

**ANALISIS RESPON IMUN IKAN KOI (*Cyprinus carpio koi*) YANG DIVAKSIN DENGAN
WHOLE PROTEIN SPORA *Myxobolus koi* SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN MYXOBOLUSIS**

**IMMUNE RESPONSE ANALYSIS OF FISH KOI (*Cyprinus carpio koi*) VACCINATED
Myxobolus koi SPORES WHOLE PROTEIN AS A VACCINE CANDIDATE MYXOBOLUSIS**

Mohamad Yusuf¹, Gunanti Mahasri² dan Mufasirin³

¹Sekolah Pascasarjana Universitas Airlangga
Kampus B Jl. Airlangga 4-6 Surabaya, 60286 Telp. 031-5041566

²Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga
Kampus C Mulyorejo – Surabaya, 60115 Telp. 031-5033710

³Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
Kampus C Mulyorejo - Surabaya 60115

Abstract

Myxobolus is one of parasites on koi fish that belongs to a class myxosporea that can infect and systemic and can cause harm to the fish farming. Vaccination is an attempt to cause-specific endurance through vaccination. Observations differential leukocytes and increased optical density values can be used to determine the effectiveness of the vaccine is given.

This study aims to analyze the immune response koi fish vaccinated with *Myxobolus koi* spores whole protein for vaccine development myxobolusis in koi fish. The method used in this study is Completely Randomized Design with 4 treatments and 5 replications.

The results showed that a change in the total number and types of leukocytes that can be used as indicators of the presence of certain infectious diseases that occur in fish. The highest value of lymphocytes in treatment B, monocytes highest in treatment D, neutrophils on treatment D, eosinophils on treatment A and basophils highest in treatment A. The observation of the highest optical density value in treatment B (fish vaccinated and infected 80 *M. koi* spores / tail) of 0.593 at day 30, while the lowest in treatment D (fish are not vaccinated but diinfeksi 80 *M. koi* spores / tail) of 0,064 in 30 days.

Keywords : vaccination *Myxobolus koi* spore whole protein, differential leukocyte, the value of optical density, immune response

Pendahuluan

Ikan koi merupakan salah satu ikan hias air tawar yang menjadi komoditas perikanan yang saat ini sedang mendapatkan perhatian pemerintah untuk pengembangan budidaya (Anshary, 2008). Masalah utama dalam budidaya ikan hias di Indonesia hingga saat ini adalah penyakit. *Myxobolus* merupakan salah satu parasit pada ikan koi yang termasuk dalam kelas myxosporea (Lom and Dykova, 1992) yang dapat menginfeksi dan bersifat sistemik serta dapat menimbulkan kerugian bagi usaha budidaya ikan (Helmiati dkk., 2005).

Hadiroseyani (2003) mengemukakan bahwa myxosporea merupakan protozoa yang mampu menurunkan produksi ikan koi di Indonesia terutama pada benih dan dapat menyebabkan kematian pada populasi ikan yang terinfeksi. Rukyani (1990) menyatakan bahwa infestasi *Myxobolus koi* menyebabkan kematian ikan sebanyak 50% dari populasi pada beberapa kolam budidaya.

Upaya pengobatan dengan menggunakan perendaman air laut maupun penggunaan bahan kimia seperti formalin, methylen blue, pottasium permanganate, glacial acetic acid atau phenol tidak efektif untuk mengobati penyakit ini (Hoshina, 1952 dalam Dwijayanti, 2011). Salah satu metode penanggulangan penyakit yang dinilai aman adalah vaksinasi (Poobalane et al., 2010).

Berdasarkan latar belakang yang dikemukakan di atas maka perlu dikembangkan cara pencegahan yang tepat dan akurat melalui penelitian dengan menganalisis respons imun ikan koi yang divaksin dengan whole protein spora *Myxobolus koi* sebagai bahan kandidat vaksin sehingga diharapkan terjadi proteksi atau terbentuk respons imun pada ikan koi terhadap infeksi *Myxobolus*.

Tujuan dari penelitian ini adalah menganalisis respons imun ikan koi yang divaksin dengan whole protein spora *Myxobolus koi* untuk pengembangan vaksin myxobolusis pada ikan koi, mengamati differensial leukosit

darah ikan, menentukan nilai *optical density* (IgM) pada darah ikan dan menentukan tingkat kelangsungan hidup atau *survival rate* (SR).

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi ilmiah mengenai *whole protein* spora *Myxobolus koi* sebagai bahan pengembangan vaksin pada ikan koi untuk mencegah myxobolus dan dapat digunakan sebagai acuan dalam pengembangan bahan vaksin dan dapat diterapkan dalam mencegah myxobolus pada ikan koi.

Materi dan Metode

Materi penelitian terdiri dari alat dan bahan penelitian. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan koi yang terinfeksi *Myxobolus koi*. Bahan yang digunakan untuk isolasi nodul yang berisi spora *Myxobolus koi* yaitu *aquadest*, larutan *Phosphate Buffered Saline* (PBS), *Ethanol absolute* dan Buffer Tris-HCL. Bahan untuk isolasi protein adalah Larutan *Phosphate buffer salin* / PBS (bio-Rad), *protease inhibitor* yang terdiri dari : 100 ml PBS, 100 µl 40 mM PMSF, 7,3 mg TLCK dan 7,5 mg EDTA (Sigma-USA), nonidet P40 0,5% (Sigma-USA). Bahan yang digunakan untuk analisis protein dengan metode SDS-PAGE adalah *separating gel* dan *stacking gel* (*lower gel buffer*, *upper gel buffer*, Larutan PBS, T-Akridil, ddH₂O, *Tetra Methyl Diamine* (TEMED) (Bio-Rad), *ammonium persulphate*, Tris (*hydroxymethyl*), HCL (Merck) pH=8.8 dan 6.5, deterjen *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS), *aquadest* dan pewarna *Comassie Brilliant Blue*. Bahan yang digunakan untuk pengukuran titer antibodi menggunakan ELISA adalah cairan pencuci (PBS-tween 20 + preservatif proclin 300 0,005%), larutan konjugat (*phosphat buffer saline*, BSA dan stabilizer), substrat (*tetramethyl-benzidine* dengan *citrate-phosphate buffer* mengandung H₂O₂, *coating buffer*, PBS-T Casein 1%, *stopping solution* dan *aquadest*. Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu nampan bedah, mikroskop cahaya, pinset, cawan petri, pipet, tabung reaksi, *micropipet*, *object glass*, *cover glass*, *Beaker glass*, *tubes* dan *microtubes*, sentrifus, peralatan elektroforesis (Bio-Rad), *chamber* untuk *running SDS-PAGE* (Bio-Rad), *deep freezer* (4°C), *waterbath shaker*. Peralatan untuk ELISA meliputi *polystyrene 96 well microtiter plate* (microplate), *micropipet* (100-200 µL), *microplate shaker*, *microtube* (1-1,5 mL), *microplate washer*, *Baker glass* dan ELISA *reader* (elektrofotometer).

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 5

ulangan. Adapun perlakuan adalah sebagai berikut :

- A = Ikan koi sebanyak 5 ekor disuntik larutan PBS dan tanpa diinfeksi spora *M. Koi* (kontrol).
- B = Ikan koi sebanyak 5 ekor divaksin dengan *whole protein* spora *M. koi* dan diinfeksi dengan 80 spora/ekor *M. koi*.
- C = Ikan koi sebanyak 5 ekor divaksin dengan *whole protein* spora *M. koi* tanpa diinfeksi spora *M. koi*.
- D = Ikan koi sebanyak 5 ekor tanpa divaksin *whole protein* spora *M. koi* dan diinfeksi dengan 80 spora/ekor *M. koi*.

Prosedur Kerja

Preparasi sampel spora *Myxobolus koi*

Ikan yang terserang myxobolus dicuci dengan akuades agar kotoran yang menempel pada tubuh ikan hilang, kemudian nodul myxobolus yang menempel diinsang diambil dengan menggunakan pinset dan *scalpel* secara perlahan agar nodul yang berisi spora tidak hancur. Nodul yang telah diambil kemudian diletakkan di *Petri disc* dan diberi PBS secukupnya. Nodul dipotong beberapa bagian untuk mengeluarkan spora dengan menggunakan *scalpel* kemudian ditambahkan akuades, dimasukkan dalam tabung reaksi dan disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 15 menit untuk memisahkan sel *Myxobolus*. Supernatan yang terbentuk kemudian dibuang dan endapan ditambah akuades, disentrifugasi kembali hingga memadat dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya pelet dihitung dengan *haemocytometer*.

Perhitungan spora *Myxobolus koi*

Perhitungan spora dilakukan dengan menggunakan *haemocytometer* dan untuk memudahkan perhitungan digunakan *hand counter*. Perhitungan spora pada blok A, B, C dan D dimulai dari sisi kiri kotak kearah kanan dan menghitung spora yang berada dalam garis atau yang mendekati garis batas bagian dalam kotak. Langkah selanjutnya menjumlahkan perhitungan pada blok A, B, C dan D pada bidang perhitungan bagian atas dan bagian bawah *haemocytometer* kemudian menghitung kepadatan spora (spora/ml) dengan menggunakan rumus perhitungan *Big Block* (Satyantini dkk., 2012).

$$\text{Kepadatan spora (spora/ml)} = \frac{nA + nB + nC + nD}{4 \times 10^{-4}}$$

Keterangan :

nA, nB, nC, nD= Jumlah spora pada blok A, B, C dan D

4 = Jumlah blok yang dihitung

10^{-4} = Volume masing-masing blok

Isolasi *whole protein* spora *Myxobolus koi*

Spora yang telah dihitung diberi PBS secukupnya kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Pellet ditambah buffer lisis 500 µl kemudian disonikasi dalam es (1 menit sonikasi ½ menit istirahat), dilakukan berulang 10 kali. Hasil sonikasi lalu divortex (½ menit vortex 1 menit istirahat) dalam es, dilakukan berulang 15 kali. Hasil vortex disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 5 menit, supernatan yang terbentuk dikoleksi kemudian dilakukan analisis SDS-PAGE.

Penentuan konsentrasi *whole protein* spora *Myxobolus koi*

Penentuan konsentrasi *whole protein* spora *Myxobolus* menggunakan metode *Bio-Rad Protein Assay* dan dibaca menggunakan *Spectrophotometer UV-Visible* dengan panjang gelombang 600 nm.

Analisis *whole protein* spora *Myxobolus koi* dengan SDS-PAGE

Analisis terhadap protein dilakukan dengan metode elektroforesis SDS-PAGE dengan komposisi *separating gel* 12,5 % dan *stacking gel* 5 %. Sebanyak 10 µg sampel yang ditambahkan *Laemly buffers* dengan perbandingan 2:1 dilakukan perebusan pada 100°C selama 5 menit, dimasukkan ke dalam sumuran yang terletak pada *stacking gel*. Sebagai marker digunakan protein dengan berat molekul pada kisaran 10 - 180 kDa (*New England Bio-Labs*). Kemudian dilakukan *running* pada *chamber* yang telah diisi *Electrode Buffers* 1X dengan 100 volt, 40 mA. Proses *running* dihentikan setelah warna biru penanda mencapai batas bawah *plate gel*. Selanjutnya gel dimasukkan ke dalam larutan pencuci yang terdiri dari methanol 25 ml, asam asetat 3,7 ml dan Aquades 100 ml. Digoyang di atas shaker selama 30 menit. Pencucian ulang dilakukan dengan larutan yang sama dengan pengurangan komposisi ethanol dan penambahan asam asetat setengah dari sebelumnya selama 30 menit. Pencucian berikutnya dengan larutan glutaraldehid 10% dan akuades selama 30 menit. Setelah dicuci gel diwarnai dengan perak nitrat (AgNO_3) selama 15 menit, kemudian dilakukan pencucian

dengan aquades dua kali masing-masing selama 2 menit. Diberikan larutan pengembangan warna yang terdiri dari formaldehid 3,7 %, zitrone 5 % dan aquades. Setelah pita terlihat maka reaksi dihentikan dengan menambahkan asam asetat 10 %. Hasil elektroforesis SDS-PAGE yang berupa pita dapat dilakukan penentuan berat molekul dengan menghitung nilai Rf (*Retardation Factor*) dari masing-masing pita dengan rumus (Rantam, 2003) :

$$Rf = \frac{\text{jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

Kemudian nilai Rf dimasukkan dalam persamaan regresi linear dengan rumus :

$$Y = a + bX$$

Keterangan : Y = berat molekul
X = nilai Rf sampel

Vaksinasi *whole protein* spora *Myxobolus koi*

Ikan koi diuji dengan menggunakan 4 akuarium dengan kapasitas 5 lt air. Padat tebar ikan adalah 5 ekor/akuarium dengan ukuran ikan 7-10 cm. Ikan yang digunakan untuk perlakuan adalah ikan sehat yang telah direndam dahulu dalam *Methylene blue* 3-5 g/m³ air selama 5 menit untuk membersihkan organisme yang menempel pada tubuh ikan.

Diferensial leukosit

Gambaran darah yang diamati adalah hitung jenis (diferensial) leukosit. Darah diambil dari vena caudal dengan menggunakan spuit 1 ml sebanyak ± 1ml. Jarum suntik (*syringe*) yang sebelumnya sudah diberi dengan EDTA (sebagai antikoagulan). Darah dibuat preparat ulas dengan cara menempatkan setetes darah segar pada gelas objek pertama, gelas objek kedua diletakan dengan sudut 45° terhadap gelas objek pertama, kemudian ditarik sampai menyentuh darah, darah dibiarkan menyebar sepanjang tepi gelas objek kedua, lalu gelas objek kedua didorong sepanjang permukaan gelas objek pertama sehingga membentuk lapisan darah tipis dan merata. Preparat dikeringkan di suhu ruang kemudian difiksasi dengan metanol absolute selama 3 menit dan dikeringkan di suhu ruang kembali sebelum diwarnai dengan pewarna Giemsa 10% selama 15 menit, lalu preparat dicuci kembali dengan akuades untuk mengurangi kelebihan warna dan dikeringkan di suhu ruang. Preparat diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran

1000x dan dihitung setiap jenis leukosit hingga jumlah 100 sel.

Penentuan nilai *optical density* dengan *indirect ELISA*

Nilai *optical density* yang berasal dari serum darah ikan yang telah divaksinasi ditentukan dengan metode *indirect ELISA*. Cawan mikrotiter yang digunakan adalah cawan mikrotiter 96 sumuran. Setiap sumuran diisi dengan 100 µl larutan antigen dengan konsentrasi 10 µg/ml dalam buffer pelapis dan diinkubasi pada suhu 40°C selama satu malam. Cawan mikrotiter dicuci satu kali dengan buffer pencuci kemudian dalam tiap sumuran ditambahkan 100 µl serum darah ikan yang telah divaksinasi dan diencerkan dengan PBS. Serum darah ikan diencerkan berseri, plat mikro diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam dan dilanjutkan dengan pencucian tiga kali dengan buffer pencuci. Setiap sumuran diisi dengan 150 µl larutan konjugat *IgM anti rabbit alkali fosfatase*. Konjugat diencerkan dengan PBS dengan perbandingan 1 : 4000. Plat mikrotiter diinkubasikan pada suhu 37°C selama satu jam dan selanjutnya dicuci tiga kali dengan buffer pencuci. Setiap sumuran ditambahkan substrat larutan pNPP sebanyak 150 µl. Plat mikrotiter diinkubasikan dalam temperatur ruangan selama 5 menit. Titer antibodi dibaca dengan alat spektrofotometer untuk ELISA pada panjang gelombang 405 nm.

Penentuan kelulushidupan (SR)

Tingkat kelulushidupan dinyatakan berupa persentase jumlah ikan koi yang hidup sampai dengan hari ke-30 pasca perlakuan

percobaan terhadap jumlah keseluruhan ikan yang dipelihara. Kelangsungan hidup ikan dihitung dengan menggunakan rumus:

$$SR = \frac{N_t}{N_o} \times 100\%$$

Keterangan :

SR = Kelangsungan hidup

Nt = Jumlah ikan yang hidup pada akhir pengamatan (ekor)

No = Jumlah ikan yang hidup pada awal ujiantang (ekor)

Pengumpulan dan Analisis Data

Data yang diperoleh terdiri dari data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif adalah data hasil pengamatan differensial leukosit pada analisis respons imun ikan koi yang divaksin dengan *whole protein* spora *Myxobolus koi* sebagai kandidat bahan pengembangan vaksin myxobolusis, sedangkan data kuantitatif yaitu data hasil penentuan kelangsungan hidup (SR) dan nilai OD dalam darah.

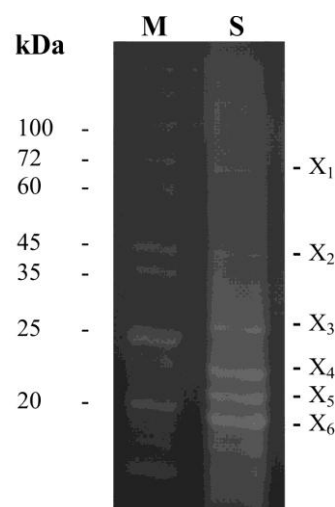
Hasil dan Pembahasan

Perhitungan spora *Myxobolus koi*

Hasil perhitungan spora *Myxobolus koi* menggunakan *Haemocytometer* diperoleh jumlah spora sebanyak 490.000 spora/ml.

Konsentrasi *whole protein* spora *Myxobolus koi*

Hasil penentuan konsentrasi *whole protein* spora *Myxobolus* menggunakan metode *Bio-Rad Protein Assay* dan dibaca menggunakan *Spectrophotometer UV-Visible* dengan panjang gelombang 600 nm diperoleh kadar protein sebesar 16,332mg/ml.



Gambar 1. Hasil karakterisasi *whole protein* spora *Myxobolus koi* dengan SDS-PAGE menggunakan pewarnaan perak nitrat.

Keterangan : Lajur (M): Marker dan lajur (S): *whole protein* sampel

Tabel 1. Persentase jenis leukosit pada ikan koi.

PERLAKUAN	JENIS LEUKOSIT (%)				
	Rata-rata ± SD				
	LIMFOSIT	MONOSIT	NEUTROFIL	EOSINOFIL	BASOFIL
A	52,20 ^c ± 1,30	17,20 ^b ± 1,30	20,20 ^a ± 0,84	9,00 ^c ± 1,00	1,40 ^a ± 0,55
B	61,00 ^a ± 0,82	21,00 ^a ± 0,82	6,00 ^c ± 0,82	11,75 ^b ± 0,96	0,25 ^b ± 0,50
C	58,20 ^b ± 1,64	19,80 ^a ± 0,84	12,20 ^b ± 1,30	9,40 ^c ± 0,55	0,40 ^b ± 0,55
D	59,33 ^{ab} ± 0,58	20,33 ^a ± 0,58	6,33 ^c ± 0,58	14,00 ^a ± 1,00	0,00 ^b ± 0,00
NORMAL	52	18	20	8	2

Tabel 2. Nilai *Optical Density* (OD) antibodi poliklonal *whole protein* spora *Myxobolus koi* dengan Indirect ELISA.

Hari ke	Nilai OD			
	Perlakuan A (kontrol)	Perlakuan B	Perlakuan C	Perlakuan D
1	0,265	0,264	0,267	0,265
14	0,263	0,465	0,463	0,264
21	0,266	0,576	0,465	0,127
30	0,264	0,593	0,412	0,094

Analisis *whole protein* spora *Myxobolus koi* dengan SDS-PAGE

Hasil analisis *whole protein* spora *Myxobolus koi* menggunakan SDS-PAGE dengan komposisi *separating gel* 12,5 % dan *stacking gel* 5 % dapat dilihat pada Gambar 1. yang menunjukkan adanya protein digambarkan dalam bentuk pita-pita pada gel SDS-PAGE dan ditemukan 6 pita (band) protein yaitu X₁, X₂, X₃, X₄, X₅ dan X₆.

Perhitungan berat molekul *whole protein* spora *Myxobolus koi* diperoleh enam pita molekul dengan berat molekul 68.1 kDa, 38.5 kDa, 25.6 kDa, 23 kDa, 21.7 kDa dan 18.9 kDa.

Diferensial leukosit ikan koi

Pengamatan differensial leukosit meliputi hitung jenis sel limfosit, monosit, heterofil, eosinofil dan basofil dalam 100 sel darah putih yang diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x.

Hasil pengamatan limfosit dalam darah ikan koi menunjukkan persentase tertinggi pada perlakuan B sebesar 61% yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan D yaitu sebesar 59,33%. Pengamatan monosit dalam darah ikan koi pada masing-masing perlakuan diperoleh persentase tertinggi pada perlakuan B sebesar 21% yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan D dan C. Pengamatan neutrofil dalam darah ikan koi menunjukkan persentase tertinggi pada perlakuan A (kontrol) sebesar 20,20% dan terendah pada perlakuan B sebesar 6% yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan D. Pengamatan jumlah eosinofil menunjukkan

persentase tertinggi pada perlakuan D sebesar 14% dan terendah pada perlakuan A (kontrol) sebesar 9% yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan C. Pengamatan terhadap jumlah basofil menunjukkan persentase tertinggi pada perlakuan A (kontrol) sebesar 1,4% dan terendah pada perlakuan D yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan B dan C.

Nilai *optical density* dengan *indirect ELISA*

Hasil pengujian sampel dengan menggunakan *indirect ELISA* untuk mengetahui nilai OD yang terbentuk dapat dilihat pada Tabel 2.

Hari ke 1 pada Tabel 2 merupakan nilai OD pada saat ikan koi belum divaksin dengan *whole protein* spora *Myxobolus koi*. Tabel 2 menunjukkan nilai OD tertinggi pada perlakuan B (ikan divaksin dan diinfeksi 80 spora/ekor *M. koi*) sebesar 0,593 di hari ke 30, sedangkan yang terendah pada perlakuan D (ikan tidak divaksin tetapi diinfeksi 80 spora/ekor *M. koi*) sebesar 0,064 di hari ke 30. Gambar 5.8 menunjukkan grafik nilai OD pada masing-masing perlakuan.

Penentuan kelulushidupan (SR)

Hasil perhitungan SR menunjukkan tingkat kelulushidupan tertinggi pada perlakuan C (ikan divaksin tanpa diinfeksi spora *M. koi*) dan perlakuan A (kontrol) sebesar 100%, sedangkan yang terendah pada perlakuan D (ikan tidak divaksin dan diinfeksi dengan 80 spora/ekor *M. koi*) dengan nilai SR sebesar 60%.

Hasil analisis *whole protein* spora *M. koi* dengan SDS-PAGE menunjukkan adanya protein yang digambarkan dalam bentuk pita-

pita pada gel SDS-PAGE. Ditemukan 6 pita (band) pada gel SDS-PAGE yang tampak jelas, yaitu protein dengan berat molekul (BM) 68.1 kDa, 38.5 kDa, 25.6 kDa, 23 kDa, 21.7 kDa dan 18.9 kDa. Hasil tersebut menunjukkan bahwa protein yang ditemukan memiliki berat molekul yang tinggi. Hal ini sesuai dengan penelitian Chavda *et al* (2010) yang mengemukakan hasil analisa elektroforesis SDS-PAGE dari spora *Myxobolus cerebralis* diperoleh ekspresi pita protein dengan berat molekul 130 kDa dan 60 kDa. Abbas *et al* (2000) mengemukakan bahwa suatu molekul memiliki sifat imunogen apabila berat molekulnya lebih dari 5 kDa.

Perubahan jumlah total dan jenis leukosit dapat dijadikan indikator adanya penyakit infeksi tertentu yang terjadi pada ikan. Leukosit merupakan salah satu komponen darah yang berfungsi sebagai pertahanan tubuh spesifik yang akan menetralkan dan memusnahkan patogen melalui proses fagositosis. Limfosit merupakan salah satu bentuk leukosit. Tabel 1 menunjukkan persentase limfosit pada masing-masing perlakuan. Hasil pengamatan limfosit menunjukkan persentase tertinggi sebesar 61% pada perlakuan B (divaksin dan diinfeksi dengan 80 spora/ekor *M. koi*) yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan D (tidak divaksin tetapi diinfeksi 80 spora/ekor *M. Koi*). Peningkatan jumlah limfosit pada ikan yang diinfeksi dengan spora *M. koi* merupakan tanggapan sistem pertahanan tubuh ikan atas masuknya patogen. Hal ini sesuai dengan pendapat Bastiawan dkk (2001), limfosit berfungsi sebagai penghasil antibodi untuk kekebalan tubuh dari gangguan penyakit.

Pada dasarnya sel limfosit terdiri dari dua populasi yaitu sel B dan sel T. Sel B mempunyai kemampuan untuk bertransformasi menjadi sel plasma yaitu sel yang memproduksi antibodi. Sel T sangat berperan dalam kekebalan berperantara sel (sel T sitotoksik) dan mengontrol respons imun (sel T supresor) (Kresno, 2001). Setelah terjadi pengikatan antigen dengan reseptor antigen sel limfosit, maka sel limfosit akan membelah dan berdiferensiasi menjadi sel efektor dan sel memori (Tizard, 1988).

Persentase monosit masing-masing perlakuan ditunjukkan pada Tabel 1. Persentase monosit tertinggi pada perlakuan B yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan D dan C. Peningkatan jumlah monosit bila dibandingkan dengan kontrol disebabkan karena monosit memfagositosis spora *M. koi* yang masuk dalam tubuh ikan. Hal ini sesuai dengan pendapat bahwa monosit bersama dengan makrofag akan

memfagosit agen penyebab penyakit yang masuk dalam tubuh. Bastiawan dkk (2001) menjelaskan, monosit berfungsi sebagai fagosit terhadap benda-benda asing yang berperan sebagai agen penyakit.

Jumlah neutrofil pada perlakuan B, C dan D mengalami penurunan bila dibandingkan dengan perlakuan A (kontrol) seperti ditunjukkan pada Tabel 1. Hal ini disebabkan adanya kenaikan pada limfosit dan monosit sehingga neutrofil menurun. Selain itu neutrofil tidak terlalu berperan dalam merespon infeksi yang diakibatkan oleh parasit. Heterofil lebih banyak berperan pada infeksi yang diakibatkan oleh bakteri.

Pengamatan terhadap jumlah eosinofil menunjukkan persentase tertinggi pada perlakuan D sebesar 14% bila dibandingkan dengan perlakuan A (kontrol) sebesar 9%. Infeksi spora *M. koi* meningkatkan jumlah eosinofil pada darah ikan. Hal ini sesuai dengan pendapat Tizard (1988) yang menyatakan bahwa eosinofil merupakan salah satu sel pertahanan tubuh yang dominan di dalam darah dan akan meningkat tajam jumlahnya bila terjadi infeksi penyakit parasiter.

Pengamatan basofil pada perlakuan menunjukkan persentase yang kecil yaitu 1,4% pada kontrol, basofil bahkan tidak ditemukan pada perlakuan D. Affandi dan Tang (2002) menyatakan bahwa persentase basofil di dalam darah ikan berkisar antara 0.17 - 0.194 % dan berukuran 8-12 μm . Feldman *et al* (2000) menerangkan bahwa keberadaan basofil di dalam sirkulasi darah telah diamati hanya pada sejumlah kecil dari spesies ikan yang ada. Bahkan basofil lebih jarang ditemukan pada pemeriksaan darah dibandingkan dengan eosinofil.

Hasil pengamatan uji ELISA menunjukkan bahwa vaksin *whole protein* spora *Myxobolus koi* dapat menginduksi terbentuknya antibodi pada ikan koi. Tabel 2 menunjukkan nilai *optical density* tertinggi pada ikan yang divaksin kemudian diinfeksi dengan spora *M. koi* (perlakuan B) sebesar 0,593 pada hari ke 30 bila dibandingkan dengan perlakuan A (kontrol). Peningkatan nilai OD pada ikan yang divaksin kemudian diinfeksi dengan *whole protein* spora *M. koi* menunjukkan kemampuan proteksi vaksin tersebut terhadap infeksi myxobolus. Hal ini diperkuat oleh pendapat Baratawidjaja (1996) tentang mekanisme respon imun pada ikan, ketika antigen (vaksin) masuk dalam tubuh ikan maka antigen tersebut akan dipresentasikan oleh MHC, antigen akan ditangkap oleh reseptor pada sel T helper (2), dan sel T helper (2) akan mensekresikan sitokin

yaitu IL-2, IL-4, dan IL-6 yang bertujuan untuk diferensiasi dan proliferasi sel B, diferensiasi sel B akan menghasilkan sel plasma dan sel memori. Selanjutnya sel plasma akan mensintesis antibodi yang spesifik yang akan mengikat antigen sehingga mencegah pergerakan antigen dan memudahkan proses fagositosis.

Hari ke 1 pada Tabel 2 merupakan nilai OD dimana serum darah ikan diambil sebelum diinjeksi *whole protein* spora *M. koi* sehingga nilai OD pada hari ke 1 masing-masing perlakuan hampir sama yaitu berkisar antara 0,264 - 0,267. Hari ke 14 nilai OD perlakuan B dan C mengalami peningkatan hampir 50% karena adanya pemberian vaksin *whole protein* spora *M. koi* yang diinjeksi setelah pengambilan serum hari pertama. Hal ini sesuai dengan pendapat Tizard (1988) bahwa hewan yang diberikan vaksin akan merangsang terbentuknya antibodi yang lebih banyak. Hari ke 21 nilai OD perlakuan B mengalami peningkatan sedangkan pada perlakuan D (tidak divaksin) justru mengalami penurunan. Hal ini disebabkan oleh infeksi spora *Myxobolus* dengan dosis 80 spora/ikan yang diberikan setelah pengambilan serum pada hari ke 14. Nilai OD perlakuan B meningkat karena vaksin yang diberikan sebelumnya memberikan respon tanggap kebal terhadap infeksi *Myxobolus*. Rizkiani (2006) mengemukakan bahwa antibodi merupakan suatu protein globulin yang dibentuk selama adanya rangsangan imunitas. Antigen yang masuk akan dikenali sebagai benda asing oleh antibodi sehingga merangsang terbentuknya protein (immunoglobulin) yang meningkatkan nilai OD dalam darah ikan.

Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah vaksinasi dengan *whole protein* spora *M. koi* dapat meningkatkan respons imun ikan yang ditandai dengan meningkatnya jumlah limfosit. Vaksinasi dengan *whole protein* spora *M. koi* dapat meningkatkan nilai OD (IgM) dalam darah ikan. Vaksinasi dengan *whole protein* spora *M. koi* dapat meningkatkan kelulushidupan (SR) ikan.

Saran yang dapat diajukan dari hasil penelitian ini adalah vaksinasi *whole protein* spora *Myxobolus koi* dengan metode injeksi kurang efektif bila dilakukan pada benih ikan dengan jumlah yang banyak. Vaksinasi dengan metode ini lebih cocok dilakukan terhadap induk koi dengan jumlah yang lebih sedikit dan diharapkan terbentuk imunitas pada anak koi yang dihasilkan, akan tetapi perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis vaksin

pada induk dan respons imun baik pada induk maupun anakan koi.

Daftar Pustaka

- Abbas, S. A., J. J. Glazier., A. H. Lightman and Poher, J. S. 2000. Cellular and Molecular Immunology. *J of Immun.* 36: 959-969p.
- Affandi R dan Tang UM. 2002. *Fisiologi Hewan Air*. Unri Press. Pekanbaru. 38 - 40.
- Anshary, H. 2008. Modul Pembelajaran Berbasis Student Center Learning (SCL) Mata Kuliah Parasitologi Ikan. Jurusan Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Hassanudin. Makasar. Hal 126.
- Bastiawan D, A. Wahid, M. Alifudin dan I. Agustawan. 2001. Gambaran Darah Lele dumbo (*Clarias spp*) yang Diinfeksi Cendawan *Aphanomyces* sp pada pH yang Berbeda. *Jurnal Penelitian Indonesia* 7(3) : 44-47.
- Chavda, D. 2010. Pathogenicity of *Myxobolus* Infection and its Effect on Protein Expression in *Catla catla* Central Gujarat Region. *J. Cell Tiss Research.* 8: 258-261p.
- Dwijayanti, A. A. 2011. Karakterisasi protein nodul pada insang ikan mas (*Cyprinus carpio*) akibat infestasi *Myxobolus sp* dengan metode SDS-PAGE. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga. Hal 2.
- Hadiroseyani, Y. 2003. Potensi Oligochaeta Sebagai Inang Antara Parasit Myxosporea pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L). Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. Hal 37-39.
- Helmiati, S., Triyanto dan H. N. Kamiso. 2005. Prevalensi dan Derajat Infeksi *Myxobolus* sp Pada Insang Benih Karper (*Cyprinus carpio*) di Kabupaten Sleman. Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. Hal 7.
- Lom, J and I. Dykova. 1992. Protozoan Parasites of Fishes. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science.* 26: 315 p.
- Poobalane, S., K. D. Thompson, L. Ardo, N. Verjan, H. J. Han, G. Jeney, I. Hirono, T. Aoki and A. Adams. 2010. Production and efficacy of an *Aeromonas hydrophila* recombinant S-layer protein vaccine for fish. Elsevier. Japan. 3540-3541 p.

- Rizkiani, F. 2006. Produksi Antibodi Poliklonal oleh Toksin Insektisida *Photorhabdus* spp dan Deteksinya dengan Teknik NCM-ELISA. Program Studi Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor. Hal 4-5.
- Rukyani, A. 1990. Histopathological Changes in The Gill of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Infected with the Myxosporean Parasite *Myxobolus Koi Kudo*. 1920: 337-341.
- Tizard I. 1988. *Pengantar Immunologi Veteriner*. Ed ke-2. Partodirejo M, Hardjosworo S, penerjemah; Surabaya: Airlangga University Press. Terjemahan dari: *An Introduction to Veterinary Immunology*.