

DIAGNOSIS SEROLOGIS (ANTIBODI POLIKLONAL) UNTUK PENYAKIT MIKOBACTERIOSIS PADA IKAN GURAMI (*Osphronemus gouramy*)

Hambali Supriyadi¹⁾, Taukhid¹⁾, dan Johan Effendi¹⁾

ABSTRAK

Sukses penanggulangan suatu penyakit akan banyak tergantung pada kecepatan dan ketepatan diagnosisnya. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh alat diagnosis yang cepat dan tepat bagi penyakit mikobakteriosis. Antigen berasal dari bakteri *Mycobacterium fortuitum* diisolasi dari ikan gurami, yang kemudian dicampur dengan "Incomplete Freuds Adjuvant". Antigen disuntikkan kedalam tubuh kelinci jenis "New Zealand" dengan dosis penyuntikan adalah 0,1 mL (dari stok bakteri 10^8 cfu/mL) untuk penyuntikan pertama (priming), sedangkan untuk penyuntikan berikutnya (*booster*) adalah 0,2 mL untuk group A. Untuk group B *priming* 0,2 mL/ekor yang diikuti oleh *booster* 0,2 mL/ekor. Untuk kontrol (group C) hanya disuntik dengan saline, *priming* 0,1 mL/ekor, dan *booster* 0,2 mL/ekor. Koleksi darah dilaksanakan satu minggu setelah penyuntikan terakhir. Pemisahan serum dilakukan dengan pengendapan dan kemudian disentrifugasi pada putaran 12.000 rpm. Pemurnian serum dilakukan dengan cara dialisis dan kemudian dilabel dengan menggunakan "Horse Radish Peroxidase" (HRP). Uji diagnosis dilakukan dengan reaksi antigen *Mycobacterium fortuitum* dengan antibodi yang sudah dilabel dengan HRP dan pembacaan dilakukan dengan teknik ELISA. Hasil estimasi protein menunjukkan bahwa serum A mengandung 15,47 mg/mL, serum B 15,82 mg/mL, dan serum C 10,17 mg/mL. Kandungan antibodi pada pengenceran sampai 1:80, masih dapat bereaksi dengan antigen yang diencerkan 1:40. Antibodi yang paling tinggi terdapat pada perlakuan B ditunjukkan dengan nilai absorban terbesar yaitu 0,152.

ABSTRACT: *Sero-diagnostic of mycobacteriosis on giant gouramy (Osphronemus gouramy). By: Hambali Supriyadi, Taukhid, and Johan Effendi*

*The success of control of fish disease will depend on the accuracy of diagnostic. The rapid and accurate method of diagnostic used will lead to the rapid and accurate control of fish disease. Antigen made from **Mycobacterium fortuitum** mixed with Incomplete Freuds Adjuvant was injected into two groups of New Zealand rabbit with the dose of 0.1 for group A and 0.2 for group B (from stock of 10^8 cfu/mL) mL/rabbit as a priming. Booster was given two times, delivered by injection in every week with the dose of 0.2 mL/rabbit. Control rabbit were injected with sterile saline of 0.1 mL/ rabbit for priming and 0.2 mL/rabbit for booster. Bleeding was conducted one week after last injection. Serum was separated and centrifuged at 12000 rpm, purified by dialysis process and then labeled with Horse Radish Peroxidase (HRP). Diagnostic test was done by antigen antibody reaction and read by ELISA technique. The result of protein estimation of sera indicated that group A serum contained 15.47 mg/mL protein, while group B 15.82 mg/mL and control 10.17 mg/mL. Antibody was still able to react at the dilution of 1:80 with antigen dilution of 1: 40. The highest antibody (absorbance value 0.152) was resulted from treatment B.*

KEYWORDS: *diagnostic, Mycobacterium fortuitum, mycobacteriosis, giant gouramy*

PENDAHULUAN

Salah satu masalah serius yang selalu dihadapi oleh petani ikan adalah penyakit bakterial yang dapat mengakibatkan kematian ikan sekitar 50-100% (Supriyadi & Taufik, 1981; Taufik, 1992; Supriyadi & Rukyani, 1990).

Infeksi penyakit yang sering terjadi pada usaha pembesaran ikan gurami antara lain mata menonjol, bisul pada pangkal ekor, bintik darah di bawah sirip, dan pada gelembung renang. Berdasarkan hasil penelitian tahun 1998/1999 penyakit tersebut

disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium fortuitum*. Penyakit yang disebabkan oleh bakteri tersebut sering disebut "mikobakteriosis". Mikobakteriosis merupakan penyakit yang progresif kronik dengan beberapa gejala klinis antara lain ikan lemah, pembengkakan pada kulit, mata menonjol (*exophthalmia*) lesi, dan borok pada tubuh. Gejala pada organ dalam, biasanya terdapat granuloma yang berwarna putih keabu-abuan terutama pada hati, limfa, ginjal, dan pada daging ikan (Van Duijn, 1981).

Mikobakteriosis biasanya dapat menginfeksi ikan konsumsi dan ikan hias. Kejadiannya telah banyak

¹⁾ Peneliti pada Balai Penelitian Perikanan Air Tawar, Sukamandi

dilaporkan (Nigrelli & Vogel, 1963; Chinabut *et al.*, 1990), bahwa penyakit tersebut dapat menimbulkan kematian lebih dari 20% pada ikan gabus (Limsuwan *et al.*, 1983) dan selain itu penyakit tersebut dapat menurunkan mutu ikan itu sendiri.

Di Indonesia mikobakteriosis telah ditemukan menginfeksi ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) terutama di tempat-tempat yang memiliki sistem budi daya ikan gurami secara intensif. Insidensi infeksiya dapat mencapai 60% (Supriyadi, 1998). Kematian yang diakibatkan dapat mencapai 70-80%. Daerah sebar di Indonesia meliputi: Pulau Jawa, Bali, Nusa Tenggara Barat, dan Sulawesi Utara.

Ikan yang terinfeksi biasanya menunjukkan gejala-gejala lesi seperti cacar, mata menonjol, serta terjadinya pembengkakan pada tubuh ikan. Apabila ikan dibedah maka akan ditemukan *tubercle* yang merupakan ciri khas bagi penyakit tuberkulosis. Selain itu penyakit ini tergolong pada jenis penyakit yang zoonotik yakni dapat menyebabkan infeksi pada kulit dan menyebabkan hipersensitif terutama pada personal yang menangani ikan yang terinfeksi.

Permasalahan yang dihadapi adalah sering terlambatnya usaha penanggulangan penyakit tersebut. Sebagaimana diketahui bahwa untuk menanggulangi suatu penyakit harus terlebih dahulu diketahui jasad penyebab penyakit tersebut. Diagnosis penyakit ikan yang kurang tepat, akan mengakibatkan tindak pengobatan yang tidak tepat pula.

Teknik diagnosis yang cepat dengan cara serologis perlu dikembangkan, untuk memperoleh hasil diagnosis yang tepat (Anderson, 1990; Arkoosh & Kaatari, 1990). Teknik tersebut telah diaplikasikan pada diagnosis terhadap infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* (Supriyadi *et al.*, 1997). Teknik tersebut di atas sangat diperlukan untuk kepentingan diagnosis penyakit mikobakteriosis pada ikan gurami.

Dalam makalah ini akan dikemukakan hasil penelitian yaitu salah satu metode diagnosis untuk penyakit akibat infeksi *Mycobacterium fortuitum* (mikobakteriosis) pada ikan gurami dengan menggunakan antibodi poliklonal. Teknik poliklonal ini merupakan salah satu metode yang cukup dapat diandalkan. Namun demikian teknik dengan menggunakan antibodi monoklonal akan lebih spesifik dan lebih tepat apabila dibanding dengan poliklonal.

BAHAN DAN METODE

Preparasi Antigen

Jasad patogen yang dipakai adalah *Mycobacterium fortuitum*, patogen penyebab penyakit cacar yang

dikoleksi dari hasil penelitian 1998/1999 yang telah diuji Koch Postulate pada ikan sejenis yaitu ikan gurami (*Osphronemus gouramy*).

Dari isolat yang menunjukkan gejala yang sama, kemudian dibuat sediaan berupa sel bakteri utuh (*whole cell*) dengan kepadatan 10^8 cfu/mL dengan menggunakan saline steril sebagai pengencer. Sediaan tersebut kemudian didesintegrasi (dihancurkan) dengan menggunakan *sonicator* sehingga dihasilkan sediaan sonified antigen.

Injeksi Antigen

Antigen tersebut kemudian diinjeksikan ke dalam tubuh kelinci New Zealand di bawah kulit (sub-cutan) untuk penyuntikan awal dan diikuti dengan penyuntikan melalui pembuluh darah (intra vena) untuk penyuntikan berikutnya. Antigen tersebut sebelumnya dicampur dengan *Incomplete Freud Adjuvant*. Penyuntikan dilaksanakan sebanyak 3 kali dengan interval waktu 1 minggu.

Dosis penyuntikan adalah 0,1 mL (dari stok bakteri 10^8 cfu/mL) untuk penyuntikan pertama (*priming*) sedangkan untuk dua penyuntikan berikutnya masing-masing adalah 0,2 mL untuk group A, sedangkan untuk group B adalah *priming* 0,2 mL/ekor yang diikuti oleh penyuntikan berikutnya masing-masing 0,2 mL/ekor. Untuk group kontrol (C) hanya dilakukan penyuntikan dengan saline, *priming* 0,1 mL/ekor dan penyuntikan berikutnya 0,2 mL/ekor.

Pengambilan Darah (*Bleeding*)

Pengambilan darah dilaksanakan 1 minggu setelah penyuntikan terakhir, dengan cara pemotongan/pembelekan saluran darah pada daun telinga. Dari darah yang diperoleh kemudian diambil serumnya dengan jalan pengendapan dan sentrifugasi dengan menggunakan *microcentrifuge* dengan kecepatan putar 12.000 rpm.

Serum yang diperoleh kemudian dimurnikan dengan cara dialisis. Kemudian serum tersebut dikonjugasikan/dilabel dengan menggunakan Horse Radish Peroxidase (HRP).

Uji Diagnosis

Uji diagnosis dilakukan dengan reaksi antigen yaitu dari sediaan *Mycobacterium fortuitum* dengan antibodi yang sudah dilabel dengan HRP. Pembacaan dilakukan dengan teknik ELISA.

HASIL DAN BAHASAN

Hasil pengumpulan serum diperoleh 3 (tiga) kelompok serum yaitu serum A yang berasal dari

kelinci yang diberi antigen awal (*priming*) 0,1 mL/ekor, serum B berasal dari kelinci yang diberi antigen awal 0,2 mL/ekor, dan serum C berasal dari kontrol yang diperlakukan dengan penyuntikan salin steril.

Ketiga kelompok serum tersebut kemudian dimurnikan dengan proses dianalisis, dan setelah itu diestimasi kandungan proteinnya. Hasil estimasi ternyata menunjukkan bahwa serum A mengandung protein 105,47 mg/mL; serum B 15,82 mg/mL; dan serum C 10,17 mg/mL. Hasil tersebut secara deskriptif menunjukkan bahwa perlakuan A dan B menunjukkan hasil antibodi yang berbeda terhadap perlakuan C. Namun demikian antara perlakuan A dan perlakuan B tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Jadi *priming* dengan dosis yang berbeda tidak berpengaruh terhadap produksi antibodi asalkan dosis berikutnya diberikan dalam jumlah yang sama.

Kandungan antibodi dalam serum yang diperoleh ternyata cukup tinggi. Hal ini dibuktikan bahwa dengan pengenceran sampai 1:80, serum tersebut masih dapat bereaksi dengan antigen yang diencerkan 1:40 seperti terlihat dalam Tabel 1. Reaksi yang paling bagus terjadi pada serum yang dihasilkan dari perlakuan B, seperti terlihat dalam tabel menunjukkan

Aplikasi metode ini dapat dilakukan di laboratorium dengan dua cara yaitu dengan menggunakan ELISA dan atau dapat dengan menggunakan metode *direct agglutination test* yaitu reaksi antara antigen dan antibodi secara langsung. Untuk metode pertama tentu saja memerlukan alat yang cukup mahal namun demikian pembacaan hasil reaksinya cukup tepat dan pembacaan dapat langsung dengan menggunakan ELISA *reader*. Pembacaan hasil memang cukup cepat namun preparasinya cukup memerlukan waktu. Pada cara yang kedua dapat dilakukan hanya dengan menggunakan gelas objek yaitu mereaksikan langsung antara antigen dan antibodi. Pembacaan hasil dapat dilakukan antara 5-10 detik walau hasilnya hanya bersifat kualitatif. Namun demikian sebelumnya kita harus menyiapkan antigen. Antigen dapat diisolasi dari ikan yang terinfeksi dan dapat disiapkan dalam waktu 12 jam. Dengan demikian diagnosis hanya memerlukan waktu sekitar 12 jam. Hal ini cukup cepat apabila dibandingkan dengan metode diagnosis konvensional yang paling tidak memerlukan waktu 36 jam.

Metode tersebut dapat dikembangkan untuk dapat digunakan oleh petani kecil di lapangan dengan

Tabel 1. Nilai absorbansi dari hasil reaksi antigen antibodi dengan serum berbagai tahap pengenceran dan antigen diencerkan ¼ kali

Table 1. *The absorbance value of antigen antibody reactions of serum with different dilution levels and antigen dilution of ¼*

Kelompok serum <i>Serum group</i>	Ulangan <i>Replication</i>	Pengenceran serum <i>Serum dilution</i>		
		1/20	1/40	1/80
A	1	0.127	0.129	0.123
	2	0.124	0.141	0.107
B	1	0.121	0.124	0.152
	2	0.135	0.131	0.152
C	1	0.023	0.023	0.021
	2	0.029	0.03	0.03

Keterangan: A: Perlakuan dengan *priming* 0,1 mL/ekor dan booster 0,2 mL/ekor

Treated with priming 0.1 mL/rabbit and booster 0.2 mL/rabbit

B: Perlakuan dengan *priming* 0,2 mL/ekor dan booster 0,2 mL/ekor

Treated with priming 0.2 mL/rabbit and booster 0.2 mL/rabbit

C: Kontrol (*Control*)

nilai absorbansi terbesar yaitu 0,152. Meningkatnya jumlah band dalam elektroforesis dan jumlah serum protein yang dihasilkan dari serum kelinci yang diinjeksi dengan antigen *Mycobacterium* sp. telah dibuktikan oleh Somsiri & Sukrakanchana (1997). Demikian juga tentang ketepatan reaksinya antara antibodi dan antigen masih berlangsung pada jumlah antibodi yang diencerkan.

membuat alat diagnostik praktis yaitu berupa tongkat diagnosis (*stick diagnostic tools*) yaitu tongkat diagnosis yang apabila ditempelkan pada organ yang terinfeksi oleh penyakit tersebut akan menimbulkan reaksi berupa perubahan warna. Untuk pengembangan alat tersebut diperlukan teknik khusus yang dalam teknik pelaksanaannya harus melibatkan tenaga dokter hewan dan ahli farmasi.

KESIMPULAN

Infeksi penyakit mikobakteriosis pada ikan gurami dapat didiagnosis secara cepat dengan menggunakan poliklonal antibodi. Aplikasinya dapat menggunakan metode ELISA maupun dengan *direct agglutination test*. Hasil diagnosis relatif lebih spesifik sehingga dapat membedakan sampai tingkatan strain. Namun demikian metode tersebut masih kalah tepat apabila dibandingkan dengan metode yang menggunakan monoklonal antibodi.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, D.P. 1990. Fluorescent antibody test. In: *Techniques in Fish Immunology*. J.S. Stolen, T.C. Fletcher, D.P. Anderson, B.S. Robertson, W.B. van Muiswinkel (Eds). SOS Publication, 43 de Normandie, Ave, Fair Haven, Nj00704. 3303. USA. p. 1-14.
- Arkoosh, S.L. and S.L. Kaatari. 1990. Quantitation of fish antibody to specific antigen by an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). In: *Techniques in Fish Immunology*. J.S. Stolen, T.C. Fletcher, D.P. Anderson, B.S. Robertson, W.B. van Muiswinkel (Eds). SOS Publication, 43 de Normandie, Ave, Fair Haven, Nj00704. 3303. USA. p. 1-14.
- Chinabut, S.; C. Limsuwan; and P. Chanratchakool. 1990. Mycobacteriosis in the snake head, *Chana striatus* (Fowler). *J. Fish Dis.* 13: 531-535.
- Limsuwan, C., S. Chinabut, K. Pawapuitanon, and O. Lauhavit. 1983. Tuberculosis (mycobacteriosis) in snake head (*Opiocephalus striatus*). N.I.F.I. *Tech. Paper*. Fisheries Department, Thailand.
- Nigrelli, R.F. and H. Vogel. 1963. Spontaneous tuberculosis in fish and other cold-blood vertebrates with special reference to *Mycobacterium fortuitum* Cruz from fish and human lesion. *Zoological* 48. 131-144.
- Somsiri, T. and N. Sukrakanchana. 1997. Antigenic Determination of Fish Mycobacterium Strain: In T.W. Flegel and I.H. MacRae (eds), *Diseases in Asian Aquaculture III*. Fish Health Section. Asian Fisheries Society, Manila.
- Supriyadi, H. dan P. Taufik. 1981. Identifikasi dan cara penanggulangan penyakit bakterial pada ikan lele (*Clarias batrachus*). *Bull. Perik. Darat.* 1 (3):447-454.
- Supriyadi, H. dan A. Rukyani. 1990. Immunopropilaksis dengan cara vaksinasi pada usaha budidaya ikan. *Prosiding Seminar Nasional Ke II, Penyakit Ikan dan Udang*, Bogor. 16-18 Januari 1990.
- Supriyadi, H. Taukhid, dan G. Moekti. 1997. Upaya produksi dan karakterisasi hybridoma untuk penanggulangan bakteri penyakit pada ikan :I. Pembentukan hybridoma penghasil antibodi monoklonal anti *Aeromonas hydrophila*. *J. Bioteknologi Pertanian.* 2(1): 9-13.
- Supriyadi, H. 1998. Insidensi mycobacteriosis pada ikan gurami (*Osphronemus gouramy*). *Seminar Nasional Penyakit Ikan dan Udang III*. Yogyakarta 8-9 November 1999.
- Taufik, P. 1992. Penyakit pada ikan gurami (*Osphronemus gouramy* Lac.) dan penanggulangannya. *Pertemuan Aplikasi Teknologi Budidaya Ikan Gurami*, 24-26 Agustus 1992 Yogyakarta.
- Van Duijn, C. 1981. Tuberculosis in Fishes. *Journal of Small Animal Practice* 22, 39.411.