

RESPON IMMUN SEL INTERLEUKIN -4 (IL-4) PADA IKAN KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*) YANG DIPAPAR PROTEIN IMUNOGENIK VIBRIO HARVEYI

Uun Yanuhar

Laboratorium Ilmu-ilmu Perairan Dan Bioteknologi Kelautan
Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya
email: uunyanuhar@yahoo.com

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk melihat ekspresi molekul sel interleukin-4 (IL-4) pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) yang dipapar oleh protein imunogenik *Vibrio harveyi* sebagai salah satu respon immune seluler. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen yaitu mengadakan percobaan untuk melihat suatu hasil. Prosedur penelitian meliputi isolasi protein imunogenik *Vibrio harveyi*, elektroforesis SDS-PAGE protein *Vibrio harveyi*, separasi protein dan pemotongan pita protein, elektroelusi dan dialisa, uji klinis protein imunogenik *Vibrio harveyi*, dan selanjutnya pemeriksaan imunositokimia untuk melihat ekspresi sel imun (sel IL-4) dengan menggunakan pelabelan secondary antibody anti IL-4 conjugate biotin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pita protein imunogenik *Vibrio harveyi* yang ditemukan bersifat imunogenik adalah berat molekul 51,16 kDa, dan hasil uji *in vivo* secara injeksi intraperitoneal pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) uji dengan dosis 31,6 ug protein/150 g berat ikan kerapu. Ikan kerapu uji *in vivo* dari hasil perlakuan yang telah dipapar dengan protein imunogenik *V. harveyi* 51,16 kDa menunjukkan bahwa respon imun seluler dari sel immune IL-4 yang dideteksi dengan metode imunositokimia dengan menggunakan pelabelan secondary antibody anti IL-4 conjugate biotin pada sel secara *in vivo* ditunjukkan oleh warna coklat keemi *V. harveyi* 51,kDa sebagai Kesimpulan penelitian ini adalah bahwa ikan kerapu yang dipapar protein imunogenik berat molekul 51,16 kDa secara *in vivo* mampu membangkitkan respon immune seluler yakni terbentuknya respon sel IL-4, pada ikan sel immune IL-4 berperan sebagai pertahanan sistem immune seluler terhadap serangan infeksi pathogen.

Kata Kunci: *Cromileptes altivelis*, Immunositokimia, Sel interleukin-4 (IL-4), *Vibrio harveyi*

PENDAHULUAN

Beberapa jenis ikan kerapu yang banyak terdapat di Indonesia seperti kerapu bebek atau tikus (*Cromileptes altivelis*), kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*), kerapu sunu (*Plectropomus leopardus*), kerapu lumpur (*Epinephelus coioides*), kerapu malabar (*Epinephelus malabaricus*), dan kerapu bintik atau batik (*Epinephelus bleekeri*), merupakan komoditas andalan untuk dibudidayakan karena memiliki nilai jual yang tinggi (Aslianti, *et al.*, 2003). Salah satu komoditi bernilai ekonomis tinggi yang banyak diminati konsumen adalah kerapu tikus (*C. altivelis*). Deskripsi yang dilakukan oleh Randall *et al.*, (1993), menyebutkan bahwa ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) memiliki sirip dorsal X, 17-19; sirip anal III, 10; sirip pectoral 17 – 18; sirip garis

lateral 53 – 55; sirip berbentuk *sikloid*; bagian dorsal berbentuk cembung (*concave*); tebal tubuh 2,6 – 3,0 inci SL; tidak mempunyai gigi *carine*; lubang hidung besar berbentuk bulan sabit vertikal dan sirip caudal membulat.

Gangguan utama pada komoditi budidaya ikan kerapu ini adalah serangan bakteri oleh kelompok vibriosis dan juga virus. Salah satu bakteri patogen yang ditemukan pada infeksi ikan kerapu adalah *Vibrio harveyi* (*V. Harveyi*) seperti dikatakan oleh Jun *et al* (2003). Telah diketahui bahwa *Vibrio* merupakan patogen oportunistik yang dalam keadaan normal ada dalam lingkungan pemeliharaan, kemudian berkembang dari sifat yang saprofitik menjadi patogenik jika kondisi lingkungannya memungkinkan. Bakteri *vibrio* ini juga dapat hidup di bagian tubuh organisme

lain baik di luar tubuh dengan jalan menempel, maupun pada organ tubuh bagian dalam seperti hati, usus dan sebagainya (Feliatra, 1999).

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Brenner, D.J, et al, 2004) menerangkan bahwa strain *Vibrio* dimasukkan ke dalam Gamma-Proteobacteria. Bakteri ini merupakan bakteri Gram negatif, berbentuk batang, mesophilic dan chemoorontrophic. Memiliki metabolisme *facultative fermentation*. Ditemukan di habitat perairan dan termasuk ke dalam kelompok eukaryotic. Secara umum bakteri ini tumbuh pada *marine agar* serta pada media TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose) (Fabiano et al, 2004).

Buller (2004) juga menyebutkan bahwa *Vibrio harveyi* menyebabkan kematian pada ikan hiu dan abalone dan menyebabkan *necrotizing enteritis* pada ikan flounder, *gastroenteritis* pada ikan Kerapu, *systemic disease*, *ulcerative disease*, *necrosis* serta *vibriosis*. Tanda terjangkitnya bakteri ini pada inang adalah terjadinya *white spot* pada kaki abalon dan menyebabkan hilangnya kemampuan lekat kaki. Juga menyebabkan necrotic, red anus, penyakit pada ginjal ikan, luka pada mata, black spot pada exoskeleton, dan hepatopancreas.

Meluasnya dampak yang diakibatkan oleh bakteri *Vibrio harveyi* khususnya pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) maka perlu dilakukan penelitian mengenai ekspresi respon ekstraseluler protein reseptor untuk meningkatkan sistem kekebalan tubuh ikan yang tahan terhadap penyakit khususnya respon imun seluler.

Fungsi respon seluler dari reseptor ikan kerapu diperankan oleh beberapa parameter sel imun untuk menghasilkan respon yang terbentuk. MHC (*Major Hstocompatibility Complex*) merupakan salah satu molekul yang berperan penting dalam sistem imun ikan. Antigen jika

masuk didalam sel inang atau 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 (Baratawidjaja, 1996).

Salah satu sel imun adalah sitokin, dimana sitokin yang berperan dalam menstimulasi proliferasi dan diferensiasi sel B adalah interleukin 4 (IL-4). Oleh karena itu, dalam penelitian ini akan dilakukan pengamatan ekspresi IL-4 pada sel darah ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) yang dipapar protein adesin *Vibrio harveyi* sebagai protein imunogenik dengan berat molekul 51,6 kDa secara in vivo untuk memberikan pertahanan pada ikan kerapu terhadap infeksi bakteri.

METODE PENELITIAN

Metode yang digunakan adalah metode eksperimen dengan obyek penelitian ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*), protein imunogenik bakteri *Vibrio harveyi* 51,6 kDa, sel darah untuk melihat respon sel immune Interleukin-4 (IL-4).

Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi pH meter, refraktometer, termometer, pembakar bunsen, pipet tetes, beaker glass, erlenmeyer, mortar, laminary air flow, sectio set, masker, gloves, *ependorf* 1,5 ml, *falcon* 15 ml dan 50 ml, *mikropipet* 20 μ l, 200 μ l dan 1000 μ l, *blue tip*, *yellow tip*, freezer -80 $^{\circ}$ C, *aluminium foil*, kapas, kertas label, *sentrifuge* 4 $^{\circ}$ C, *refrigerator* 4 $^{\circ}$ C, *sputit* 1 cc, timbangan analitik, tabung

reaksi, cawan petri, *magnetik stirrer*, sendok erlenmeyer, *chamber dot blot*, seperangkat *elektroforesis* (SDS-PAGE), baki/nampan, kotak penyimpanan gel, kamera digital.

Bahan

Bahan yang digunakan adalah ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) normal dan ikan kerapu tikus yang positif terinfeksi bakteri *Vibrio harveyi*, *buffer ekstrak*, PBS (*Phospat Buffer Saline*), *alkaline phospatase subtrat* (chromogen NBT) dan aquadest, *stacking gel* 5% yang meliputi : akrilamid 30%, Tris HCL 1.5 M pH 6.8, dH₂O, SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 10%, APS (*Ammonium Persulfat*) 10%, TEMED (*tetra ethylene diamine*); *separating gel* 12,5% dengan komposisi meliputi : akrilamid 30%, Tris HCL 1.5 M pH 8.8, dH₂O, SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 10%, APS (*Ammonium Persulfat*) 10%, TEMED (*tetra ethylene diamine*); RSB (*Reducing Sampel Buffer*) dengan perbandingan 1:1 (RSB : sampel); marker PRO-STAINTM; *staining solution* (commasie blue) dan *destaining solution* (metanol; asam asetat glasias; aquades), *running buffer*, es batu dan aquades.

Aklimatisasi Ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*)

Ikan uji yang digunakan yaitu ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) dari Balai Pembenuhan Air Payau (BPAP) di Situbondo. Ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) yang digunakan berukuran antara 10-15 cm. Benih ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) yang baru datang tidak langsung diberikan pakan, karena benih ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) memerlukan adaptasi terhadap media pemeliharaannya yang baru. Adaptasi ini dibutuhkan selama 12 jam, pakan diberikan setelah ikan terlihat sehat dan agresif. Pakan yang digunakan berupa ikan kembung segar yang dicacah kecil-kecil. Pemberian pakan dilakukan

sebanyak dua kali per hari, yaitu pada jam 08.00 dan 15.00 WIB dan kontrol terhadap media air pemeliharaan selalu dilakukan.

Isolasi Bakteri *Vibrio harveyi* dan Isolasi Protein Imunogenik

Isolasi Bakteri *Vibrio harveyi* didatangkan dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Bakteri dikultur pada medium BHI kemudian dilakukan penentuan konsentrasi bakteri dengan spektrofotometer.

Crude protein *Vibrio harveyi* diisolasi dari organ mata, otak, dan ginjal kerapu tikus yang positif terinfeksi *Vibrio harveyi*. Otak, mata, dan ginjal kerapu tikus normal juga dilakukan isolasi crude proteinnya sebagai pembanding. Metode isolasi crude protein *Vibrio harveyi* mengacu pada metode Yasumoto (2006) untuk mendapatkan homogenat protein.

Homogenat selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 50.000 rpm selama 1 jam pada suhu 4⁰C dan dilanjutkan dengan 150.000 rpm selama 3 jam pada suhu 4⁰C dengan menggunakan Ultrahigh centrifuge (OptimaTM MAX-XP, Beckman Coulter, USA). Crude protein *Vibrio harveyi* dan ikan normal disimpan dalam deepfreezer -80⁰C hingga untuk pengujian selanjutnya. Pellet yang dihasilkan merupakan *whole cell* sedangkan supernatan adalah *crude protein* bakteri *Vibrio harveyi*.

Elektroforesis Protein dengan SDS-Page

Metode elektroforesis menggunakan SDS-PAGE (Biorad). Gel terdiri dari dua lapis yaitu *separating gel* (gel sebagai media pemisah protein) dan *stacking gel* (gel pengumpul sampel). Dalam *separating gel* komposisi yang dipakai adalah akrilamide 30%, Tris HCL 1.5 M pH 8.8, dH₂O, SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 10%, APS (*Ammonium Persulfat*) 10%, TEMED (*tetra ethylene diamine*). Sedangkan dalam *stacking gel* akrilamide 30%, Tris HCL 1.5 M pH 6.8, dH₂O, SDS

(Sodium Dodecil Sulfate) 10%, APS (Ammonium Persulfat) 10%, TEMED (tetra ethylene diamine). Larutan *separating gel* yang telah dibuat dalam Erlenmeyer dituangkan ke dalam *plate* pembentuk gel menggunakan pipet (dijaga jangan sampai terbentuk gelembung udara) sampai tiga perempat tinggi *plate*. Perlahan dituangkan air diatas larutan gel agar permukaan gel tidak bergelombang. Dibiarkan memadat selama kurang lebih 10 menit. Setelah itu air yang menutup *separating gel* dibuang. Selama menunggu *separating gel* memadat, *stacking gel* disiapkan kedalam erlenmeyer. Selanjutnya segera dituangkan larutan kedalam *plate* pembentuk gel menggunakan pipet sampai *plate* penuh. Perlahan diselipkan sisir pembentuk sumur sampel kedalam *stacking gel* segera setelah dituang. Setelah gel memadat sekitar 15 menit, sisir diangkat.

Sampel protein dipanaskan 100°C selama 5 menit, sebagai bahan warna adalah RSB dengan perbandingan 1:1. Sampel dimasukkan sumuran gel menggunakan mikropipet per sumuran masing – masing 18µl kemudian dielektroforesis dengan Voltage 90 V, 400 mA, selama 120 menit. Selanjutnya gel diangkat dari chamber, pewarnaan dilakukan dengan merendam dalam *staining solution* selama 1 jam sambil di *shaker* atau digoyang-goyang secara manual. setelah itu di hentikan pewarnaan dengan *destaining solution* dan kemudian diamati.

Gel hasil SDS PAGE dianalisa dengan cara menghitung band yang muncul. Dari hasil pewarnaan gel akan diperoleh hasil elektrogram yang berupa pita-pita protein. Pada elektrogram diukur jarak pergerakan masing-masing protein standar (*marker*) dan dicatat nilai Rf-nya dimana Rf merupakan perbandingan antara jarak pergerakan pita dari tempat awal dengan jarak pergerakan warna dari tempat warna.

Selanjutnya untuk membuat kurva kalibrasi berat molekul, nilai Rf ditempatkan sebagai sumbu Y dan berat molekul yang biasanya dinyatakan sebagai fungsi dari log berat molekul ditempatkan sebagai sumbu X. Grafik yang didapatkan berupa grafik linier dengan persamaan garis $y = a + bx$. Mobilitas dari suatu protein yang belum diketahui berat molekulnya dapat diukur dengan rumus diatas dan berat molekulnya dapat dicari dengan mengplotkan langsung pada kurva standart berat molekul atau dapat dihitung dengan menggunakan persamaan garis dari kurva standart berat molekul.

Berat molekul pita protein yang telah dihitung menggunakan persamaan linear dari jarak *separating gel*. Kemudian pita protein dari *Vibrio harveyi* diseleksi untuk digunakan sebagai kandidat protein adhesin berdasarkan dari pita major yang muncul dan tidak bergandeng dengan pita protein yang lain (*non-dimer*). Pemotongan pita protein menggunakan pemotong gel. Gel yang telah dipotong disimpan dalam larutan running buffer untuk dilakukan elusi.

Elektroelusi dan Dialisa Protein

Kandidat protein adhesin *Vibrio harveyi* pada pita protein dipisahkan dengan metode elektroelusi menggunakan horisontal elektroforesis (Biorad). Potongan-potongan gel dari masing-masing kandidat protein adhesin dimasukkan dalam membran celofan kemudian dielektroforesis pada 120 V, 400 mA selama 120 menit.

Protein selanjutnya didialisa dalam larutan PBS pH 7,4 pada suhu 4 °C selama 48 jam. Cairan dalam kantung selofan selanjutnya diambil dan dimasukkan dalam mikrotube dan dipresipitasi dengan menginkubasi pada larutan acetone (1:1 v/v) semalam pada suhu 4 °C. Campuran protein dan acetone selanjutnya disentrifus pada 12.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C. Protein didapatkan dalam

bentuk pellet, dikeringanginkan dan dilarutkan dalam 100 µl tris HCl 0,5 M, pH 8,6. Selanjutnya dilakukan pengukuran konsentrasi protein menggunakan Nanodrop Spectrophotometry ND 1000 dengan Absorbansi 1 pada 280 nm.

Pengujian Protein Immunogenik Pada Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) secara *In vivo*

Protein yang menunjukkan nilai hemaglutinasi paling tinggi dari *Vibrio harveyi* selanjutnya dilakukan uji klinis pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) untuk mendapatkan antibodi anti-protein adhesin *Vibrio harveyi*. Uji klinis dilakukan dengan menggunakan 4 ekor ikan kerapu (ukuran 150-200 g) untuk protein immunogenik *Vibrio harveyi* serta 4 ekor lainnya digunakan untuk kontrol (ikan normal). Sebelum perlakuan injeksi, ikan diaklimatisasi terlebih dahulu selama 1 bulan.

Protein immunogenik dari *Vibrio harveyi* disuntikkan secara intra peritoneal (i.p) dengan konsentrasi 33 g/150 g ikan dengan volume 0,1 ml/ikan. Penyuntikan dilakukan dengan mencampurkan protein adhesin dengan *Complete Freund's adjuvant* (CFA) (1:1 v/v). Tujuh hari setelah penyuntikan pertama dilakukan penyuntikan kedua (*booster*) dengan volume dan konsentrasi protein yang sama dengan penambahan *Incomplete Freund's adjuvant* (IFA). Ikan dipelihara selama 14 hari dengan pemberian pakan menggunakan ikan rucah hingga kenyang (*ad libitum*) dengan aerasi dan pergantian air sekitar. Serum dari masing-masing ikan perlakuan dan kontrol didapatkan dengan mengambil darahnya pada hari ke-14 setelah injeksi pertama. Darah disentrifus pada 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C untuk mendapatkan serumnya. Serum disimpan dalam -20 °C hingga untuk pengujian berikutnya.

Pemeriksaan Imunositokimia dengan Pelabelan *Secondary Antibodi Mouse Anti IL-4 Conjugate Biotin*

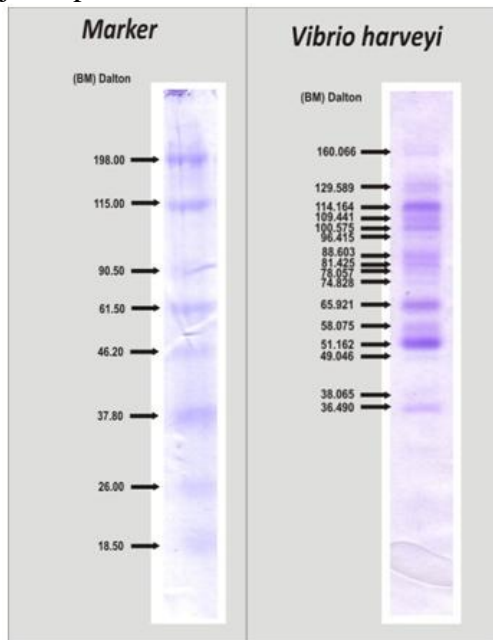
Uji Imunositokimia untuk deteksi antigen dengue pada *head squash* (apusan sel.). Preparat *head squash* (apusan sel) difiksasi dengan methanol dingin 3-5 menit, selanjutnya ditetesi *Peroxidase blocking solution* (H₂O₂) 10 menit. Diberi *prediluted blocking serum* (protein blocker) 15 menit, kemudian dikeringkan. Dan inkubasi dengan Antibodi primer (antibodi monoklonal DSSC7) semalam pada 4°C. Selanjutnya cuci dengan PBS (*phospat buffer saline*) segar 3x masing-masing 2 menit kemudian keringkan dengan tisu langsung tungkan objek glass ke atas tisu. Diinkubasi lagi dengan *Biotinylated universal secondary antibody* (antibodi sekunder anti tikus) 20 menit pada suhu ruang, selanjutnya cuci dengan PBS segar 3x masing-masing 2 menit kemudian keringkan, ditetesi dengan *Trekavidin-HRP* 10 menit. Cuci dengan PBS segar 3x masing-masing 2 menit kemudian keringkan selama 3 menit. Siapkan betazoid DAB chromogen solution dengan mencampur 1 µl DAB chromogen dengan substrat buffer 100 µl kemudian teteskan pada preparat selama 5 menit cuci dibawah air kran, kemudian keringkan selama 3 menit. Tetesi dengan *Mayer hematoxilen* 1 menit sebagai counterstain inti berwarna biru. cuci dibawah air kran, selanjutnya dehidrasi dengan ethanol 100 % sekali, clearing dengan Xylen atau Xylol sekali, dan selanjutnya ditetesi dengan entelan sebagai *Mounting media*, tutup dengan *cover slip*, dan diperiksa dibawah mikroskop.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Elektroforesis Pita Protein Immunogenik *Vibrio harveyi*

Eksresi infeksi *V harveyi* pada level protein akan terdeteksi dengan menggunakan SDS-PAGE. Hasil

elektroforesis dengan menggunakan gel poliakrilamid 12.5% terhadap *crude protein Vibrio harveyi* memberikan gambaran pita protein yang terdiri dari enam belas pita protein dengan berat molekul masing-masing yaitu 160.06 kDa, 129.58 kDa, 114.16 kDa, 109.44 kDa, 100.57 kDa, 96.41 kDa, 88.60 kDa, 81.42 kDa, 78.05 kDa, 74.82 kDa, 65.92 kDa, 58.07 kDa, 51.16 kDa, 49.04 kDa, 38.06 kDa dan 36.49 kDa, seperti tersebut disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Pita protein 51.162 kDa

Keterangan:

- a. Marker Pro STAIN™
- b. Berat molekul (BM) *crude protein V.harveyi*

Protein imunogenik adalah protein yang bila dimasukkan dalam suatu sel atau organism akan membangkitkan fungsi dalam system imun komplek. Sistem imun ini berfungsi untuk memproteksi diri pada ikan yang telah di imunisasi terhadap antigen yang bersifat pathogen yang telah masuk.

Pita-pita protein tersebut di atas dipotong untuk dilakukan elektroelusi untuk memisahkan protein dari matriks

gel. Protein yang telah dipisahkan dari matriks gel didialisa untuk pencucian dengan PBS dan dipresipitasi dengan acetone. Protein-protein spesifik tersebut disimpan dalam freezer -20 °C hingga digunakan sebagai protein imunogenik dari *Vibrio harveyi* untuk pemboosteran ikan kerapu tikus.

Imunisasi Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) Secara In vivo Dengan Protein Imunogenik *V. harveyi* 51,16 kDa

Protein imunogenik dari *Vibrio harveyi* disuntikkan secara intra peritoneal (i.p) dengan konsentrasi 33 g/150 g ikan dengan volume 0,1 ml/ikan. Penyuntikan dilakukan dengan mencampurkan protein adhesin dengan *Complete Freund's adjuvant* (CFA) (1:1 v/v). Tujuh hari setelah penyuntikan pertama dilakukan penyuntikan kedua (*booster*) dengan volume dan konsentrasi protein yang sama dengan penambahan *Incomplete Freund's adjuvant* (IFA). Ikan dipelihara selama 14 hari dengan pemberian pakan menggunakan ikan rucah hingga kenyang (*ad libitum*) dengan aerasi dan pergantian air sekitar. Serum dari masing-masing ikan perlakuan dan kontrol didapatkan dengan mengambil darahnya pada hari ke-14 setelah injeksi pertama. Darah disentrifus pada 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C untuk mendapatkan serumnya. Serum disimpan dalam -20 °C hingga untuk pengujian berikutnya

Pemboosteran pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) dilakukan sebanyak tiga kali yaitu pemboosteran 1 selama 7 hari, pemboosteran 2 selama 14 hari, pemboosteran 3 selama 21 hari. Tujuan dari perlakuan sebanyak tiga kali ini adalah untuk dibangunnya antibodi secara maksimal dan dirasa perlakuan sebanyak tiga kali telah cukup. Kegiatan ini dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Proses Penyuntikan Ikan

Dosis yang digunakan dalam penyuntikan ikan sebanyak 31,6 μ L. banyaknya dosis yang disuntikkan ini tergantung dari kepadatan protein dan berat badan ikan.

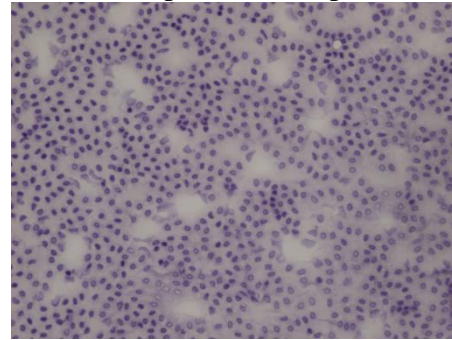
Gejala yang timbul adalah ikan menunjukkan gejala stres, hilangnya nafsu makan, perubahan warna kulit menjadi lebih gelap serta perubahan perilaku. Infeksi ini bertujuan untuk mendapatkan antibodi ikan secara maksimal yang akan digunakan untuk uji pathogenesis selanjutnya.

Penggunaan ikan kerapu tikus dengan ukuran sekitar 150 g dalam uji klinis diharapkan bahwa ikan pada ukuran tersebut telah memiliki sistem imun yang sempurna sehingga produksi sel-sel dan molekul-molekul yang berperan dalam sistem imun ikan kerapu ikan dilakukan secara optimal..

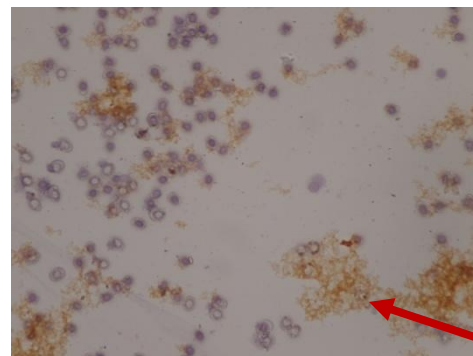
Ekspresi Sel Interleukin-4 (IL-4) Pada Sel Darah Ikan Kerapu Teknik Imunositokimia

Ekspresi sel imun (molekul sel IL-4) dapat dilihat dengan teknik imunohistokimia melalui pelabelan *secondary antibody conjugate biotin* pada jaringan ikan yang telah dipapar protein imunogenik *Vibrio harveyi* secara *in vivo*. Hasil uji IHC menunjukkan adanya perubahan struktur sel yakni bagian lisosom melalui pemeriksaan mikroskop

inverted dapat dilihat pada Gambar 3.



A



B

Gambar 3. Respon seluler IL-4

Keterangan: **A.** Respon negative IL-4 pada sel darah (perlakuan tanpa protein imunogenik 51,6 kDa *V. harveyi*; **(B)** Respon positif IL-4 pada sel darah (dengan perlakuan protein imunogenik 51,6 kDa *V. harveyi*) hasil uji *in vivo*

Hasil uji imunositokimia secara *in vivo* dari sel darah ikan kerapu dapat terlihat perubahan struktur sel yang ditandai dengan warna coklat keemasan pada bagian sitoplasma sel, ini menunjukkan adanya reaksi silang antara protein imunogenik 51,6 kDa yang dipapar pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) dalam bentuk sel darah ikan dengan terbentuknya system immune yakni sel imun (sel IL-4) dengan *seconadary antibody anti IL-4 conjugate biotin*. Perlu diketahui bahwa serangan *Vibrio harveyi* pada ikan kerapu dapat menyebabkan *exophthalmia* yaitu menurunnya kemampuan kornea (Austin, 2007). Proses yang terjadi pada sel darah dapat menyebabkan kemampuan sistem imun

menurun dan juga gangguan keseimbangan tubuh ikan.

Pada sel darah ikan terdapat reseptor, diantaranya adalah Laminin.. Laminin adalah komponen ECM yang termasuk kelompok Glikoprotein yang menjadi komponen utama dari semua Basement Membrane (BM). Fungsi ECMs digunakan oleh sel untuk adhesi, migrasi, dan selain itu hubungan ini akan meregulasi phenotype dan tingkah laku sel. Fungsi regulatori ini dimediasi oleh matrik sel reseptor pada sel, yang bertindak sebagai ikatan dan signal sel. yang pada akhirnya terjadi exophthalmia (Austin, 2007).

Head kidney juga merupakan sumber sel immune yang melimpah berguna untuk system pertahanan tubuh, sel didalam head kidney diantaranya adalah sel limfoid yang bertindak penting dalam induksi dan elaborasi respon imun. Selain sel tersebut juga terdapat sel makrofag sinusoidal dan sel endothelial pada head kidney berpartisipasi dalam menangkap partikel dan substansi lain dari aliran darah.. Head kidney adalah produsen antibodi dan mengakumulasikan melanomakrofag yang mampu menyimpan dan memelihara antigen dalam waktu yang lama (*immunological memory*) (Press.C.McL, 1999), disinilah darah yang terproliferasi didalam ginjal dan juga tulang belakang dapat dilihat respon terhadap antigen yang masuk di dalam tubuh inang.

Dimungkinkan bahwa *V. harveyi* menyerang bagian sel darah setelah masuk kedalam tubuh ikan secara bertahap. Setiap antigen ekstraseluler yang masuk ke dalam tubuh termasuk bakteri *V. harveyi* akan ditangkap oleh APC (*antigen presenting cells*) yang selanjutnya antigen tersebut.

Antigen merupakan bahan asing yang dikenal dan merupakan target yang akan dihancurkan oleh sistem kekebalan tubuh. Antigen ditemukan pada permukaan seluruh sel. Akan tetapi dalam keadaan

normal, sistem kekebalan tubuh tidak bereaksi terhadap selnya sendiri. Sehingga dapat dikatakan antigen merupakan sebuah zat yang menstimulasi tanggapan imun, terutama dalam produksi antibodi. Antigen biasanya berupa protein atau polisakarida, tetapi dapat juga berupa molekul lainnya, termasuk molekul kecil (hapten) yang dipasangkan ke protein-pembawa.

Molekul-molekul antigen yang telah ditangkap oleh APC selanjutnya akan mengalami proses deferensiasi untuk di dalam permukaan sel imun selanjutnya akan diekspresikan oleh molekul MHC II ke permukaan sel APC untuk dipresentasikan kepada sel Th2. Sel Th2 yang teraktivasi selanjutnya akan memproduksi sitokin-sitokin diantaranya IL2, IL4, IL6, dan IL10 untuk dijadikan sebagai sinyal kepada sel B. Sel B yang teraktivasi oleh sitokin-sitokin tersebut selanjutnya akan mengadakan proliferasi dan diferensiasi menjadi sel B plasma dan sel B memori. Sel plasma akan berperan untuk mensekresi antibodi yang spesifik terhadap antigen yang masuk sedangkan sel B memori akan mengekspresikan reseptor-reseptor yang spesifik terhadap antigen tersebut di permukaannya yang berperan untuk lebih mengenali antigen pada infeksi berikutnya.

Dengan demikian dari hasil penelitian ini terlihat bahwa Interleukin -4 (IL-4) pada sel darah ikan kerapu terbentuk dengan ditandai oleh reaksi pewarnaan antibody anti-IL4, yang berarti bahwa sel darah mempunyai sistem kekebalan terhadap *V. harveyi* setelah diberikan protein imunogenik dari *V. harveyi* 51,6 kDa. Perlu diketahui juga bahwa sel darah merupakan salah satu penanda melemah atau menguatkan infeksi jika terjadi infeksi antigen dalam tubuh inang. Oleh karena itu dalam penelitian ini terekspresinya IL-4 didalam sel darah ikan kerapu tikus setelah diberikan protein imunogenik 51,6 kDa *V. harveyi* dapat dikembangkan lebih lanjut baik untuk diagnostik infeksi antigen oleh

V. harveyi bahkan juga untuk bakteri lain. Disisi lain pengembangan protein imunogenik dapat dilakukan lebih jauh untuk meningkatkan system kekebalan tubuh ikan dan juga sebagai imunostimulan untuk barrier pertahanan tubuh ikan terhadap infeksi antigen.

KESIMPULAN

Pemaparan protein imunogenik *Vibrio harveyi* dapat meningkatkan ekspresi sel imun interleukin-4 (IL-4) pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*), hal ini menunjukkan adanya respon immune seluler pada ikan kerapu untuk pertahanan tubuh terhadap serangan atau infeksi bakteri V. harveyi, Hal ini ditandai dengan warna coklat keemasan pada permukaan sel darah yakni pada bagian sitoplasma sel darah terdapat reaksi silang antara a protein imunogenik 51,6 kDa V. harveyi yang dipapar pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) sehingga terbentuk sel imun (sel IL-4) dengan pemeriksaan immunositokimia dengan *seconadary antibody anti IL-4 conjugate biotin p*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K. and A. H. Lichtman. 2005. *Cellular and Molecular Immunology, fifth edition, updated edition*. Elsevier saunders, Pennsylvania.
- Aslianti, T, B. Slamet dan G.S. Prasetyo. 2003. Aplikasi Budidaya Ikan Kerapu Bebek (*Cromileptes altivelis*) di Teluk Ekas Kabupaten Lombok Timur Badan Riset Kelautan dan Perikanan, Jakarta.
- Austin,B.,and D.A Austin, 1993. Bacterial Fish Pathogen.2nd edition. Ellis Horwood Ltd., Chishester. Bandung.
- Baratawidjaja, Karnen Garna, 1996. Immunologi Dasar. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Gaya Baru. Jakarta.
- Brenner.D.J, Noel R. Krieg, James T. Staley, 1982. Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology Second Edition Volume Two The Proteobacteria. Springer.USA.
- Buller, Nicky B..2004. Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals : A Practical Identification Manual., CABI Publishing CAB International Wallingford Oxfordshire OX10 8DE . United Kingdom.
- Fabiano L. Thompson, Tetsuya Iida, and Jean Swings.,2004., Biodiversity of Vibrios, Microbiology And Molecular Biology Reviews, Sept. 2004 Vol. 68, No. 3.
- Feliatra.1999. Identifikasi Bakteri Paogen (*Vibrio* sp) Di Perairan Nongsa Batam Propinsi Riau. Jurnal Natur Indonesia 11 (1): 28 – 33.
- Jun L, Norman Y.S. Woo.,2003. Pathogenicity of Vibrios in Fish: an Overview, Journal of Ocean University of Qingdao (Oceanic and Coastal Sea Research) October 31,2003, Vol.2, No.2.
- Press C. Mcl. and Evensen, 1998. The Morphology of The Immune System in Teleost Fshes. Fish & Shellfish Immunology 1999. 9, 309–318. Academic Pres.
- Randall, John E. Phillip C. Heemstra,..1993. FAO Species Catalogue : Vol. 16. Groupers Of The World.

