

Efikasi vaksin sel utuh *Streptococcus agalactiae* pada ikan nila *Oreochromis sp.* melalui perendaman

Whole-cell vaccine of *Streptococcus agalactiae* in *Oreochromis sp.* with immersion method

Sukenda*, Trian Rizky Febriansyah, Sri Nuryati

Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor
Kampus IPB Dramaga Bogor, Jawa Barat 16680

*Surel: kenfajri@yahoo.com

ABSTRACT

The study was aimed to evaluate the efficacy of formalin-killed non-hemolytic *Streptococcus agalactiae* N14G and NK1 isolates whole-killed vaccine to prevent streptococcosis in tilapia. Ten fishes were reared in a tank 60x30x35 cm³ with an average body weight at 10.79±0.99 g. Fish was vaccinated through bath immersion at a concentration of 10⁹ cfu/mL. Fish was subsequently challenged by intraperitoneal injection of *Streptococcus agalactiae* 10⁵ cfu/mL at 11 days post-vaccination. Parameters observed were survival, relative percent survival (RPS), total leukocyte, phagocytic activity, antibody titer, total erythrocyte, haemoglobin level, haematocrit level, dan water quality. Samplings were performed in day-0, 20, and 30 after vaccination. Both vaccines have shown higher survival (60%) and RPS (40%) when challenged with pathogenic *Streptococcus* N14G isolates than other treatments. Based on RPS percentage observed, those vaccine were still not sufficiently effective to combat *S. agalactiae* infection.

Keywords: tilapia, bath immersion, *Streptococcus agalactiae*, whole-cell vaccine

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efikasi vaksin *formalin-killed cell Streptococcus agalactiae* tipe isolat nonhemolitik N14G dan NK1 se utuh yang diberikan melalui perendaman dalam mencegah penyakit streptococcosis pada ikan nila. Ikan nila yang digunakan memiliki bobot 10,79±0,99 g, dipelihara sebanyak sepuluh ekor dalam akuarium ukuran 60x30x35 cm³. Ikan divaksinasi dengan metode perendaman dengan dosis 10⁹ cfu/mL. Uji tantang dilakukan pada hari ke-11 pascavaksinasi dengan dosis 10⁵ cfu/mL. Parameter yang diamati meliputi sintasan (SR), sintasan relatif/*relative percent survival* (RPS), total leukosit, aktivitas fagositik, titer antibodi, total eritrosit, kadar hemoglobin, kadar hematokrit, dan kualitas air. Pengamatan parameter dilakukan pada hari ke-0, ke-10, ke-20, dan ke-30. Hasil penelitian menunjukkan perlakuan kedua vaksin yang diinfeksi bakteri patogen isolat N14G memberikan nilai sintasan dan nilai RPS tertinggi dibanding perlakuan lainnya. Nilai sintasan dan RPS kedua perlakuan tersebut adalah 60% dan 40%. Nilai RPS yang cukup kecil menunjukkan vaksin yang diberikan masih kurang efektif untuk mencegah infeksi bakteri *S. agalactiae*.

Kata kunci: ikan nila, perendaman, *Streptococcus agalactiae*, vaksin sel utuh

PENDAHULUAN

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) merupakan salah satu komoditas air tawar yang banyak dibudidayakan di Indonesia. Ikan nila termasuk produk unggulan dalam sektor perikanan budidaya karena memiliki nilai ekonomis yang tinggi dan pertumbuhan cepat. Pemerintah berencana untuk meningkatkan produksi ikan nila pada tahun 2014. Upaya yang dapat dilakukan untuk mewujudkan target produksi tersebut adalah menerapkan

sistem budidaya intensif. Akan tetapi, sistem tersebut dapat meningkatkan peluang terjadinya penyakit parasitik, bakterial, ataupun viral.

Salah satu penyakit bakterial yang terjadi adalah penyakit streptococcosis pada ikan nila yang disebabkan oleh bakteri *Streptococcus agalactiae*. Bakteri ini terbagi menjadi dua tipe, yaitu tipe β-hemolitik dan nonhemolitik. Bakteri tipe nonhemolitik memiliki tingkat virulensi yang lebih tinggi dibandingkan tipe β-hemolitik (Hardi *et al.*, 2011).

Penyakit streptococcosis dilaporkan telah terjadi di beberapa negara seperti Amerika Serikat, Israel, Jepang, dan Thailand (Evans *et al.*, 2006). Penyakit ini menyebabkan kematian 40-60% selama dua minggu pada budidaya ikan nila di Thailand (Yuasa *et al.*, 2008). Beberapa tahun terakhir, penyakit streptococcosis dilaporkan terjadi di sejumlah wilayah Indonesia, yaitu wilayah Sumatera, Jawa Barat, Jawa Tengah, Sulawesi, dan Nusa Tenggara (Hardi *et al.*, 2011).

Pada mulanya, antibiotik digunakan untuk mengatasi penyakit streptococcosis. Namun penggunaan antibiotik memiliki efek samping karena dapat meningkatkan resistensi bakteri terhadap antibiotik. Beberapa antibiotik juga sudah dilarang penggunaannya di berbagai negara karena dapat mencemari lingkungan, sehingga diperlukan tindakan alternatif untuk menanggulangi penyakit ini. Salah satu alternatif untuk mencegah penyakit streptococcosis adalah dengan penggunaan vaksin. Hardi *et al.* (2011) memberikan injeksi sel utuh vaksin *formalin-killed cell S. agalactiae* tipe nonhemolitik yang diuji tantang dengan bakteri *S. agalactiae* pada ikan nila ukuran 15 g menghasilkan sintasan 91,11%. Pada penelitian ini, akan dikaji efikasi vaksin sel utuh *formalin-killed cell S. agalactiae* tipe nonhemolitik dari isolat bakteri yang sama pada penelitian Hardi *et al.* (2011) dalam mencegah penyakit streptococcosis pada ikan nila. Metode vaksinasi yang digunakan adalah perendaman karena mudah dilakukan pada produksi ikan skala besar, biaya relatif murah, dan tingkat stres ikan yang rendah (Evensen, 2009).

BAHAN DAN METODE

Karakterisasi bakteri *Streptococcus agalactiae*

Bakteri yang digunakan adalah bakteri *S. agalactiae* dengan kode isolat N14G dan NK1 yang berasal dari Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar. Bakteri ditumbuhkan pada media agar *brain heart infusion* (BHI) lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Koloni bakteri yang tumbuh kemudian diverifikasi antara lain melalui uji pewarnaan Gram, uji motilitas, uji oksidatif-fermentatif, uji katalase, uji oksidase, uji produksi asam dari D-manitol, dan uji aktivitas hemolitik sesuai metode yang dilakukan Hardi *et al.* (2011).

Postulat Koch

Bakteri stok dikultur pada media cair BHI 20 mL pada *waterbath shaker* selama sembilan jam dengan kepadatan 10^5 cfu/mL. Kemudian bakteri

disuntikkan pada lima ekor ikan (tiap perlakuan) sebanyak 0,1 mL/10 g bobot tubuh. Ikan yang menunjukkan gejala streptococcosis kemudian dipisahkan dan diambil organ mata dan otak untuk pengisolasian bakteri dari organ tersebut. Bakteri tersebut kemudian dikarakterisasi kembali untuk memastikan bahwa bakteri tersebut adalah bakteri *S. agalactiae*. Bakteri hasil *postulat Koch* tersebut digunakan untuk preparasi vaksin dan uji tantang.

Preparasi vaksin *whole-cell Streptococcus agalactiae*

Biakan bakteri dari media agar dikultur pada media cair BHI 50 mL selama 24 jam. Kemudian biakan tersebut dikultur kembali pada media cair BHI dengan volume total keduanya 700 mL. Biakan tersebut kemudian dikultur selama 72 jam. Biakan tersebut kemudian ditambahkan *neutral buffer formaline* (BNF) 3% dan diinkubasi selama 24 jam untuk inaktivasi bakteri. Biakan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 7.000 rpm pada suhu 4 °C selama 30 menit sehingga terpisah antara pelet sel dan supernatan (Evans *et al.*, 2004). Pelet sel hasil sentrifugasi dicuci dengan *phosphate buffer saline* (PBS) sebanyak dua kali, terakhir ditambahkan PBS sesuai dengan volume awal. Sampel vaksin kemudian ditumbuhkan pada media agar BHI untuk memastikan sel bakteri yang digunakan sudah tidak aktif.

Rancangan penelitian

Penelitian ini terdiri atas tiga perlakuan dan tiga ulangan, yaitu nonvaksin, vaksin isolat N14G, dan vaksin isolat NK1. Uji tantang dilakukan menggunakan bakteri *S. agalactiae* isolat N14G dan NK1.

Persiapan wadah dan ikan uji

Air pemeliharaan ikan sebanyak 45 L dalam akuarium berukuran 60x30x35 cm³ didesinfeksi menggunakan klorin 30 ppm selama 24 jam. Setelah itu ditambahkan natrium thiosulfat 15 ppm dan diberi aerasi kuat selama 24 jam untuk menghilangkan residu klorin pada air.

Ikan yang digunakan adalah ikan nila yang berasal dari daerah Ciseeng, Bogor dengan bobot rata-rata $10,79 \pm 0,55$ g. Ikan diadaptasikan selama satu minggu dengan kepadatan 10 ekor/akuarium. Ikan diberi pakan komersil merk F999 berupa pelet terapung dengan kandungan protein 40% sebanyak tiga kali sehari dengan *feeding rate* 5%. Penyifonan dan pergantian air sebanyak 50% dilakukan tiap tiga hari untuk menjaga kualitas air.

Uji *in vivo*

Ikan perlakuan direndam selama 20 menit dalam larutan vaksin yang telah diencerkan dengan kepadatan akhir bakteri 10^9 cfu/mL (Evans *et al.*, 2004). Uji tantang dilakukan sepuluh hari setelah vaksinasi dengan menginjeksikan bakteri *S. agalactiae* 0,1 mL/ekor dengan kepadatan bakteri 10^5 cfu/mL. Ikan kemudian dipelihara selama 30 hari dan dilakukan pengamatan tiap 10 hari.

Uji kualitas air dilakukan pada H0 dan pada H30. Parameter yang diukur meliputi suhu, pH, *dissolved oxygen* (DO) atau kandungan oksigen terlarut, dan amonia (TAN). Hasil uji kualitas air disajikan pada Tabel 9.

Secara umum nilai suhu media pemeliharaan selama penelitian berkisar 26,75–27,35 °C. Nilai pH berkisar 6,48–6,59, nilai DO 4,3–5,6 mg/L, sedangkan nilai TAN 0,12–0,35 mg/L. Semua nilai parameter kualitas air yang diukur dalam penelitian ini masih berkisar pada kisaran normal untuk ikan nila.

Penghitungan data

Penghitungan parameter teknis meliputi pengamatan nilai *relative percent survival* (RPS), perhitungan sintasan, dan pengukuran berbagai parameter kualitas air meliputi suhu, pH, DO, serta TAN. Nilai RPS diamati untuk mengetahui efikasi dari vaksin yang digunakan menggunakan rumus berikut:

$$RPS (\%) = [1 - ((\sum \text{ikan divaksin yang mati}) / (\sum \text{ikan nonvaksin yang mati}))] \times 100$$

Penghitungan parameter hematologi

Pengamatan parameter haematologi dilakukan empat kali selama penelitian berlangsung, yaitu sebelum perlakuan (H0), pascaperlakuan vaksin

(H10), pascauji tantang (H20), dan akhir penelitian (H30). Kegiatan ini dilakukan dengan mengambil sampel darah ikan uji kemudian dilihat jumlah eritrosit, jumlah leukosit, kadar hemoglobin, kadar hematokrit, aktivitas fagositik, dan titer antibodi. Pengambilan darah menggunakan syringe steril yang telah dibilas menggunakan natrium sitrat (Na-sitrat) 3,8% sebagai antikoagulan. Darah diambil pada bagian vena caudalis kemudian ditempatkan dalam *microtube* yang juga telah dibilas dengan Na-sitrat 3,8% untuk selanjutnya dilakukan pengamatan.

Penghitungan sel darah putih (SDP) dilakukan sesuai metode yang dilakukan Blaxhall dan Daisley (1973). Sampel darah dihisap menggunakan pipet bulir putih sampai skala 0,5, kemudian larutan Turk dihisap sampai skala 11 dan dihomogenkan. Larutan diteteskan pada lima kotak besar hemasitometer. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop dengan menghitung jumlah sel darah pada lima kotak besar hemasitometer. Rumus yang digunakan yaitu $\Sigma \text{SDP} = \text{rata-rata sel terhitung} \times 1/(\text{volume kotak besar}) \times \text{faktor pengencer}$.

Pengukuran aktivitas fagositik dilakukan berdasarkan metode Anderson dan Siwicki (1993). Pengamatan tersebut dilakukan dengan menghitung persentase sel yang aktif melakukan proses fagositosis, dari 100 sel fagosit yang terlihat pada preparat, yang bersumber dari 50 μL sampel darah yang telah dihomogenkan dengan 50 μL bakteri *Staphylococcus aureus* berkepadatan 10^8 cfu/mL.

Pengukuran titer antibodi dilakukan dengan memasukkan larutan PBS sebanyak 25 μL ke dalam lubang *microplate* dari lubang kedua sampai ke-12. Serum darah sebanyak 25 μL dimasukkan ke dalam lubang ke satu dan kedua.

Tabel 1. Hasil uji kualitas air selama penelitian

Kode perlakuan	Parameter kualitas air			
	Suhu (°C)	pH	Oksigen terlarut (mg/L)	Total ammonia nitrogen (mg/L)
Awal	26,70	7,14	5,30	0,053
1	27,70	6,55	4,85	0,120
2	27,35	6,62	5,60	0,140
3	26,75	6,59	5,55	0,210
4	27,10	6,48	4,45	0,340
5	26,75	6,56	5,05	0,280
6	27,00	6,51	4,25	0,270
Kisaran toleransi	25-30	7-8 (Copatti <i>et al.</i> , 2011)	>3	<1 (Boyd, 1982)

Setelah itu dilakukan pengenceran bertingkat dari lubang kedua sampai lubang ke-11. Bakteri sebanyak 25 µL kemudian dimasukkan dan dihomogenkan. *Microplate* diinkubasi satu malam untuk dilakukan pengamatan keesokan harinya. Nilai titer antibodi ditentukan dari lubang terakhir pada *microplate* yang terdapat reaksi aglutinasi.

Penghitungan sel darah merah (SDM) menggunakan metode Blaxhall dan Daisley (1973). Sampel darah dihisap menggunakan pipet bulir merah sampai skala 0,5 kemudian larutan Hayem dihisap sampai skala 101, lalu dihomogenkan. Larutan diteteskan pada lima kotak besar hemasitometer untuk dihitung jumlah sel darah merahnya. Hasil perhitungan dimasukkan ke dalam rumus: $\Sigma \text{SDM} = \text{rata-rata sel terhitung} \times 1/(\text{volume kotak besar}) \times \text{faktor pengencer}$.

Pengukuran hemoglobin dilakukan dengan mengacu pada metode Blaxhall dan Daisley (1973). Sampel darah dihisap menggunakan pipet Sahli sampai skala 20 mm³ kemudian dimasukkan ke dalam tabung Hb-meter yang telah diisi HCl 0,1 N sampai skala 10 pada skala merah. Sampel darah tersebut kemudian didiamkan selama tiga sampai lima menit agar hemoglobin bereaksi dengan HCl. Larutan tersebut kemudian ditambahkan akuades sampai warnanya sama dengan larutan standar. Pembacaan skala dilakukan dengan mencocokkan tinggi larutan dengan nilai pada skala kuning yang memiliki satuan G% pada tabung.

Pengukuran kadar hematokrit dilakukan menggunakan metode Anderson dan Siwicki (1993). Sampel darah dihisap menggunakan tabung mikrohematokrit dengan sistem kapiler. Setelah sampel darah mencapai $\frac{3}{4}$ bagian tabung, ujung tabung disumbat menggunakan *crystoseal*. Tabung kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3.000 rpm selama lima menit. Pengukuran nilai hematokrit dilakukan dengan cara membandingkan tinggi endapan

darah dengan tinggi total darah dalam tabung. Penghitungan nilai hematokrit menggunakan rumus $Hc (\%) = (\text{volume endapan darah})/(\text{volume total darah}) \times 100$.

Analisis data

Penelitian ini dirancang dengan menggunakan rancangan acak lengkap faktorial dengan tiga ulangan pada uji *in vivo*. Data perhitungan dianalisis menggunakan program Microsoft Excel 2007, SPSS 16, dan SAS 16 dengan uji lanjut *Duncan*. Data kualitas air dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Karakterisasi bakteri *Streptococcus agalactiae*

Karakteristik bakteri yang akan digunakan diketahui melalui beberapa uji, yaitu meliputi uji pewarnaan Gram, sifat biokimia dan fisiologi bakteri. Hasil karakterisasi bakteri dapat dilihat pada Tabel 1.

Hasil pengamatan menunjukkan kedua bakteri uji memiliki karakteristik yang sama, dari sifat Gram, biokimia dan fisiologisnya. Uji aktivitas hemolitik menunjukkan bahwa kedua bakteri termasuk tipe nonhemolitik. Perbedaan kedua bakteri terletak pada kandungan protein terlarut pada *extracellular protein* (ECP) yang dihasilkan. Bakteri isolat N14G memiliki kandungan protein ECP 56,75 ppm, sedangkan bakteri isolat NK1 ECP 81,75 ppm (Dwinanti, 2012).

Sintasan relatif (*relative percent survival; RPS*)

Data nilai RPS disajikan pada Tabel 2. Pada penelitian ini, masih ditemukan ikan yang mati walaupun telah diberi vaksin. Nilai RPS tertinggi terdapat pada perlakuan 3 dan 5, yaitu 40%, sedangkan nilai RPS terendah terdapat pada perlakuan 6, yaitu 13,04%.

Tabel 1. Hasil karakterisasi bakteri *Streptococcus agalactiae*

Uji	Isolat N14G	Isolat NK1
Pewarnaan Gram	+	+
Bentuk dan penataan sel	Bulat berantai	Bulat berantai
Oksidatif/fermentatif	Fermentatif	Fermentatif
Motilitas	-	-
Oksidase	-	-
Katalase	-	-
Produksi asam dari D-manitol	-	-
Uji aktivitas hemolitik	Nonhemolitik	Nonhemolitik

Total sel darah putih

Parameter hematologi yang menggambarkan respons imun tubuh adalah jumlah leukosit. Jumlah leukosit biasanya sejalan dengan aktivitas fagositik. Rataan jumlah leukosit pada tiap perlakuan disajikan pada Tabel 3.

Jumlah awal leukosit ikan uji pada H0 berkisar $2,81 \times 10^5$ sel/mm³. Berdasarkan Tabel 4, dapat dilihat bahwa jumlah leukosit ikan selama penelitian menunjukkan nilai yang fluktuatif. Pada H10, jumlah leukosit ikan perlakuan semuanya meningkat dibanding H0. Pada H20, jumlah leukosit semua perlakuan terus meningkat. Pada H30, jumlah leukosit perlakuan 1 dan 3

mengalami penurunan, sedangkan pada perlakuan lainnya jumlah leukosit semakin meningkat. Hasil uji statistik menunjukkan jumlah leukosit pada H30 menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata (Tabel 3).

Aktivitas fagositosis

Berdasarkan Tabel 4, nilai aktivitas fagositik ikan selama penelitian menunjukkan nilai yang fluktuatif. Nilai aktivitas fagositik ikan uji pada H0 adalah 14,5%. Pada H10, nilai aktivitas fagositik ikan uji pada semua perlakuan meningkat. Nilai aktivitas fagositik tertinggi perlakuan vaksin ditunjukkan pada perlakuan 2 dengan nilai 73%.

Tabel 2. Nilai RPS ikan yang diberi vaksin *Streptococcus agalactiae*

Kode	Vaksin	Ujiantang	Total ikan	MR (%)	RPS (%)
1	Nonvaksin	Isolat N14G	30	66,67±5,77a	-
2		Isolat NK1	30	76,67±15,27a	-
3	Vaksin isolat N14G	Isolat N14G	30	40,00±10,00a	40,00
4		Isolat NK1	30	60,00±10,00a	21,74
5	Vaksin isolat NK1	Isolat N14G	30	40,00±10,00a	40,00
6		Isolat NK1	30	66,67±15,27a	13,04

Keterangan: MR: *mortality rate*; RPS: *relative percent survival*.

Tabel 3. Jumlah leukosit ikan uji selama pemeliharaan

Kode	Vaksin	Ujiantang	Jumlah leukosit ($\times 10^5$ sel/mm ³)			
			H0	H10	H20	H30
1	Nonvaksin	Isolat N14G	2,81±0,68	4,70±0,86c	12,37±1,07a	5,41±0,49a
2		Isolat NK1		6,68±0,95b	9±0,81a	14,17±5,69a
3	Vaksin isolat N14G	Isolat N14G		7,82±0,09ab	13,99±1,08a	5,29±0,23a
4		Isolat NK1		3,74±0,03c	10,62±5,00a	10,25±4,23a
5	Vaksin isolat NK1	Isolat N14G		6,80±0,06b	14,66±1,13a	24,74±11,18a
6		Isolat NK1		9,12±0,95a	10±0,24a	12,38±7,38a

Keterangan: huruf yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$) dan dibaca dalam kolom yang sama.

Tabel 4. Nilai aktivitas fagositik ikan uji selama pemeliharaan

Kode	Vaksin	Ujiantang	Aktivitas fagositik (%)			
			H0	H10	H20	H30
1	Nonvaksin	Isolat N14G	14,5±0,71	78,50±6,36a	48,50±16,26ab	56,50±6,36a
2		Isolat NK1		55,50±7,78a	31,00±11,31b	57,00±5,66a
3	Vaksin isolat N14G	Isolat N14G		73,00±8,48a	30,50±06,36b	39,00±1,41b
4		Isolat NK1		67,00±4,24a	58,50±04,95a	64,00±7,07a
5	Vaksin isolat NK1	Isolat N14G		53,50±7,48a	55,50±02,12a	67,00±5,66a
6		Isolat NK1		69,00±4,24a	43,00±01,41ab	62,50±6,36a

Keterangan: huruf yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$) dan dibaca dalam kolom yang sama.

Pada H20, nilai aktivitas fagositik cenderung menurun kemudian meningkat pada H30. Berdasarkan uji statistik, jumlah leukosit pada H20 menunjukkan nilai yang berbeda nyata. Nilai aktivitas fagositik pada H30 menunjukkan masih adanya aktivitas leukosit dalam memfagosit bakteri. Perlakuan 5 menunjukkan nilai aktivitas fagositik tertinggi (67%), sedangkan nilai terendah terdapat pada perlakuan 4 (39 %). Hasil uji statistik menunjukkan nilai aktivitas fagositik pada H30 menunjukkan nilai yang berbeda nyata.

Titer antibodi

Berdasarkan Tabel 5, nilai titer antibodi ikan selama penelitian menunjukkan nilai yang fluktuatif. Pada H10 antibodi terbentuk dan nilainya cenderung meningkat pada H20. Nilai titer tertinggi ditunjukkan pada perlakuan 4, yaitu pada pengenceran 1:512. Hal ini menunjukkan bahwa vaksin yang diberikan mampu meningkatkan sistem imun pada ikan uji untuk membentuk antibodi. Hasil uji statistik menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata pada tiap perlakuan. Pada H20, nilai titer perlakuan meningkat setelah dilakukan ujiantang. Nilai titer tertinggi pada perlakuan 6, yaitu pada pengenceran 1:1.448. Pada H30, antibodi ikan uji masih terbentuk namun nilai titernya lebih rendah dibanding nilai titer pada H20. Walau nilai titer menurun pada H30, sistem pertahanan tubuh masih bekerja. Hal ini dapat dilihat pada data jumlah leukosit dan aktivitas fagositik yang cukup tinggi pada H30. Pada Tabel 5, aktivitas fagositik pada H30 menunjukkan nilai yang masih cukup tinggi.

Total sel darah merah

Jumlah rata-rata eritrosit pada tiap perlakuan disajikan pada Tabel 6. Jumlah awal eritrosit ikan uji sebelum perlakuan (H0) berkisar $3,66 \times 10^6$ sel/mm³. Berdasarkan Tabel 7, jumlah eritrosit ikan selama penelitian menunjukkan nilai yang fluktuatif. Setelah vaksinasi dilakukan (H10), jumlah eritrosit ikan perlakuan semuanya mengalami penurunan dibandingkan dengan H0. Berdasarkan hasil uji statistik, jumlah eritrosit tiap perlakuan pada H10 menunjukkan nilai yang berbeda nyata. Pascaujiantang (H20) hanya jumlah eritrosit perlakuan 1, 3, dan 6 yang mengalami peningkatan. Akan tetapi, hasil uji statistik menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata pada tiap perlakuan. Pada akhir pengamatan (H30), jumlah eritrosit perlakuan 1, 3, 4, dan 5 mengalami penurunan. Pada perlakuan 2 dan 6

jumlah eritrosit semakin meningkat dibanding H20. Akan tetapi, hasil uji statistik pada H30 menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata pada tiap perlakuan.

Hemoglobin

Kadar hemoglobin pada tiap perlakuan disajikan pada Tabel 7. Jumlah awal kadar hemoglobin ikan uji pada H0 berkisar 6,2 G%. Berdasarkan Tabel 8, kadar hemoglobin ikan selama penelitian menunjukkan nilai yang fluktuatif. Pada H10, kadar hemoglobin ikan perlakuan semuanya menurun kecuali pada perlakuan 4 yang meningkat menjadi 6,7 G%. Kadar hemoglobin terendah pada perlakuan 1 adalah 2,1 G%. Hasil uji statistik menunjukkan nilai yang berbeda nyata pada tiap perlakuan. Pada H20, kadar hemoglobin ikan uji cenderung menurun, kecuali pada perlakuan 1 dan 5 yang kadar hemoglobinnya meningkat. Kadar hemoglobin perlakuan terendah terdapat pada perlakuan 4, yaitu 2,5 G%. Hasil uji statistik menunjukkan nilai yang berbeda nyata terhadap kadar hematokrit. Pada H30, kadar hemoglobin ikan uji cenderung mengalami peningkatan. Kadar hemoglobin tertinggi terdapat pada perlakuan 5 dengan nilai 5,6 G%. Akan tetapi nilainya tidak berbeda nyata setelah dilakukan uji statistik.

Hematokrit

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada penelitian ini, kadar hematokrit yang diamati memiliki nilai yang bervariasi. Rata-rata kadar hematokrit pada tiap perlakuan disajikan pada Tabel 8.

Jumlah awal kadar hematokrit ikan uji pada H0 berkisar 19,82%. Kadar hematokrit ikan selama penelitian berfluktuatif. Pada H10, kadar hematokrit ikan perlakuan cenderung meningkat kemudian menurun pada H20. Kadar hematokrit tertinggi terdapat pada perlakuan 1 (27,75%), sedangkan nilai terendah pascavaksinasi terdapat pada perlakuan 4 (16,91%). Hasil uji statistik menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata pada tiap perlakuan. Pada H20, kadar hematokrit semakin bervariasi. Perlakuan 3 memiliki kadar hematokrit tertinggi dengan nilai 26,86%. Pada H30, kadar hematokrit ikan uji tetap fluktuatif. Hasil uji statistik pada H30 menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata pada tiap perlakuan.

Pembahasan

Hasil uji karakteristik bakteri memperlihatkan bahwa bakteri yang digunakan adalah *S.*

Tabel 5. Nilai titer antibodi ikan uji selama pemeliharaan

Kode	Vaksin	Ujiantang	Titer antibodi (-log 2)			
			H0	H10	H20	H30
1	Non vaksin	Isolat N14G	0±0,00	-	8,00±0,00ab	5,0±0,00a
2		Isolat NK1		-	3,50±2,12bc	4,0±0,00a
3	Vaksin isolat N14G	Isolat N14G		8,5±2,12a	10,00±1,41a	4,5±2,12a
4		Isolat NK1		9,0±1,41a	5,50±0,71bc	3,0±0,00a
5	Vaksin isolat NK1	Isolat N14G		6,0±0,00a	10,00±0,00a	4,0±0,00a
6		Isolat NK1		6,5±0,71a	10,50±0,71a	4,0±0,00a

Keterangan: huruf yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$) dan dibaca dalam kolom yang sama.

Tabel 6. Jumlah eritrosit ikan uji selama pemeliharaan

Kode	Vaksin	Ujiantang	Jumlah eritrosit ($\times 10^6$ sel/mm ³)			
			H0	H10	H20	H30
1	Nonvaksin	Isolat N14G	3,66±0,73	1,00±0,03ab	1,67±0,19a	0,53±0,03a
2		Isolat NK1		1,55±0,54ab	0,91±0,41a	1,28±0,56a
3	Vaksin isolat N14G	Isolat N14G		1,20±0,18ab	1,70±0,75a	0,88±0,47a
4		Isolat NK1		1,63±0,06a	1,43±0,00a	0,88±0,18a
5	Vaksin isolat NK1	Isolat N14G		1,32±0,15ab	1,11±0,66a	0,84±0,67a
6		Isolat NK1		0,92±0,09b	1,2±0,00a	1,47±0,49a

Keterangan: huruf yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$) dan dibaca dalam kolom yang sama.

Tabel 7. Kadar hemoglobin ikan uji selama pemeliharaan

Kode	Vaksin	Ujiantang	Kadar hemoglobin (G%)			
			H0	H10	H20	H30
1	Nonvaksin	Isolat N14G	6,2±0,28	2,1±0,14d	5,2±0,28a	4,7±1,27a
2		Isolat NK1		4,1±0,42b	2,8±0,56b	4,3±1,84a
3	Vaksin isolat N14G	Isolat N14G		6,1±0,14a	5,2±0,28a	4±0,28a
4		Isolat NK1		6,7±0,42a	2,5±0,42b	3,4±0,28a
5	Vaksin isolat NK1	Isolat N14G		2,9±0,14c	5,1±0,42a	5,6±1,41a
6		Isolat NK1		4,5±0,14b	3,6±0,56b	3,2±0,85a

Keterangan: huruf yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$) dan dibaca dalam kolom yang sama.

Tabel 8. Kadar hematokrit ikan uji selama pemeliharaan

Kode	Vaksin	Ujiantang	Kadar hematokrit (G%)			
			H0	H10	H20	H30
1	Nonvaksin	Isolat N14G	19,82±0,83	27,75±2,59a	17,21±2,59a	18,56±5,56a
2		Isolat NK1		25,1±10,73a	12,98±0,25a	14,91±10,73a
3	Vaksin isolat N14G	Isolat N14G		18,24±2,95a	26,86±2,95a	14,58±2,95a
4		Isolat NK1		16,91±3,72a	21,05±3,72a	16,16±4,73a
5	Vaksin isolat NK1	Isolat N14G		17,53±0,56a	21,82±0,56a	14,45±0,25a
6		Isolat NK1		20,27±5,73a	18,92±0,00a	15,95±5,73a

Keterangan: huruf yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$) dan dibaca dalam kolom yang sama.

agalactiae. Hasil uji karakteristik ini sesuai dengan Evans *et al.* (2006) yang menyebutkan bakteri ini mempunyai karakteristik Gram positif, nonmotil, fermentatif, katalase negatif, oksidase negatif, produksi asam dari D-manitol negatif, dan aktivitas hemolitik negatif. Bakteri yang dipakai pada penelitian ini ada dua jenis isolat bakteri *S. agalactiae* tipe nonhemolitik, yaitu isolat N14G dan isolat NK1. Bakteri ini merupakan bagian dari lima bakteri *S. agalactiae* yang diisolasi dari organ ikan nila yang berasal dari beberapa daerah di Indonesia Hardi *et al.* (2011). Setelah diteliti, kandungan protein ECP dari kedua isolat tersebut berbeda. Isolat N14G memiliki kandungan protein 56,75 ppm, sedangkan isolat NK1 memiliki kandungan protein 81,75 ppm (Dwinanti, 2012).

Vaksin merupakan bahan antigenik yang memilikisifat imunogenik untuk menghasilkan respon imun spesifik terhadap suatu penyakit sehingga dapat mencegah atau mengurangi pengaruh infeksi oleh mikroorganisme tertentu. Vaksin yang digunakan harus memenuhi beberapa syarat, yaitu vaksin harus aman, dapat memberikan proteksi, mudah diaplikasikan, dan dapat digunakan untuk spesies lain (Grisez & Tan, 2005). Gomes *et al.* (2006) menyatakan terdapat beberapa vaksin, yaitu vaksin inaktif, vaksin yang berasal dari mikroorganisme (bakteri atau virus) hidup, dan vaksin DNA.

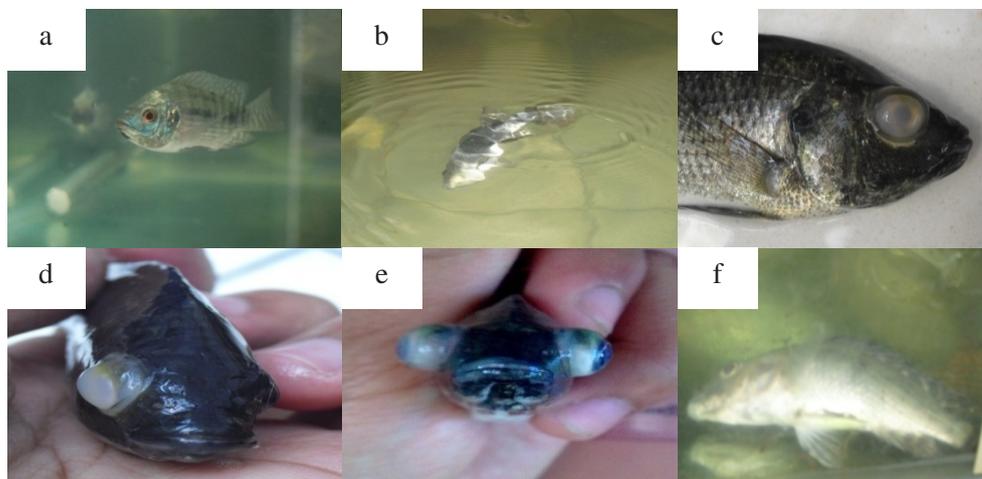
Metode pemberian vaksin dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu injeksi, perendaman, dan oral (dicampur pada pakan). Pada penelitian ini, vaksin yang digunakan adalah vaksin inaktif yang komponen utamanya adalah sel utuh bakteri *S. agalactiae* yang pemberiannya dilakukan dengan cara perendaman. Kelebihan cara perendaman dibanding cara lain adalah mudah dilakukan pada produksi ikan skala besar,

biaya relatif murah, dan tingkat stres ikan yang divaksin relatif rendah (Evensen, 2009). Evans *et al.* (2004) menyatakan, prinsip masuknya vaksin yang diberikan dengan cara perendaman adalah penyerapan melalui kulit. Selain melalui kulit, diduga vaksin masuk kedalam tubuh melalui air yang tertelan saat ikan melakukan respirasi dan insang. Bahan yang dipakai untuk mematikan sel bakteri adalah formalin. Formalin bekerja dengan cara menarik air dari sel dan membentuk lapisan baru di permukaan sehingga bentuk sel dan komponennya masih tetap utuh.

Pada uji *in vivo*, setelah vaksinasi terjadi kematian pada beberapa perlakuan. Penyebab kematian diduga karena ikan mengalami stres. Stres pada ikan dapat mempengaruhi metabolisme, pertumbuhan, dan pertahanan terhadap penyakit (Evans *et al.*, 2005). Setelah ujiantang, ikan uji kontrol positif dan perlakuan vaksin menunjukkan gejala klinis ikan sakit seperti berenang *whirling*, *opacity*, *purulens*, *exophthalmia*, dan tubuh membengkok.

Pada akhir penelitian, nilai sintasan kontrol positif pada perlakuan 1 dan 2 adalah 33,33% dan 23,33%. Pada perlakuan kedua jenis vaksin yang diuji tantang dengan bakteri isolat N14G, hasilnya menunjukkan nilai sintasan yang sama, yaitu 60%. Nilai tersebut lebih besar dibanding perlakuan vaksin yang diuji tantang bakteri isolat NK1, yaitu 40% dan 33,33%.

Nilai RPS kedua jenis vaksin yang diuji tantang bakteri isolat N14G adalah 40%, sedangkan vaksin yang diuji tantang bakteri isolat NK1 memberikan proteksi sebesar 21,74% dan 13,04%. Hal ini menunjukkan bahwa kedua vaksin memberikan proteksi yang lebih baik terhadap infeksi bakteri isolat N14G dibandingkan infeksi bakteri isolat NK1. Hal ini



Gambar 2. Gejala klinis ikan yang terinfeksi bakteri *Streptococcus agalactiae*. Keterangan a = ikan normal, b = berenang *whirling*, c = *opacity*, d = *purulens*, e = *exophthalmia*, f = tubuh membengkok.

diduga karena kandungan protein ECP isolat NK1 lebih tinggi daripada isolat N14G. Pasnik *et al.* (2005) menyatakan, kandungan protein pada ECP merupakan faktor yang menentukan virulensi bakteri patogen pada ikan. Akan tetapi, nilai RPS dalam penelitian ini menunjukkan bahwa vaksin belum cukup memberikan proteksi terhadap ikan. Suatu vaksin dikatakan efektif bila memiliki nilai RPS > 50%, yang berarti bahwa sintasan ikan yang diberi vaksin lebih tinggi dibandingkan dengan ikan yang tidak diberi vaksin.

Status kesehatan ikan selama penelitian dapat diamati dari hematologi ikan. Dalam penelitian ini, parameter hematologi yang diukur adalah jumlah leukosit, aktivitas fagositik, titer antibodi, jumlah eritrosit, kadar hemoglobin, dan kadar hematokrit. Leukosit berperan dalam sistem pertahanan tubuh karena beberapa jenis leukosit seperti monosit dan neutrofil merupakan sel yang aktif melakukan aktivitas fagositik jika tubuh diinvasi oleh materi asing. Leukosit juga berperan dalam pembentukan antibodi. Jumlah leukosit sebelum diberi perlakuan adalah $2,81 \times 10^6$ sel/mm³. Jumlah ini meningkat setelah ikan diberi perlakuan vaksin dan ujiantang bakteri hingga berkisar $2,81-24,74 \times 10^6$ sel/mm³. Jumlah leukosit yang meningkat pascavaksinasi dan pascaujiantang menunjukkan sistem pertahanan tubuh merespon adanya antigen yang masuk ke dalam tubuh sebagai upaya pertahanan tubuh.

Tubuh ikan membaca bahwa vaksin yang masuk dianggap sebagai antigen. Tubuh memberi respon dengan memproduksi leukosit. Selain itu tubuh juga memberi respons dengan membentuk antibodi, namun antibodi ini kurang efektif pada awal infeksi, dalam hal ini pada awal vaksinasi. Martins *et al.* (2008) menyatakan bahwa jumlah leukosit pada ikan yang terinfeksi patogen akan meningkat sebagai upaya pertahanan tubuh. Pada akhir pengamatan, jumlah leukosit masih cukup tinggi pada beberapa perlakuan. Hal tersebut menunjukkan tubuh masih memberikan perlawanan terhadap infeksi bakteri.

Jumlah leukosit juga terkait dengan aktivitas fagositosis dan titer antibodi pascavaksinasi dan ujiantang. Sebelum vaksinasi nilai aktivitas fagositik ikan uji adalah 14,5%. Setelah dilakukan vaksinasi, nilai aktivitas fagositik meningkat. Setelah ujiantang, nilai aktivitas fagositik lebih rendah dibandingkan pascavaksinasi. Akan tetapi nilai titer antibodi tertinggi terjadi pada saat pascaujiantang, yaitu pada pengenceran 1:512. Hal tersebut menunjukkan pada saat pascaujiantang, leukosit, dalam hal ini limfosit B yang

berdiferensiasi menjadi sel-sel plasma lebih banyak memproduksi antibodi dibandingkan melakukan aktivitas fagositik. Pada akhir pengamatan yang terjadi justru sebaliknya, yaitu nilai aktivitas fagositik meningkat pada akhir pengamatan sedangkan nilai titernya cenderung menurun. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada akhir pengamatan, sistem imun masih memberikan perlawanan terhadap infeksi bakteri. Hal ini juga didukung oleh jumlah leukosit pada akhir pengamatan yang masih cukup tinggi jumlahnya.

Terbentuknya sistem imun menurut Robertsen (2006) yaitu antigen yang masuk ke dalam tubuh akan difagosit oleh monosit (makrofag) dan neutrofil. Komponen antigen hasil proses fagositik diikat oleh limfosit T kemudian mengirimkan informasi ke limfosit B. Limfosit B akan membentuk antibodi spesifik berdasarkan antigen yang diterima. Antibodi berperan dalam melumpuhkan patogen dan mengurangi toksisitas racun sehingga mudah diserang oleh sel fagosit. Selain itu, antibodi juga mengaktifkan komplemen sehingga patogen menjadi lisis (Uribe *et al.*, 2011).

Jumlah eritrosit setelah perlakuan vaksin menunjukkan nilai yang menurun dibandingkan dengan sebelum diberi vaksin. Hal ini diduga dikarenakan vaksin yang diberikan masih dianggap benda asing (antigen) sehingga ikan menjadi stres dan mengakibatkan turunnya eritrosit serta tubuh lebih banyak memproduksi leukosit sebagai bentuk pertahanan tubuh. Setelah ujiantang, jumlah eritrosit cenderung meningkat akan tetapi menurun pada akhir pengamatan. Hal tersebut diduga karena infeksi bakteri masih ada sehingga tubuh memproduksi leukosit lebih banyak sebagai bentuk pertahanan tubuh. Walaupun cenderung menurun, akan tetapi jumlah eritrosit masih pada kisaran normal. Anderson dan Siwicki (1993) menyatakan bahwa jumlah eritrosit ikan teleostei dalam keadaan normal berkisar $1,05-3,00 \times 10^6$ sel/mm³.

Kadar hemoglobin ikan uji sebelum diberi vaksin yaitu 6,2 G%. Kadar hemoglobin ikan uji kemudian menurun pascavaksinasi dan pascaujiantang. Pola penurunan kadar hemoglobin sama dengan pola menurunnya jumlah eritrosit pascavaksinasi dan pascaujiantang. Dianti *et al.* (2013) menyatakan terdapat korelasi antara jumlah eritrosit, kadar hemoglobin, dan kadar hematokrit. Semakin rendah jumlah eritrosit, semakin rendah pula kadar hemoglobin dan kadar hematokritnya.

Kadar hematokrit didefinisikan sebagai perbandingan antara padatan sel darah merah dalam darah yang dinyatakan dalam persen (Blaxhall & Daisley, 1973). Nilai hematokrit awal ikan uji yaitu 19,82%. Kadar hematokrit meningkat pascavaksinasi. Nilai hematokritnya masih ada pada kisaran normal. Kadar hematokrit ikan normal berkisar antara 32,3±4,2% (Ololade & Oginni, 2010). Kadar hematokrit menurun setelah uji tantang sampai akhir pengamatan, bahkan kadar hematokrit pada akhir pengamatan nilainya dibawah kisaran normal. Kadar hematokrit yang semakin menurun diduga karena infeksi bakteri. Blaxhall dan Daisley (1973) menyatakan kadar hematokrit yang rendah dapat menjadi petunjuk kurangnya protein dalam pakan, defisiensi vitamin, atau ikan terkena infeksi sehingga nafsu makannya menurun. Pada akhir pengamatan, kadar hematokrit tiap perlakuan ada yang meningkat dan ada juga yang menurun. Namun jumlahnya tidak berbeda nyata antara perlakuan satu dengan yang lainnya.

Selama penelitian, pemeliharaan kualitas air dilakukan untuk menjaga kualitas media hidup ikan uji. Penyifonan dan pergantian air dilakukan sebagai upaya menjaga kualitas air. Selain itu dilakukan juga pengukuran kualitas air untuk memastikan kelayakan media pemeliharaan. Parameter yang diukur meliputi suhu, pH, DO, dan TAN. Hasil uji kualitas air pada Tabel 11 menunjukkan parameter yang diukur masih pada kisaran normal sehingga layak digunakan sebagai media pemeliharaan. Selain itu, hal ini menunjukkan ikan yang terserang penyakit bukan berasal dari media pemeliharaan yang buruk melainkan dari infeksi bakteri yang sengaja dilakukan.

KESIMPULAN

Vaksin sel utuh *Streptococcus agalactiae* tipe nonhemolitik dengan kepadatan 10⁹ cfu/mL yang diberikan dengan cara perendaman dapat meningkatkan sistem imun ikan nila. Namun, nilai RPS yang kecil menunjukkan bahwa vaksin yang diberikan masih kurang efektif untuk mencegah infeksi bakteri *S. agalactiae*.

DAFTAR PUSTAKA

Anderson DP, Siwicki, AK. 1993. Basic hematology and serology for fish health programs. *Disease in Asian Aquaculture II*: 185–202.

- Blaxhall PC, Daisley KW. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology* 5: 577–581.
- Boyd CE. 1982. *Water Quality in Pond for Aquaculture*. Alabama: International Center for Aquaculture Experiment Station Auburn University.
- Copatti CE, Garcia LdO, Kochhann D, Cunha MAd, Becker AG, Baldisserotto B. 2011. Low water hardness and pH affect growth and survival of silver catfish juveniles. *Ciência Rural, Santa Maria* 41: 1.482–1.487
- Dianti L, Prayitno SB, Ariyati RW. 2013. Ketahanan nonspesifik ikan mas *Cyprinus carpio* yang direndam ekstrak daun jeruju *Acanthus ilicifolius* terhadap infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Aquaculture Management and Technology* 2: 63–71
- Dwinanti SH. 2012. Toksisitas dan imunogenitas produk ekstraseluler *Streptococcus agalactiae* tipe non-hemolitik pada ikan nila *Oreochromis niloticus* [Tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Evans JJ, Klesius PH, Shoemaker CA, Fitzpatrick BT. 2005. *Streptococcus agalactiae* vaccination and infection stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied Aquaculture* 16: 105–115.
- Evans JJ, Klesius PH, Shoemaker CA. 2004. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia *Oreochromis niloticus* by intraperitoneal and bath immersion administration. *Vaccine* 22: 3.769–3.773.
- Evans JJ, Klesius PH, Shoemaker CA. 2006. *Streptococcus* in warm-water fish. *Aquaculture Health International* 7: 10–14.
- Evensen O. 2009. Development in fish vaccinology with focus on delivery methodologies, adjuvants and formulations. *The Use of Veterinary Drugs and Vaccines in Mediterranean Aquaculture*: 177–186.
- Gomes S, Afonso A, Gartner F. 2006. Fish vaccination against infections by *Streptococcal* species and the particular case of Lactococcosis. *Revista Portuguesa de Ciencias Veterinarias* 101: 25–35.
- Grisez L, Tan Z. 2005. Vaccine development for Asian aquaculture. *Diseases in Asian Aquaculture* 5: 483–494.
- Hardi EH, Sukenda, Harris E, Lusiastuti EM. 2011. Toksisitas produk ekstraseluler (ECP) *Streptococcus agalactiae* pada ikan nila *Oreochromis niloticus*. *Jurnal Natur Indonesia* 13: 187–199

- Martins ML, Mourino JLP, Amara GV, Vieira FN, Dotta G, Jatoba AMB, Pedrotti FS, Jeronimo GT. 2008. Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. *Brazilian Journal Biology* 68: 657–661.
- Ololade IA, Oginni O. 2010. Toxic stress and hematological effects of nickel on African catfish *Clarias gariepinus* fingerlings. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology* 2: 14–19.
- Pasnik DJ, Evans JJ, Panangala VS, Klesius PH, Shelby RA, Shoemaker CA. 2005. Antigenicity of *Streptococcus agalatae* extracellular products and vaccine efficacy. *Journal of Fish Disease* 28: 205–212.
- Robertson B. 2006. The interferon system of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology* 20: 172–191.
- Uribe C, Folch H, Enriquez R, Moran R. 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinari Medicina* 56: 486–503.
- Yuasa K, Kamaishi T, Hatai K, Bahnnan M, Borisutpeth P. 2008. Two cases of streptococcal infections of cultured tilapia in Asia. *Diseases in Asian Aquaculture* 6: 259–268.