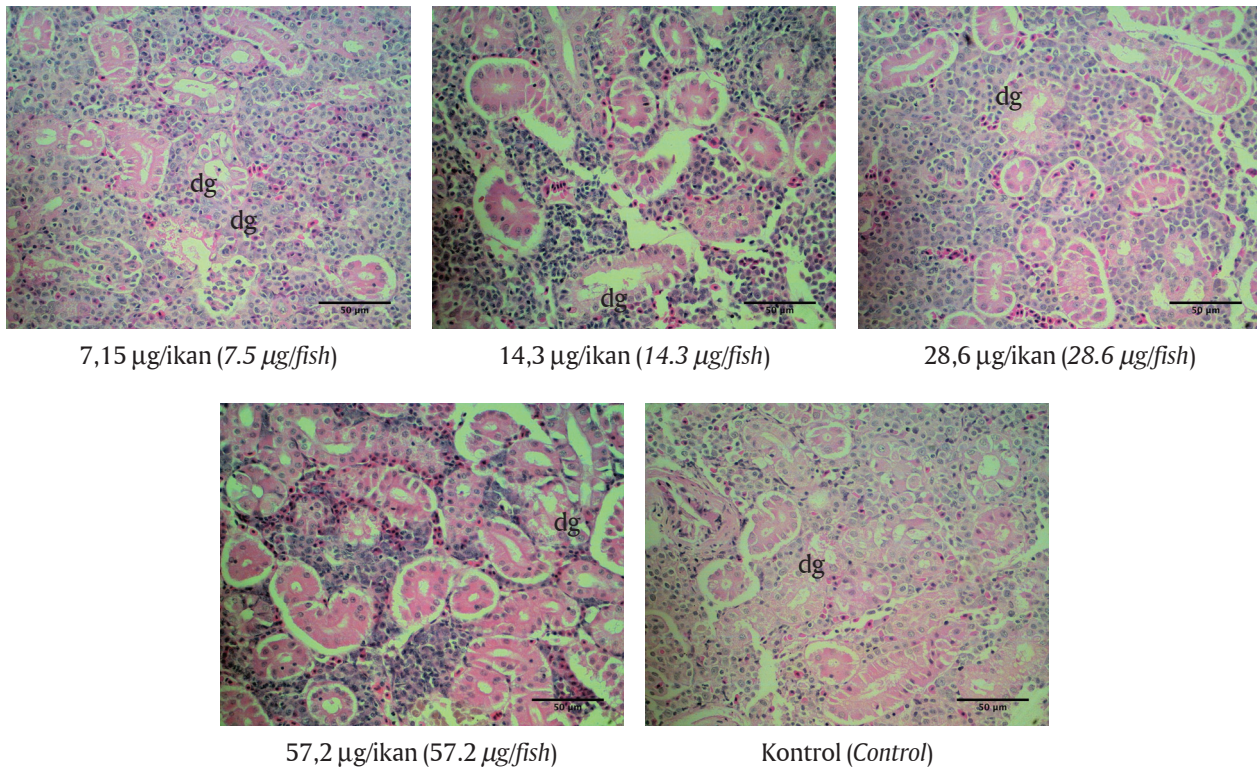
Dilihat dari parameter darah dan performa histopatologi menunjukkan bahwa ECP *M. fortuitum* tidak bersifat toksik pada ikan gurame. Produk ekstraseluler yang disekresikan oleh bakteri patogen termasuk dalam golongan eksotoksin, sifat toksik dari eksotoksin dapat hilang jika dipanaskan atau diberi perlakuan kimia seperti fenol atau formaldehid. Eksotoksin yang telah kehilangan toksisitasnya dinamakan dengan toksoid, dan toksoid memiliki kemam-

puan untuk menginduksi antibodi antitoksoid (Kuby, 2007). Konsentrasi ECP yang aman digunakan dan tidak menyebabkan inti sel hati menjadi tidak seragam berada pada konsentrasi di bawah 14,30 µg/ikan atau 0,95 µg/g bobot badan ikan.

Pengujian Imunogenistas ECP

Respons Imun Non-Spesifik (NBT, Persentase Fagositosis, dan Aktivitas Lisosim)

Respons imun non-spesifik dapat dilihat dari nilai NBT, persentase fagositosis, dan aktivitas lisosim. Ni-



Gambar 3. Histopatologi organ ginjal ikan gurame yang diinjeksi ECP *M. fortuitum* menunjukkan adanya degenerasi lemak (dg)

Figure 3. Histopathological of kidney giant gouramy injected with ECP *M. fortuitum* showed that fatty degeneration (dg)

Tabel 2. Hasil pengamatan histopatologi organ ginjal ikan gurame yang diinjeksi ECP *M. fortuitum*
 Table 2. Histopathological result of kidney giant gouramy injected with ECP *M. fortuitum*

Konsentrasi ECP ($\mu\text{g ikan}^{-1}$) Concentration of ECP ($\mu\text{g fish}^{-1}$)	Degenerasi lemak Fatty degeneration	Inti sel tidak seragam Nucleus ununiform	Nekrosa Necrosis
7.15	+	-	-
14.3	+	-	-
28.6	+	-	-
57.2	+	+	-
0	+	-	-

Keterangan (Note):

+ = Ditemukan perubahan (Changed happen); - = Tidak ditemukan perubahan (No changed happen)

lai NBT pada minggu kedua mengalami peningkatan jika dibandingkan dengan pada minggu pertama sebesar 5,2% untuk ikan yang diinjeksi ECP dengan adjuvan (FIA); 5,3% untuk ikan yang diinjeksi dengan ECP dan 3,6% untuk ikan kontrol yang diinjeksi dengan sauthon broth. Nilai NBT tertinggi terjadi pada minggu ke-5 yaitu sebesar 0,284 (Gambar 4); secara statistik terdapat perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) antara ikan perlakuan dengan kontrol.

Pada minggu pertama pasca injeksi terlihat nilai NBT yang rendah hal ini kemungkinan karena neutrofil bermigrasi dari pembuluh darah ke daerah luka.

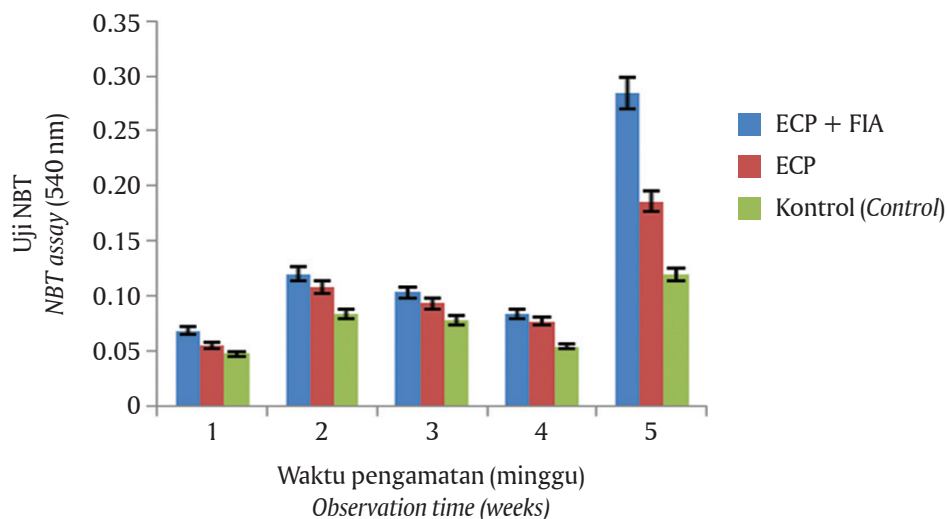
Rendahnya nilai NBT pada minggu pertama juga ditemukan oleh Choi & Oh (2000) yang menginjektikan ECP *Mycobacterium* spp. pada gelembung renang ikan nila. Neutrofil memiliki peranan besar dalam respons imun non-spesifik, menurut Tizard (2004), granul primer pada neutrofil berfungsi untuk menghasilkan enzim myeloperoksidase yang berperan dalam proses *respiratory burst*. Pada proses *respiratory burst* dihasilkan *radical oxygen species* (ROS) seperti superoxide (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan hipoklorit (OCl^-). ROS berperan untuk melawan patogen yang masuk (Kuby, 2007). Produksi ROS dapat dilihat dengan meng-

gunakan pewarna NBT, semakin tinggi nilai NBT menunjukkan produksi ROS selama proses *respiratory burst* semakin besar. Menurut Anderson (2004), uji NBT dapat digunakan untuk melihat respons imun non-spesifik setelah aplikasi imunostimulan dan vaksin. Peningkatan nilai NBT setelah aplikasi vaksin juga ditemukan oleh Purwaningsih (2013) melalui aplikasi vaksin sel utuh *M. fortuitum* pada ikan gurame.

Persentase fagositosis pada ikan yang diinjeksi ECP baik dengan adjuvan maupun ECP tanpa adjuvan mencapai puncaknya pada minggu ke-2 (Gambar 5) dan terdapat perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) antara ikan perlakuan dengan kontrol. Sel fagosit yang berperan dalam proses fagositosis adalah neutrofil dan makrofag. Makrofag diaktifkan oleh berbagai stimulus (Kuby, 2007), peningkatan fagositosis pada ikan baik yang diinjeksi ECP dengan FIA maupun ECP saja

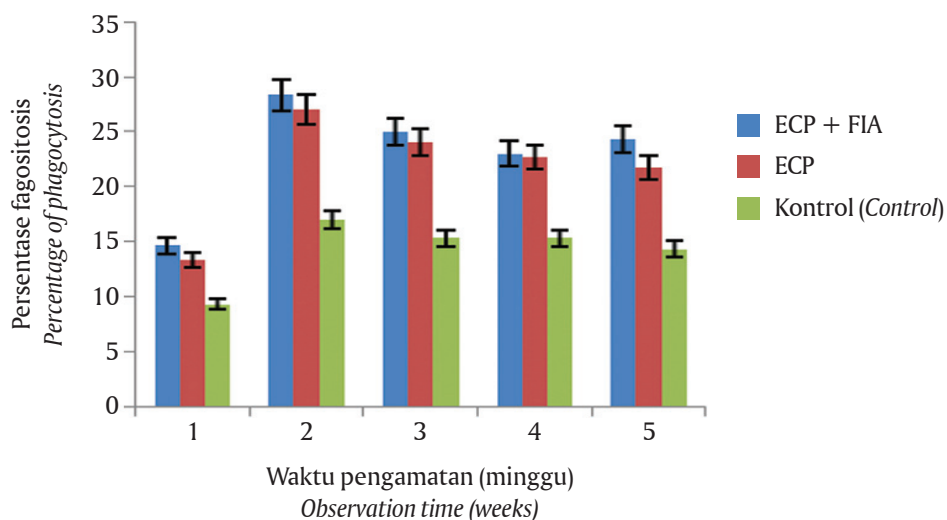
menunjukkan bahwa ECP mampu merangsang reaktivitasnya sel fagosit yang berperan dalam melawan patogen yang masuk. Peningkatan persentase fagositosis juga ditemukan pada ikan nila yang diinjeksi oleh bivalen ECP *Streptococcus agalactiae* (Sugiani, 2012) dan ikan gurame yang diinjeksi dengan vaksin sel utuh *M. fortuitum* (Purwaningsih, 2013). Fagositosis merupakan suatu mekanisme pertahanan tubuh yang dilakukan oleh sel fagosit dengan cara mencerna benda asing dan kemudian menghancurkannya. Menurut Wibawan & Soejoedono (2013), proses fagositosis berlangsung dalam lima fase yaitu pergerakan, perlekatan, penelanan (*ingestion*), degranulasi, dan pembunuhan (*killing*).

Aktivitas lisosim meningkat dan mencapai puncaknya pada minggu ke-3 dan terdapat perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) antara perlakuan dengan kontrol



Gambar 4. Hasil uji NBT ikan gurame yang diinjeksi ECP *M. fortuitum*

Figure 4. NBT assay of giant gouramy injected with ECP *M. fortuitum*



Gambar 5. Persentase fagositosis ikan gurame yang diinjeksi ECP *M. fortuitum*

Figure 5. Percentage phagocytosis of giant gouramy injected with ECP *M. fortuitum*

(Gambar 6). Peningkatan aktivitas lisosim juga diperoleh pada ikan nila yang diinjeksi ECP *Pseudomonas fluorescens* (Attia *et al.*, 2012). Hal yang sama terjadi pada ikan nila yang injeksi bivalen vaksin ECP *Streptococcus agalactiae* (Sugiani, 2012).

Lisosim merupakan komponen yang penting dalam sistem pertahanan tubuh terhadap patogen yang masuk. Lisosim pada ikan dapat dideteksi dari serum, mukus, plasma, dan organ ikan seperti insang dan hati, lisosim pada ikan merupakan indikator non-spesifik respons terhadap invasi antigen yang masuk (Saurabh & Sahoo, 2008). Lisosim merupakan enzim yang dapat menghidrolisis ikatan β (1 \rightarrow 4) antara N-acetylmuramic acid dan N-acetylglucosamine pada dinding sel (peptidoglikan) bakteri baik bakteri Gram positif maupun Gram negatif. Lisosim juga mendorong aktivitas fagositosis yaitu sebagai opsonin atau secara langsung mengaktifkan neutrofil dan makrofag.

Dilihat dari hasil uji NBT, persentase fagositosis dan aktivitas lisosim terlihat bahwa ECP *M. fortuitum* mampu meningkatkan respons imun non-spesifik pada ikan gurame. Menurut Saurabh & Sahoo (2008), respons imun non-spesifik merupakan pertahanan lapis pertama yang sangat penting pada ikan jika dibandingkan dengan mamalia untuk melawan patogen yang masuk.

Respons Imun Spesifik (Titer Antibodi)

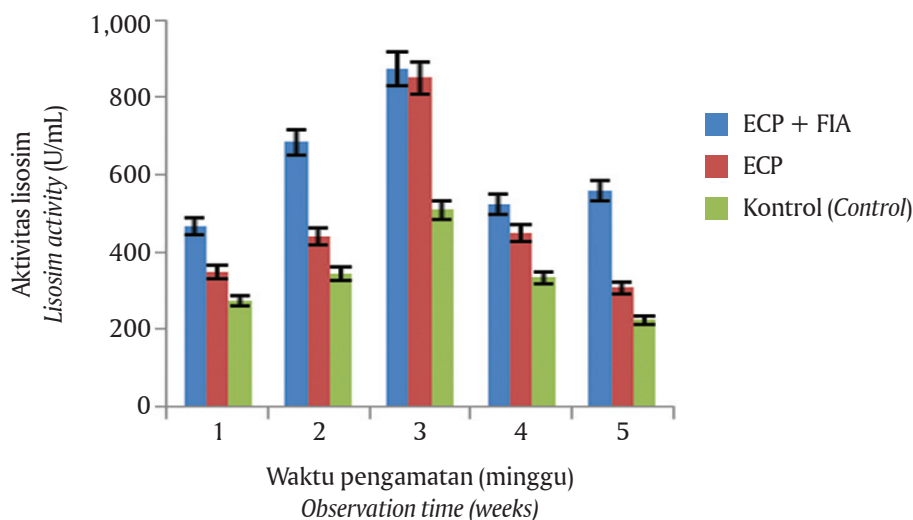
Induksi antigen yang memiliki sifat imunogenik akan direspons oleh tubuh dengan membentuk antibodi spesifik. Interaksi antara antigen antibodi dapat berupa presipitasi atau aglutinasi. Hasil uji aglutinasi menunjukkan bahwa ECP *M. fortuitum* mampu menginduksi terbentuknya antibodi yang spesifik (Gambar 7). Secara statistik titer antibodi pada perlakuan dan

kontrol berbeda nyata ($P < 0,05$); begitu juga antar perlakuan ECP dengan FIA pada minggu ke-4 dan ke-5 terlihat berbeda nyata jika dibandingkan dengan ikan yang diinjeksi ECP saja.

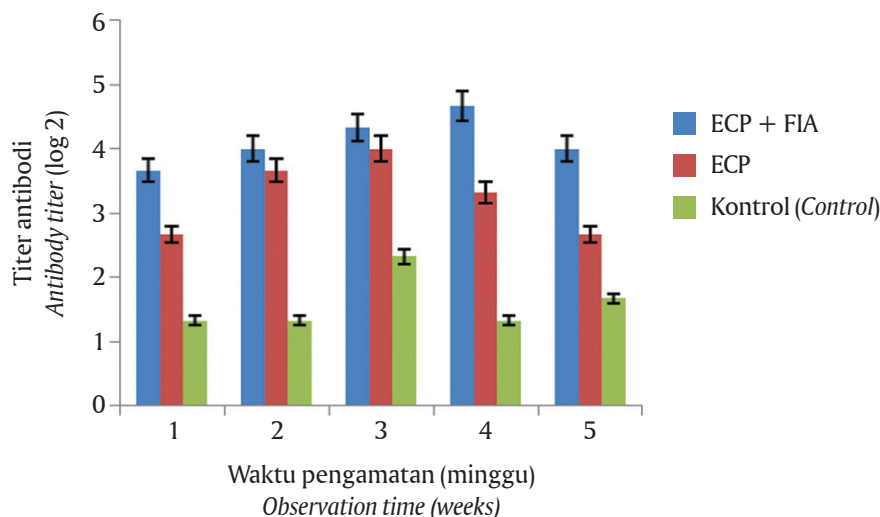
Titer antibodi pada ikan yang diinjeksi ECP saja mencapai puncaknya pada minggu ke-3, sedangkan pada ikan yang diinjeksi ECP dengan FIA pada minggu ke-4. Pemberian adjuvan terlihat mampu meningkatkan dan menstabilkan titer antibodi. *Freund incomplete adjuvant* merupakan *water in oil (W/O) emulsion*, dengan mekanisme melepaskan antigen secara perlahan-lahan, imunitas yang diinduksi oleh adjuvan tipe W/O bersifat kuat dan lama (Aucouturier *et al.*, 2001). Menurut Kuby (2007), adjuvan merupakan substansi yang jika dicampurkan dengan antigen kemudian diinjeksikan bersama akan bekerja memperbesar imunogenitas antigen. Peningkatan titer antibodi juga terlihat pada ikan zebrafish yang diinjeksi ECP *M. marinum* (Cui *et al.*, 2010) dan ikan gurame yang diinjeksi dengan vaksin sel utuh *M. fortuitum* (Purwaningsih, 2013).

Antibodi merupakan respons imun humoral dan berfungsi untuk menetralkan antigen. Fungsi vital antibodi dalam proses netralisasi antigen menurut Wibawan & Soejoedono (2013), adalah sebagai: (1) inhibin yaitu menghambat adhesi antigen pada permukaan sel target; (2) aglutinin yakni antibodi bereaksi dengan antigen dan menggumpalkannya dalam bentuk aglutinat yang tidak larut; (3) presipitin yakni antibodi bereaksi dengan antigen (terlarut) dan membentuk presipitat yang tidak larut; dan (4) opsonin yaitu antibodi akan melekat pada permukaan antigen dan menyebabkan makrofag lebih agresif melakukan proses fagositosis.

Ikan bertulang belakang memiliki imunoglobulin yang terbatas jika dibandingkan dengan mamalia. Ikan



Gambar 6. Aktivitas lisosim ikan gurame yang diinjeksi ECP dari *M. fortuitum*
 Figure 6. Lisosim activity of giant gouramy injected with ECP of *M. fortuitum*



Gambar 7. Titer antibodi ikan gurame yang diinjeksi ECP dari *M. fortuitum*
 Figure 7. Antibody titer of giant gourami injected with ECP of *M. fortuitum*

hanya memiliki satu kelas imunoglobulin yaitu IgM-like. Menurut Bengten *et al.* (2006), IgM-like memiliki struktur tetramer yang terdiri atas delapan rantai berat (*heavy chain/H*) dan delapan rantai ringan (*light chain/L*). Terbentuknya antibodi pada ikan pasca vaksinasi menunjukkan bahwa ikan memiliki kemampuan untuk merespons antigen dengan membentuk antibodi yang spesifik terhadap antigen, meskipun menurut Pellitero (2008), titer antibodi yang tinggi pada ikan tidak selalu berkorelasi dengan tingkat proteksi yang ditimbulkan.

Peningkatan titer antibodi menunjukkan bahwa ECP *M. fortuitum* yang diisolasi dengan kejutan suhu bersifat imunogenik dan mampu menginduksi kekebalan pada ikan. Kejutan suhu membuat sel bakteri mengeluarkan protein stres yang dikenal dengan *heat shock protein* (Hsp). Hsp mampu menginduksi selular dan humoral respons untuk melawan patogen yang masuk, menurut Tsan & Gao (2009), Hsp memiliki peranan penting dalam presentasi antigen, aktivasi limfosit, dan makrofag, serta aktivasi sel dendritik.

KESIMPULAN

Produk ekstraseluler *M. fortuitum* yang diisolasi dengan cara *heat shock* pada suhu 37°C selama dua hari dan diinaktivasi pada suhu 75°C hingga konsentrasi 57,2 µg/ikan tidak bersifat toksik pada ikan gurame. Respons imun non-spesifik dan spesifik pada ikan gurame menunjukkan bahwa ECP *M. fortuitum* bersifat imunogenik sehingga berpotensi untuk dikembangkan sebagai vaksin guna penanggulangan mycobacteriosis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar,

Bogor atas fasilitas selama penelitian dan juga kepada peneliti dan teknisi yang telah banyak membantu selama penelitian berlangsung.

DAFTAR ACUAN

- Anderson, D.P., & Siwicki, A.K. (1995). Basic hematology and serology for fish health programs. Dalam Shariff, M., Arthur, J.R., Subasinghe, R.P., editor. *Fish Health Section*. Asia Fisheries Society (Eds.), Disease in Asian Aquaculture II. Manila. Philippines, p. 185-202.
- Anderson, D.P. (2004). Immunostimulants, vaccines and environmental stressor in aquaculture; NBT assay to show neutrofil activity by these immunomodulators. In Suarez, C. *et al.* (Eds.), *Avances en acuicola VII*. Memorias del Simposium International de Nutricion Acuicola. Sonora Mexico, 16-19 November, 2004.
- Attia, A., Mesalhy, S., Galil, Y.A., & Fathi, M. (2012). Effect of injection vaccination against *Pseudomonas fluorescent* on spesific and non-spesific immune response of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using different prepared antigens. DOI:10.4172/scientificreports.552. *Scientific Reports*, 1(12), 1-7.
- Aucouturier, J., Dupuis, L., & Ganne, V. (2001). Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine*, 19, 2666-2672.
- Bangkit, I. (2011). *Efektifitas vaksin Mycobacterium fortuitum yang diinaktivasi dengan formalin untuk pencegahan mycobacteriosis pada ikan gurami (Osphronemus gouramy)*. Skripsi. Jatinangor (ID). Universitas Padjajaran.
- Bengten, E., Clem, L.W., Miller, N.W., War, G.W., & Wilson, M. (2006). Channel catfish imunoglobulins: repertoire and expression. *Developmental and Comparative Immunology*, 30, 77-92.

- Bracklebank, J., Raverty, S., & Robinson, J. (2003). Mycobacteriosis in atlantic salmon farmed in British Columbia. *Can. Vet. J.*, 44, 486-489.
- Bozzetta, E., varello, K., Giorgi, I., Fioravanti, M.L., Pezzolato, M., Zanoni, T.G., & Prearo, M. (2010). *Mycobacterium marinum* infection in hybrid striped bass farm in Italy. *Journal of Fish Disease*, 33, 781-785.
- Chang, T.C., Hsieh, C.Y., Chang, C.P., Shen, Y.L., Huang, K.C., Tu, C., Chen, L.C., Wu, Z.B., & Tsai, S.S. (2006). Pathological and molecular studies on mycobacteriosis of milkfish *Chanos chanos* in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms*, 72, 147-151.
- Chen, S.C., Adams, A., & Richards, R.H. (1997). Extracellular products from *Mycobacterium* spp. in fish. *Journal of Fish Disease*, 20, 19-25.
- Choi, S.H., & Oh, C.H. (2000). Stimulatory effect of extracellular product of *Mycobacterium* spp. and various adjuvants on non specific immune response of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Korean J. Biol. Science*, 4, 299-304.
- Cui, Z., Shaker, D.S., Watral, V., & Kent, M.L. (2010). Attenuated *Mycobacterium marinum* protects zebrafish against mycobacteriosis. *Journal of Fish Disease*, 33(4), 371-375.
- Decostere, A., Hermans, K., & Haesebrouck, F. (2004). Piscine mycobacteriosis: a literatur review covering the agent and the disease it causes in fish and humans. *Veterinary Microbiology*, 99, 159-166.
- Docan, A., Cristea, V., Grecu, I., & Dediu, L. (2010). Hematological response of the european catfish, *Silurus glanis* reared at different densities in flow-through production system. *Archiva Zootechnica*, 13(2), 63-70.
- Dunlop, R.H., & Malbert, C.H. (2004). *Veterinary pathophysiology*. 1st ed. Blackwell Publishing. United State of America (US), 530 pp.
- Gauthier, D.T., & Rhodes, M.W. (2009). Mycobacteriosis in fishes; A review. *The Veterinary Journal*, 180, 33-47.
- Haschek, W., & Rousseaux, C.G. (1998). *Fundamentals of toxicologic pathology*. Academic Press. San Diego, 563 pp.
- Jones, T.C., Hunt, R.D., & King, N.W. (2006). *Veterinary pathology*. 6th ed. Blackwell Publishing. United State of America (US), 1392 pp.
- Kuby. (2007). *Immunology*. 6th ed. W.H. Freeman and Company. New York (US), 574 pp.
- Mikkelsen, H., Aagaard, C., Nielsen, S.S., & Jungersen, G. (2011). Review of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* antigen candidates with diagnostic potential. *Veterinary Microbiology*, 152, 1-20.
- Pasnik, D.J., & Smith, S.A. (2006). Immune and histopathological response of DNA-vaccinated hybrid striped bass *Morone saxatilis* x *M. chrysops* after acute *Mycobacterium marinum* infection. *Disease of Aquatic Organisms*, 73, 33-41.
- Pellitero, P.A. (2008). Fish immunity and parasit infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 126, 171-198.
- Purwaningsih, U., Lusiastuti, A.M., & Taukhid. (2009). Studi patologi-anatomi penyakit mikobakteriosis pada ikan gurami (*Ospronemus gouramy*). *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur*. hlm. 1139-1142.
- Purwaningsih, U. (2013). *Vaksin koktail sel utuh untuk pencegahan penyakit mycobacteriosis dan motile aeromonas septicemia pada ikan gurame (Osphronemus gouramy)*. Tesis. Institut Pertanian Bogor. Bogor (ID).
- Rukmono, D. (2010). *Deteksi cepat dan akurat penyakit mycobacteriosis pada ikan gurame (Osphronemus gouramy) melalui metode PCR (polymerase chain reaction)*. Disertasi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta (ID).
- Rukmono, D. (2003). *Mycobacterium fortuitum pada ikan gurame (Osphronemus gouramy): diagnosa patologis dan mikrobiologis*. Tesis. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta (ID).
- Saurabh, S., & Sahoo, P.K. (2008). Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, 39, 223-239.
- Sommerset, I., Krossoy, B., Biering, E., & Frost, P. (2005). Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Rev. Vaccines*, 4, 89-101.
- Sugiani, D. (2012). *Vaksin bivalent untuk pencegahan penyakit motile aeromonas septicemia dan streptococcosis pada ikan nila (Oreochromis niloticus)*. Disertasi. Institut Pertanian Bogor. Bogor (ID).
- Taukhid, Lusiastuti, A.M., Purwaningsih, U., Sugiani, D., & Sumiati, T. (2013). *Vaksin Mycobacterium fortuitum (MycofortyVac) untuk pencegahan penyakit mycobacteriosis pada ikan gurame (Osphronemus gouramy)*. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Terbaik*. hlm. 51-62.
- Tizard, I.R. (2004). *Veterinary immunology: An introduction*. 7th ed. United State of America (US). Elsevier, 494 pp.
- Thom, M.L., McAulay, M., Vordermeier, H.M., Clifford, D., Hewinson, R.G., Villareal-Ramos, B., & Hope, J.C. (2012). Duration of immunity against *Mycobacterium bovis* following neonatal vaccination with bacillus calmette-Guerin Danish: significant protection against infection at 12, but not 24, months. *Clinical and Vaccine Immunology*, 19(8), 1254-1260.
- Tsan, M.F., & Gao, B. (2009). Heat shock proteins and

- immune system. *Journal of Leucocyte Biology*, 85, 905-910.
- Wibawan, I.W.T., & Soejoedono, R.D. (2013). Intisari imunologi medis. Fakultas Kedokteran Hewan IPB. Bogor (ID), 157 pp.
- Wolf, J.C., & Wolfe, M.J. (2005). A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. *Toxicologic Pathology*, 33, 75-85.
- Zanoni, R.G., Florio, D., Fioravanti, M.L., Rossi, M., & Prearo, M. (2008). Occurrence of *Mycobacterium* spp. in ornamental fish in Italy. *Journal of Fish Disease*, 31, 433-441.
- Zou, L., Wang, J., Huang, B., Xie, M., & Li, A. (2011). MtsB, a hydrophobic membrane protein of *Streptococcus iniae*, is an effective subunit vaccine candidate. *Vaccine*, 29, 391-394.