

## PREPARASI SEDIAAN VAKSIN INAKTIF *Mycobacterium fortuitum*

Edy Farid Wadjdy, Setiadi, Johan Afandi dan Ahmad Wahyudi

Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar  
Jl. Sempur No. 1 Bogor 16154  
E-mail: pelnisbppbat@yahoo.com

### ABSTRAK

Preparasi dalam pembuatan vaksin berperan penting dalam keberhasilan penyediaan bahan material untuk sediaan vaksin. Terdapat beberapa metode yang biasa dilakukan di laboratorium untuk preparasi sediaan vaksin, diantaranya adalah teknik sediaan kering dan teknik sediaan cair. Kegiatan pembuatan sediaan vaksin yang dilakukan pada uji coba ini adalah menggunakan teknik sediaan kering dengan media *shouten* agar sebagai media pengkayaan memperbanyak kultur bakteri *M. fortuitum*. Berdasarkan uji keamanan (*innocuity test*) dan uji *sterility* terhadap sediaan vaksin menunjukkan bahwa vaksin *M. fortuitum* terbukti aman dan tidak menyebabkan efek samping setelah diinjeksi secara *intra peritonial* pada ikan gurame.

**Kata kunci:** preparasi vaksin, inaktif, *Mycobacterium fortuitum*

### PENDAHULUAN

Program vaksinasi saat ini merupakan suatu hal yang dianggap wajib dilakukan oleh sebagian pembudidaya ikan di Indonesia. Vaksinasi telah terbukti dapat meningkatkan produksi hasil panen dan menunjukkan hasil yang sangat signifikan. Salah satu contoh negara yang telah mewajibkan program vaksinasi pada perikanan budidaya adalah Norwegia. Negara tersebut merupakan *leading*. Bukan hal yang tidak mungkin, di masa yang akan datang vaksinasi menjadi bagian dari komponen teknologi pada perikanan budidaya. Dorongan pemerintah terhadap program vaksinasi seperti GERVIKAN merupakan bukti nyata pentingnya program tersebut. Apabila sudah terasa manfaatnya oleh para pembudidaya, tidak menutup kemungkinan vaksinasi menjadi SOP seperti di negara maju seperti Norwegia.

Gurame (*Osphronemus gouramy*) merupakan salah satu jenis ikan air tawar yang telah lama dikembangkan sebagai komoditas budidaya. Keuntungan biologis ikan gurame bagi para pembudidaya antara lain; dapat dipijahkan secara alami, mudah dipelihara dan hidup optimal pada perairan/kolam dengan kadar oksigen minimum (Sigantang & Sarwono, 2005).

Permintaan akan ikan gurame setiap tahunnya terus mengalami peningkatan, khususnya di daerah Jawa Barat dan DKI Jakarta. Cita rasa dan aroma yang khas serta tekstur daging yang kompak menjadikan ikan gurame banyak digemari masyarakat. Harga ikan gurame di pasaran mempunyai nilai ekonomi relatif lebih tinggi dibanding komoditas ikan air tawar lain sehingga banyak petani ikan yang tertarik untuk membudidayakannya (Susanto, 1999).

*M. fortuitum* merupakan bakteri patogen yang dapat menyerang jenis ikan air tawar maupun laut. Tingkat infeksi dalam suatu populasi dapat bervariasi dari 10 hingga 100% (Irianto, 2005). Menurut Rukmono (2010) penyakit *Mycobacteriosis* memiliki tingkat prevalensi sebesar 20-80% dari total populasi pada budidaya ikan gurame. *Mycobacteriosis* merupakan jenis penyakit kronis yang progresif. Butuh waktu lama untuk menunjukkan gejala klinis antara lain ikan lemah, pembengkakan pada kulit, mata menonjol (*exophthalmia*) lesi, dan borok pada badan (Purwaningsih *et al.*, 2009). Kasus kematian akibat infeksi bakteri *M. fortuitum* menjadi penghambat keberhasilan produksi budidaya ikan gurame. Penyakit tersebut mengakibatkan kerugian ekonomi dan menurunkan kualitas produk ikan gurame yang dihasilkan.

*Fish-TB* (Tuberculosis) merupakan penyakit bakterial yang sering muncul pada proses budidaya ikan gurame. Penyakit ini disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium* sp., menyerang pada semua stadia ikan gurame dengan kisaran prevalensi hingga 50% dan bersifat kronis (Supriyadi *et al.*, 2003). Diagnosa penyakit mulai dari isolasi, karakterisasi dan identifikasi perlu dilakukan secara komprehensif sehingga akan memudahkan dalam proses pencegahan, pengendalian dan penanggulangan penyakit ini mengingat kerugian yang ditimbulkannya relatif tinggi. Kegiatan ini bertujuan untuk mengetahui preparasi sediaan vaksin *M. fortuitum* guna pencegahan penyakit *Mycobacteriosis* pada ikan gurame.

## BAHAN DAN METODE

### Waktu dan Tempat

Kegiatan ini dilakukan pada Maret-April 2014, bertempat di Laboratorium Kesehatan Ikan, Instalasi Penelitian dan Pengembangan Pengendalian Penyakit ikan (IP4I), Depok.

### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan antara lain; Isolat 31 bakteri *M. fortuitum*, media *Shouten* agar, akuadest, *Phospat buffer saline*, *Neutral buffer salin* 3%, alkohol 70%. Alat yang digunakan terdiri dari; alat timbang, *bunsen*, jarum ose, *laminar flow*, *inkubator*, *autoclave*, tabung reaksi, cawan petri, *erlenmeyer*, *aluminium foil*, magnetik *stirer*, *refrigerator*, jarum suntik dan bak akuarium volume 60 liter.

### Tata Cara

#### Penyiapan media

- Akuades dipanaskan sebanyak 950 mL dan gliserin 50 mL pada *hot plate* dan

*stirer* hingga mendidih dan dipaastikan bahwa akuades yang digunakan memiliki nilai pH 7

- Ditambahkan bahan bahan antara lain: *bacto agar* 30 gr, *sodium glutamate* 4 gr, *kalium dihidrogen phosphate* 0,5 gr, *magnesium sulfat* 0,5 gr, *sodium citrat* 2 gr, *ferric ammonium citrat* 0,05 gr hingga larut (warna bening mengindikasikan bahwa media telah larut sempurna).
- Media *shauten* disterilisasi pada tekanan 1 atm (suhu 121°C selama 15 menit).
- Media *shauten* yang telah disterilisasi dituangkan pada cawan petri (Gambar 1a) dan didiamkan selama 1-2 jam di *laminar flow* (Gambar 1b), Kemudian disimpan pada *refrigerator* suhu 4°C.

#### Penyiapan isolat bakteri

Bakteri yang digunakan sebagai Master seed adalah *M. fortuitum* isolat 31, diambil dari media penyimpanan (*shauten* cair + Gliserol 5%) yang disimpan di *refrigerator* -20°C, kemudian dikultur sebanyak 0,2 ml pada media *shouten* cair, diinkubasi selama 72 jam pada suhu 28°C. Inokulum yang telah tumbuh selanjutnya disuntikkan pada ikan gurame sebagai uji *postulat koch* (Gambar 2).

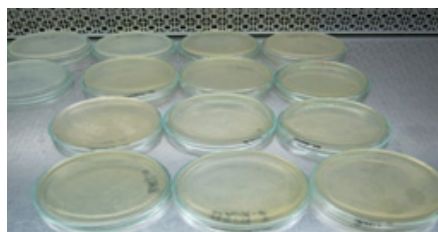
Gejala klinis biasanya muncul pada hari ke 14 -28 hari pasca penyuntikkan, kemudian direisolasi dari organ hati, ginjal atau luka lalu ditanam kembali pada media *shouten* agar untuk dilakukan pemurnian. dan rekarakterisasi.

#### Penanaman dan pemanenan

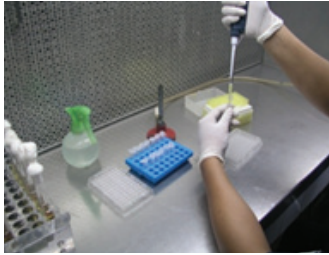
Sebanyak 1 ose biakan *M. fortuitum*, disebar secara merata ke dalam 3 buah cawan petri *Shauten* agar, diinkubasi selama 72 jam pada suhu 28°C, selanjutnya biakan dipanen ke dalam 100 ml *Phosphate buffer saline*. Proses Inaktifasi dilakukan dengan sonikasi pada 150 watt sebanyak 3 kali



Gambar 1a. Penuangan media agar pada cawan petri



Gambar 1b. Pendiaman cawan petri yang berisi media 1-2 jam



Gambar 2a. Pengambilan bakteri isolat 31



Gambar 2b. Bakteri *M. fortuitum* yang sudah murni



Gambar 3a. Penanaman bakteri



Gambar 3b. Pemanenan bakteri

dengan waktu 4 menit dan interval 1 menit kemudian dilanjutkan dengan penambahan *neutral buffer formalin* 3% divortex selama 4 jam lalu disimpan dalam *refrigerator* suhu 4°C. Diasumsikan bahwa kepadatan bakteri tersebut adalah  $10^{10}$  CFU/mL yang didasarkan dari hasil penghitungan jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada media *shauten* agar (*Total Plate Count*).

### Uji sterilitas dan keamanan

Dilakukan dengan cara menumbuhkan kembali bakteri yang telah dilemahkan dengan penambahan *neutral buffer formalin* 3% pada media *shouten* sebanyak 0,1 mL disebar menggunakan L galass dan bakteri *M. fortuitum* isolat 31 sebagai kontrol positif, kemudian di inkubasi selama 72 jam pada suhu 28°C.

Uji keamanan dilakukan dengan cara menyuntikan sediaan vaksin *M. fortuitum* sebanyak 0,1 mL pada ikan gurame secara intraperitoneal (Gambar 4a) . Sediaan vaksin *M. fortuitum* menunjukkan tidak terjadi kematian setelah 24 jam pasca vaksinasi (Gambar 4b). Perubahan secara fisiologis dan anatomis juga tidak ditemukan. Re-isolasi terhadap gurame uji dari masing-masing kelompok perlakuan tidak diperoleh adanya pertumbuhan bakteri pada media kultur.

### HASIL DAN BAHASAN

Vaksin *M. fortuitum* merupakan vaksin inaktif yang menggunakan bakteri *M. fortuitum* isolat 31 (Gambar 5), yang diinaktifasi dengan *Neutral buffer saline* 3% dan sonikasi, sehingga menghasilkan sediaan vaksin dengan komposisi sebagai berikut :

1. Bakteri *M. fortuitum* dengan kepadatan  $10^{10}$  Cfu/mL.
2. *Phosphate buffer saline*.

Preparasi vaksin menggunakan metode standar yang telah terkuantifikasi, Isolat kandidat yang digunakan adalah isolat 31 yang telah terkarakterisasi dan definitif sebagai *M. fortuitum* dengan hasil sekuensing memiliki kemiripan 99% dengan Gene Bank. Pemanenan dilakukan dengan sistem kering yaitu menginokulasikan bakteri *M. fortuitum* ke media *shouten* agar dan *Phosphate buffer saline* sebagai pelarutnya.

Bakteri *M. fortuitum* merupakan patogen yang dapat menyerang ikan air tawar maupun laut. Tingkat infeksi dapat bervariasi dari 10% hingga 100% (Irianto, 2005).

Uji sterilitas vaksin dilakukan menggunakan media kultur *shouten*, BHIA, TSA menunjukkan hasil tidak adanya pertumbuhan bakteri *M. fortuitum* maupun bakteri kontaminan lainnya setelah ditanam



Gambar 4a. Penyuntikan 0,1 mL vaksin



Gambar 4b. Pengamatan pasca vaksinasi



Gambar 5. Vaksin *M. fortuitum*

kembali pada media kultur tersebut yang diinkubasi pada suhu 28°C selama 24-72 jam, hal tersebut menunjukkan bahwa proses inaktivasi dengan sonikasi dan formalin *kill* efektif. (Tabel 1 )

Uji keamanan mengacu pada metode Anderson *et al.* (1970) dengan cara vaksin menyuntikkan vaksin pada ikan gurame secara intra peritoneal (IP) menunjukkan tidak terjadi kematian pasca vaksinasi selama 3 hari pengamatan (Tabel 2). Perubahan secara fisiologis dan anatomis juga tidak ditemukan, hal ini menunjukkan bahwa vaksin *M. fortuitum* aman dan tidak menimbulkan efek samping.

Menurut Jawetz *et al.* (1996) Penggunaan *Neutral buffer formalin* sebagai bahan inaktivasi bakteri memberikan tingkat keamanan yang sangat baik hal ini terbukti tidak ditemukannya peradangan pada daerah suntikan. Bakteri *M. fortuitum* tergolong pada jenis bakteri tahan asam setelah melalui proses pewarnaan dan memiliki dinding sel yang tebal, sehingga dalam preparasi pembuatan vaksin dilakukan sonikasi untuk memecah dinding sel yang tebal.

Penentuan kepadatan vaksin dilakukan dengan teknik *Total Plate Count* (TPC). Berdasarkan hasil TPC tersebut, diperoleh kepadatan sebesar  $1,7 \times 10^{10}$  cFU/mL. Bakteri dilarutkan dalam PBS volume 100, ditanam 0,1 mL di *streak* pada media *shauten* agar secara duplo dan diinkubasi selama 72 jam pada suhu 28°C, Kemudian dihitung jumlah koloni yang tumbuh pada media tersebut. (Tabel 3, Gambar 6)

*Mycobacteriosis* merupakan penyakit yang bersifat kronis progresif yang rentan menyerang ikan gurame, dengan gejala klinis antara lain ikan lemah, pembengkakan pada kulit, mata menonjol (*exophthalmia*) lesi, dan borok pada badan. Sehingga vaksin *M. fortuitum* diharapkan mampu sebagai salah satu solusi guna pencegahan penyakit *Mycobacteriosis* pada ikan gurame. (Purwaningsih *et al.*, 2009). Berbagai upaya untuk mencegah dan mengendalikan penyakit tersebut dengan menggunakan antibiotik, bahan kimia maupun terapi herbal telah dilakukan namun belum memberikan hasil yang optimal. Vaksin *M. fortuitum* yang dihasilkan diharapkan dapat digunakan untuk pencegahan penyakit *Mycobacteriosis*.

Tabel 1. Uji sterilitas vaksin *M. fortuitum* pada beberapa media tumbuh

| Media tumbuh | Kill dan sonikasi |        |        | Non Kill |        |        |
|--------------|-------------------|--------|--------|----------|--------|--------|
|              | 24 jam            | 48 jam | 72 jam | 24 jam   | 48 jam | 72 jam |
| TSA          | -                 | -      | -      | +        | +      | +      |
| BHIA         | -                 | -      | -      | +        | +      | +      |
| Shouten      | -                 | -      | -      | +        | +      | +      |

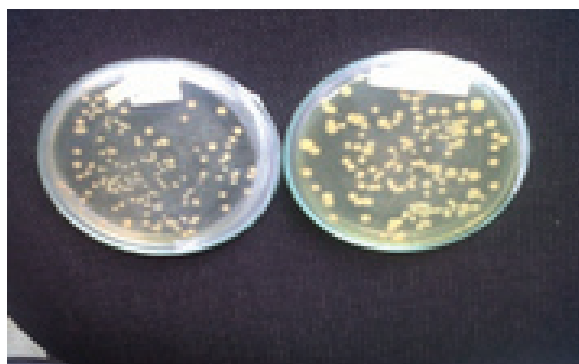
Tabel 2. Uji Keamanan vaksin

| Perlakuan | Dosis | Volume injeksi (mL) | Pengamatan hari ke- |   |   |   |   |   |   |
|-----------|-------|---------------------|---------------------|---|---|---|---|---|---|
|           |       |                     | 1                   | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Vaksin    | 1.010 | 0,1                 | -                   | - | - | - | - | - | - |
| PBS       |       | 0,1                 | -                   | - | - | - | - | - | - |

Keterangan : ( - ) : tidak ada kematian

Tabel 3. Kepadatan bakteri pada media *shauten* agar

| Jumlah petri | Volume PBS (mL) | Jumlah koloni | Hasil                       | Keterangan                                    |
|--------------|-----------------|---------------|-----------------------------|-----------------------------------------------|
| 3            | 100             | 178           | $1,7 \times 10^{10}$ cfu/mL | Ditanam 0,1 mL;<br>pada pengenceran $10^{-7}$ |



Gambar 6. Jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada media *shauten*

## KESIMPULAN

Sediaan vaksin *M. fortuitum* yang disonikasi dan inaktifasi dengan *neutral buffer formalin* 3% aman digunakan berdasarkan hasil uji keamanan dan sterilitas. Sehingga diharapkan mampu menjadi salah satu solusi untuk mengatasi penyakit *Mycobacteriosis* pada ikan gurame.

## UCAPAN TERIMA KASIH

- Riset ini dibiayai oleh DIPA 2014 Balai Litbang Budidaya Air Tawar, Bogor.
- Penulis mengucapkan terima kasih kepada teman-teman Setiadi, Johan Afandi, Ahmad Wahyudi atas bantuannya selama pelaksanaan kegiatan ini.

## DAFTAR ACUAN

- Anderson, D.P., Capstiek, P.B., & Mowat, G.N. (1970). Invitro method for safety of FMD. *J. Hyg Gama*, 68, 159-172.
- Aly, T.M. (1981). Studes on the effect of different Adjuvant on the Efficiency of FMD vaccine inferm animal. Ph.D. Faculty of Vetmed Zagazig University, Egypt.
- Irianto, A. (2005). Patologi ikan teleostei. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Jawetz, E., Melnick, L.J., & Adelberg, A.E. (1996). Mikrobiologi kedokteran. Edisi 20 Alih bahasa Nugroho, E., & Maulany, R.F. Jakarta, hlm. 236-237.
- Supriyadi, H., Taufik, P., & Taukhid. (2003). Karakterisasi patogen, inang spesifik, dan sebaran *Mycobacteriosis*. *J. Pen. Perik. Indonesia*, 9(2), 39-40.
- Sigantang, M., & Sarwono, B. (2005). Budidaya gurame. Penebar Swadaya. Jakarta, 72 hlm.
- Susanto, H. (1999). Budidaya ikan gurame. Kanisius. Yogyakarta, 115 hlm.
- Purwaningsih, Taukhid, & Lusiastuti. (2013). Vaksin *Mycobacterium fortuitum* isolat lokal untuk pencegahan penyakit *Mycobacteriosis* pada ikan gurame, *Osphronemus gourami*.
- Purwaningsih, U., Lusiastuti, A.M., & Taukhid. (2009). Studi patologi, anatomi penyakit *Mycobacteriosis* pada ikan gurami (*Ospronemus gouramy*). *Prosiding Forum inovasi Teknologi Akuakultur*.