

**PENAMBAHAN VITAMIN C
PADA PAKAN LELE DUMBO (*Clarias gariepinus*)
UNTUK MENINGKATKAN TANGGAP KEBAL
TERHADAP VAKSIN *Aeromonas hydrophila***

**VITAMIN C SUPPLEMENTATION
ON AFRICAN CATFISH (*Clarias gariepinus*)
TO ENHANCE ITS IMMUNE RESPONSE
ON *Aeromonas hydrophila* VACCINE**

Alim Isnansetyo*

Abstract

Motile *Aeromonas* Septicemia is a dangerous disease on fresh water fishes especially walking catfish and carp. Vaccination against the disease has been developed in Indonesia. However, there were high result variations of the vaccination. Immune response is influenced by level of vitamin C dietary. Objective of this experiment was to know effect of vitamin C levels on walking catfish's spesific immune response.

The levels of vitamin C (0, 50, 500 and 1000 mg ascorbic acid (AA)/kg feed) were given to the fish. Immersion vaccination for 30 minutes (108 sel/ml) was carried out 15 days after feeding trial. Challenge test was conducted by injection of 0,2 ml bacteria suspension (LD80 concentration) was carried out 15 days after vaccination. Growth rate of the fish was observed monthly.

Results of this experiment indicated that mortality in the challenge test due to *A. hydrophila* infection considerably decreased for treatment combination among vaccination; and 500 and 1000 mg AA/kg feed. These AA levels without vaccination could not reduce mortality.

Pengantar

Efektifitas vaksinasi dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain kondisi ikan, kualitas nutrisi pakan, polutan, antibiotik, dan kualitas air. Adanya antibiotik dan polutan akan menurunkan respon kekebalan. Nutrisi pakan terutama vitamin C dan K yang cukup akan meningkatkan tanggap kebal. Sedangkan kualitas air sangat

mempengaruhi fisiologi ikan dalam hubungannya dengan pembentukan antibodi (Ellis, 1988b).

Vitamin C atau asam askorbat merupakan agen pereduksi. Reaksi yang berhubungan dengan fungsi vitamin C adalah hidrosilasi dan reduksi. Dalam reaksi hidrosilasi lisin dan prolin; vitamin C berperan sebagai co-faktor. Lisin dan prolin tersebut merupakan

*) Staf Pengajar Jurusan Perikanan, Fakultas Pertanian UGM

komponen jaringan konektif yang merupakan dasar struktural anatomi hewan multisel. Pertumbuhan rendah, anoreksia, lordosis, scoliosis, hemoragik, terhalangnya penyembuhan luka merupakan gejala kekurangan vitamin C akibat terhalangnya aktivitas prolihdroksilase (O'Keefe dan Grout, 1991).

Pemberian vitamin C yang cukup dicampur pakan channel catfish dapat meningkatkan ketahanan terhadap penyakit bakterial (Lovell, 1982; Li dan Lovell, 1985 dalam O'Keefe dan Grout, 1991). Tanggapan kebal gelondongan channel catfish terhadap antigen *Edwardsiella tarda* dan *E. ictaluri* lebih rendah apabila pakan yang diberikan kekurangan vitamin C dibandingkan channel catfish yang diberi pakan dengan dosis vitamin C yang cukup (300 mg vit. C/kg pakan). Kekurangan vitamin C juga menurunkan aktivitas fagositosis terhadap *E. ictaluri* oleh sel-sel fagositik darah. Vitamin C dosis tinggi (3000 mg/kg pakan) meningkatkan tanggapan kebal tetapi tidak meningkatkan aktivitas fagositose sel-sel fagositik darah dibandingkan dengan dosis normal (Ellis, 1988b).

Vitamin C juga dapat meningkatkan ketahanan rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) terhadap virus infectious hematopoietic (IHNV). Selain meningkatkan antibodi, vitamin C yang memadai juga meningkatkan aktivitas Cell Mediated Immunity (CMI) atau faktor-faktor non spesifik lainnya (Setyabudi dkk., 1992).

Kebutuhan vitamin C pada ikan secara umum dipengaruhi oleh ukuran, kondisi fisiologis, faktor-faktor lingkungan dan interelasi nutrisi pada pakan (NCR, 1983 dalam O'Keefe dan Grout, 1991). Konsentrasi vitamin C yang dibutuhkan untuk meningkatkan potensi adaptif

dan ketahanan terhadap penyakit lebih besar dibandingkan dengan kebutuhan untuk pertumbuhan dan konversi pakan yang optimal (O'Keefe dan Grout, 1991). Dengan demikian konsentrasi vitamin C yang normal pada pakan merupakan faktor pembatas untuk mengoptimalkan tanggapan kebal dan mekanisme pertahanan non-spesifik lainnya (Ellis, 1988b).

Bahan dan Metode

1. Pembuatan Vaksin

Vaksin yang digunakan dalam penelitian ini adalah vaksin sel utuh (whole cell) *A. hydrophila*. Bakteri tersebut diisolasi dari ikan lele yang terserang Motil *Aeromonas Septisemia*, pada kolam pembesaran di daerah Burikan, Sleman, Yogyakarta.

Pembuatan vaksin dilakukan dengan menggunakan modifikasi metode yang dikemukakan oleh Salati (1988) dengan inaktivasi menggunakan formalin. Sebelum vaksin digunakan dilakukan uji viabilitas dengan cara menumbuhkan pada TSA selama 48 jam. Apabila masih terjadi pertumbuhan, inaktivasi diulang kembali. Sebelum digunakan vaksin tersebut disimpan dalam almari pendingin.

2. Pembuatan pakan

Pakan dibuat dengan komposisi sebagai berikut : tepung ikan (55 %), bekatul (30 %), tapioka (9 %), minyak ikan (5 %), mineral premix (1 %) dan vitamin C (dengan komposisi 80% bahan aktif-asam askorbat, calcium fosfat, calcium silikat, minyak nabati, antioksidan Butylated hydroxyanisole dan Butylated hydroxytoluene) sesuai dengan perlakuan. Pakan dicampur homogen kemudian dicetak dalam bentuk pelet dan dikeringkan tanpa penyinaran.

3. Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan bertujuan untuk mengetahui LD_{80} (Lethal Dose 80) *A. hydrophila* terhadap benih ikan lele. LD_{80} yang didapat digunakan untuk infeksi saat ujiantang pada penelitian utama.

Benih yang digunakan berukuran ± 10 cm (panjang total) yang dipelihara pada ember plastik dengan volume air 15 l, tanpa aerasi. Masing-masing ember diisi 15 ekor benih. Infeksi dilakukan dengan menyuntikkan 0,2 ml suspensi *A. hydrophila* dengan kepadatan 0 (hanya PBS sebagai kontrol), 10^7 , 10^8 , dan 10^{10} , dan 10^{11} sel/ml, masing-masing dengan tiga ulangan. Kepadatan bakteri diestimasi menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm.

Pengamatan dilakukan terhadap kematian ikan, rata-rata waktu kematian dan gejala penyakit yang timbul selama 15 hari.

4. Penelitian Utama

a. Rancangan percobaan

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan rancangan acak lengkap faktorial. Faktor yang digunakan adalah vaksinasi dan dosis vitamin C. Adapun kombinasi perlakuannya adalah sebagai berikut :

V0C0 : tanpa vaksinasi, tanpa penambahan vit. C pada pakan.

V0C1 : tanpa vaksinasi, penambahan 50 mg AA/kg pakan.

V0C2 : tanpa vaksinasi, penambahan 500 mg AA/kg pakan.

V0C3 : tanpa vaksinasi, penambahan 1000 mg AA/kg pakan.

V1C0 : vaksinasi, tanpa penambahan vit. C pada pakan.

V1C1 : vaksinasi, penambahan 50 mg AA/kg pakan. V1C2 : vaksinasi, pe-

nambahan 500 mg AA/kg pakan.

V1C3 : vaksinasi, penambahan 1000 mg AA/kg pakan. Masing-masing perlakuan dengan dua ulangan.

b. Pemberian pakan

Pada tahap ini, lele yang digunakan berukuran 7,6 cm (panjang total) yang dipelihara di bak traso dengan ukuran 60 x 60 x 40 cm³, dengan kepadatan 75 ekor/bak. Pakan diberikan dua kali sehari sesuai dengan perlakuannya, dengan dosis pakan 3-5 % berat tubuh ikan/hari.

c. Vaksinasi

Vaksinasi dilakukan terhadap benih lele yang telah diaklimatisasi dan diberi pakan selama 15 hari. Vaksinasi dilakukan secara rendaman selama 30 menit (10^8 sel/ml) tanpa penambahan adjuvant. Setelah divaksin, ikan dikembalikan pada bak semula.

d. Ujiantang (Challenge Test)

Ujiantang dilakukan 15 hari setelah vaksinasi terhadap masing-masing kombinasi perlakuan dengan tiga ulangan. Metode pemeliharaan ikan uji dan infeksi seperti pada penelitian pendahuluan dengan kepadatan *A. hydrophila* sesuai hasil pada penelitian pendahuluan. Pengamatan dilakukan terhadap mortalitas ikan uji, rata-rata waktu kematian dan perkembangan gejala penyakit.

e. Titer Antibodi

Pengamatan titer antibodi dilakukan dengan metode mikrotiter. Pengamatan dilakukan pada awal penelitian dan 15 hari setelah vaksinasi.

Hasil dan Pembahasan

1. Hasil Penelitian

a. Penelitian pendahuluan

Penelitian pendahuluan bertujuan untuk mengetahui LD_{50} *A. hydrophila* terhadap benih lele. Mortalitas benih lele dumbo yang diinfeksi dengan *A. hydrophila* dengan metode suntik dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1
Mortalitas benih lele dumbo yang diinfeksi dengan *A. hydrophila*.

Perlakuan	1	2	3	Rerata
Kontrol	0	13,33	0	4,44
10 ⁷ sel/ml	13,33	0	0	4,44
10 ⁸ sel/ml	0	0	8,67	2,22
10 ¹⁰ sel/ml	93,33	100,00	43,33	95,56
10 ¹¹ sel/ml	100,00	100,00	100,00	100,00

Keterangan:

- Kontrol hanya disuntik dengan PBS.
- Infeksi suntikan 0,2 ml/ekor untuk masing-masing konsen trasi.

Dari hasil perhitungan LD_{50} menggunakan metode Dregsted Behrens ternyata kepadatan bakteri yang diperlukan agar dapat mematikan 80 persen dari seluruh populasi cukup tinggi yaitu $4,44 \times 10^9$ sel/ml. Volume suntik untuk tiap ekor ikan adalah 0,2 ml, sehingga jumlah total bakteri yang disuntikkan pada tiap ekor ikan adalah $8,88 \times 10^8$ sel.

Rata-rata waktu kematian pada penelitian pendahuluan dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2

Rerata waktu kematian (hari) benih lele dumbo yang diinfeksi dengan *A. hydrophila* pada penelitian pendahuluan (volume penyuntikan 0,2 ml)

Perlakuan	Ulangan			Re-Rata
	1	2	3	
10 ⁷ sel/ml	15,00	tak hingga	tak hir	-
10 ⁸ sel/ml	tak hingga	tak hingga	3,00	-
10 ¹⁰ sel/ml	1,00	1,07	1,00	1,02
10 ¹¹ sel/ml	1,00	1,00	1,00	1,00

Dari tabel 2 terlihat waktu kematian yang sangat singkat terutama untuk kepadatan bakteri 10¹⁰ dan 10¹¹ sel/ml. Hal ini menunjukkan bahwa *A. hydrophila* dapat menimbulkan kerugian dalam waktu yang amat cepat.

b. Penelitian utama (Uji tantang/- Challenge test)

Uji tantang dilakukan setelah 1 bulan pemeliharaan atau 15 hari setelah vaksinasi. Uji ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap mortalitas, rerata waktu kematian dan gejala penyakit pada benih lele yang diinfeksi *A. hydrophila* pada dosis LD_{50} . Mortalitas benih lele dumbo pada uji tantang ini disajikan pada tabel 3.

Tabel 3

Mortalitas (%) benih lele dumbo pada uji tantang.

Perlakuan	Ulangan			Rerata
	1	2	3	
VOC0	86,67	93,33	73,33	84,43d
VOC1	73,33	66,67	100,00	80,00cd
VOC2	66,66	66,66	60,00	64,44bc
VOC3	80,00	53,33	86,66	73,33cd
VIC0	86,66	86,66	86,66	86,66d
VIC1	53,33	60,00	86,66	66,63bc
VIC2	40,00	40,00	46,66	42,22a
VIC3	53,33	40,00	66,66	53,32ab

Ket : Rerata yang diikuti dengan huruf yang sama tidak menunjukkan beda nyata.

Dari tabel 3 dapat dilihat bahwa mortalitas cenderung turun dengan penambahan vitamin C pada pakan dan vaksinasi (lihat Lampiran II). Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap mortalitas dilakukan uji sidik ragam. Sebelum dilakukan uji sidik ragam, data pada Tabel 4 ditransformasi Arc. Sin X1/2 terlebih dahulu. Rerata waktu kematian pada uji tantang dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4
Rerata waktu kematian (hari) benih lele dumbo pada uji tantang.

Perla- kuan	Ulangan			Re- rata
	1	2	3	
VOC	1,08	1,21	1,00	1.10
VOC	1,00	1,00	1,53	1.18
VOC	1,00	1,00	1,00	1,00
VOC	1,08	1,00	1,08	1.05
V1C	1,46	1,23	1,08	1.26
V1C	1,00	1,00	1,08	1.03
V1C	1,09	1,08	1,31	1.16
V1C	1,50	1,83	1,00	1.44

Dari tabel 4, tidak terlihat peningkatan rerata waktu kematian pada pemberian vitamin C dan vaksinasi baik secara terpisah maupun kombinasinya.

2. Pembahasan

LD₅₀ pada penelitian pendahuluan cukup tinggi disebabkan benih lele yang digunakan sebagai hewan uji berukuran cukup besar yaitu dengan panjang total ± 10 cm. Disamping itu kualitas air yang digunakan dalam pemeliharaan baik dan stabil. Sebagai perbandingan Lio-Po dkk. (1992) menyuntikkan *A. hydrophila* dengan jumlah bakteri 10⁹ hingga 10¹¹ terhadap ikan lele (*C. batrachus*) yang berukuran 15-25 gr dengan mortalitas 0 persen pada lima kelompok dan 100 persen pada empat

kelompok yang lain, dalam waktu 96 jam. Dari perbandingan tersebut diketahui, keganasan *A. hydrophila* yang digunakan pada penelitian ini cukup tinggi. LD₅₀ yang didapat pada penelitian pendahuluan ini digunakan untuk infeksi pada uji tantang.

Tabel 2 menunjukkan bahwa semakin tinggi kepadatan *A. hydrophila* yang disuntikkan akan semakin cepat menimbulkan kematian benih lele dumbo yang diinfeksi. Pada infeksi yang akut tersebut, ternyata *A. hydrophila* mampu menimbulkan kematian hanya dalam waktu 24 jam.

Uji sidik ragam terhadap mortalitas lele dumbo memperlihatkan bahwa perlakuan, antar faktor pertama (vaksinasi) dan antar faktor kedua (penambahan vitamin C) berpengaruh nyata (P<0,05) terhadap mortalitas. Hal tersebut menunjukkan bahwa vaksinasi dan pemberian vitamin C yang memadai mampu menurunkan mortalitas benih lele dari serangan *A. hydrophila*. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) menunjukkan, penambahan vitamin C saja hingga dosis 1000 mg AA/kg pakan belum dapat menurunkan mortalitas benih lele terhadap serangan *A. hydrophila*. Hal ini berarti pemberian vitamin C hingga 1000 mg AA/kg pakan saja belum mampu meningkatkan daya tahan benih lele terhadap serangan *A. hydrophila* yang akut. Demikian juga halnya dengan vaksinasi, baru dapat menurunkan mortalitas atau meningkatkan daya tahan benih lele terhadap serangan *A. hydrophila* yang akut apabila pakan yang diberikan paling sedikit mengandung vitamin C 500 mg AA/kg pakan.

Pengamatan titer antibodi (Lampiran F) menunjukkan bahwa vaksinasi dapat meningkatkan produksi antibodi hingga dua kali lebih besar dibandingkan

kontrol. Sedangkan dengan penambahan vitamin C yang memadai, vaksinasi dapat meningkatkan produksi antibodi hingga empat kali lebih besar dibandingkan kontrol. Vitamin C selain dapat meningkatkan produksi antibodi, juga dapat meningkatkan aktivitas Cell Mediated Immunity (CMI) (Setyabudi dkk., 1992). CMI bertanggung jawab terhadap produksi limfosit (Ellis, 1978) dan juga sel memori. Limfosit tersebut mempunyai reseptor yang variasinya terbatas sehingga kemampuannya pun juga terbatas. Akan tetapi jika limfosit tersebut kontak dengan antigen, akan mengadakan perubahan secara mitosis dengan memproduksi sel anak dalam jumlah banyak yang spesifik terhadap antigen tersebut. Dengan demikian secara tidak langsung vitamin C juga meningkatkan produksi sel anak limfosit untuk melawan *A. hydrophila* yang diinfeksi. Hardie (1991) mendapatkan bahwa vitamin C hanya meningkatkan aktivitas komplemen, tetapi produksi tanggapan kebal humoral tidak terpengaruh.

Keberhasilan vaksinasi juga dipengaruhi oleh kondisi stres ikan yang divaksin. Apabila ikan yang divaksin dalam kondisi stres, akan menurunkan tanggapan kebal. Hal ini terlihat pada perlakuan CO (0 mg AA/kg pakan) dan C1 (50 mg AA/kg pakan), benih lele terlihat sangat peka terhadap kondisi stres yang ditandai dengan perubahan warna tubuh dari hitam ke warna bercak keputihan. Peran vitamin C dalam tanggapan stres dikemukakan oleh Masumo to dkk. (1991)

Tingkat Perlindungan Relatif pada uji tantangan ini berkisar antara -8,33 hingga 49,99 (lihat Lampiran II). Seperti halnya pada mortalitas, tingkat perlindungan relatif meningkat cukup tinggi pada kombinasi perlakuan pemberian vitamin

C dengan dosis 500 dan 1000 mg AA/kg pakan dan vaksinasi.

Kesimpulan dan Saran

1. Kesimpulan.

- Pemberian vitamin C dengan dosis 500 dan 1000 mg AA/kg pakan dapat meningkatkan tanggapan kebal dan tingkat perlindungan relatif serta menurunkan mortalitas pada vaksinasi lele dumbo dengan vaksin *A. hydrophila*.
- Pada serangan yang akut kombinasi antara pemberian vitamin C dosis tinggi dan vaksinasi diperlukan untuk meningkatkan kelulushidupan lele dumbo.
- Tanggapan kebal pada vaksinasi lele dumbo dengan vaksin *A. hydrophila* terjadi apabila dosis vitamin C pada pakan memadai.

2. Saran

- Percobaan sejenis perlu dilakukan dengan menggunakan rentang dosis vitamin C yang lebih sempit untuk mengetahui dosis vitamin C yang optimal.
- Perlu penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh vitamin C terhadap tanggapan kebal spesifik dan non-spesifik pada lele dumbo.

Ucapan terima kasih

Ucapan terima kasih disampaikan terutama kepada Lembaga Penelitian Universitas Gadjah Mada. Ucapan terima kasih juga kami sampaikan kepada saudara Darodji Amrodji, Suwandi dan Baharudin, A.Md. sebagai teknisi yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian.

Daftar Pustaka

Ellis, A.E., 1978. The Immunology of teleosts. Fish pathology. Robert, R.J. (Ed.). Bailliere Tindall. London. 92-104.

Ellis, A.E., 1998b. Optimizing factor for fish vaccination. Fish vaccination. Ellis, A.E (Ed). Academic Press. London. 32-46.

Hardie, A.E.; Fletcher, T.C. and Secombes, C.J., 1991. The effect of dietary vitamin C on the immune response of the atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture 95:201-214.

Hubert, J.J., 1980. Bioassay. Kendall Hunt Publishing. Dubugue.

Lio-Po, G.D., Albright, L.J., and Alapide Tendencia, E.V., 1992. *Aeromonas hydrophila* in the ulcerative syndrome (EUS) of snakehead, *Ophiocephalus striatus*, and catfish, *Clarias batrachus*: Quantitative estimation in natural infection and experimental induction of dermomuscular necrotic lesion. Diseases in Asian Aquaculture. Shariff, M, Subasinghe, R.P. and Arthur, J.R. (Ed.). AFS. 461-474.

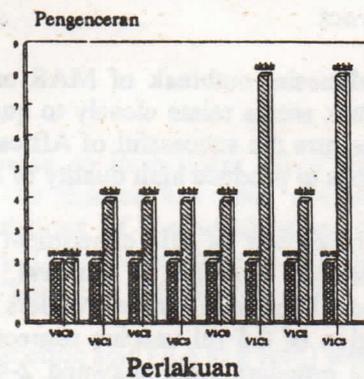
Masumoto, T.; Hosokawa, H. and Shimeno, S., 1991. Ascorbic acid's role in aquaculture nutrition. Proc. of the aquaculture feed processing and nutrition workshop. ASA. Singapore. 42- 48.

O'Keefe, T., Grout, B.F., 1991. Stabell form of vitamin C, essensiality, stability and and bioavailability. ASA Technical Bulletin (29); 12 pp.

Salati, F., 1988. Vaccination againts *Edwardsiella tarda*. Fish vaccination. Ellis A.E (Ed). Academic Press. London. 135-151.

Setyabudi, A.M.A., Grant, B.F. and Halver Halver, J.E., 1990. Pengaruh L-Ascorbyl-2-Phosphate (ASPP) pada pertumbuhan dan resistensi ikan rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) terhadap Infection Hematoporetic Necrosis Virus (IHNV). Prosiding Seminar II Penyakit Ikan dan Udang. Balitbang Pertanian : 71 - 82.

Lampiran 1 Titer Antibodi



Akhir penelitian: 1 bulan pemeliharaan/ 2 minggu setelah vaksinasi.

Lampiran 2 Tingkat Perlindungan Relatif (RPS)

