

## Durasi proteksi vaksin *Streptococcus agalactiae* untuk pencegahan streptococcosis pada ikan nila

### The protective duration of *Streptococcus agalactiae* vaccine in Nile Tilapia for the prevention of streptococcosis

Sukenda\*, Rusli, Sri Nuryati, Dendi Hidayatullah

Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor  
Kampus IPB Dramaga Bogor, Jawa Barat 16680  
\*Surel: kenfajri@yahoo.com

#### ABSTRACT

The aim of this study was to assess the protective duration of *Streptococcus agalactiae* vaccine against streptococcosis in Nile tilapia. Fish were treated by the whole cell vaccine, ECP vaccine and mixture of whole cell and ECP vaccine. After 14, 28, 42, and 52 day post-vaccination (DPV), the fish were intraperitoneally challenged with  $10^4$  cfu/mL *S. agalactiae*. The results showed mortality rate of whole-cell vaccine (A), ECP vaccine (B) and mix vaccine (C) up to day 42 was significantly ( $P < 0.05$ ) lower than the control treatment, namely 73.33%; 80%; and 76%, respectively. The mortality rate of vaccine treatments A, B, and C on day 56 had no significant difference ( $P > 0.05$ ) with the control. The value of antibody titer vaccine treatments A, B, and C indicate that antigen-antibody reaction on day 28 after the vaccination was significantly ( $P < 0.05$ ) higher than the control that were 3.67; 3.33; and 3.67. Antigen-antibody reaction on day 42 after the vaccination was founded, but did not different significantly ( $P > 0.05$ ) with the control. Bacterial population in treatment A, B, and C in the organs of the fish until the 28th day was still under the control of  $10^4$  cfu/mL. *S. agalactiae* vaccine protection duration is 42 days after the vaccination.

Keywords : nile tilapia, *Streptococcus agalactiae*, duration, vaccine, streptococcosis

#### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis durasi proteksi dari vaksin *Streptococcus agalactiae* sebagai pencegahan terhadap streptococcosis pada ikan nila. Ikan divaksinasi dengan vaksin sel utuh, ECP dan gabungan sel utuh dan ECP dari *S. agalactiae* yang diinjeksi secara intrapetorineal. Ikan diuji tantang *S. agalactiae*  $10^4$  cfu/mL pada hari ke-14, ke-28, ke-42, dan ke-56 pascavaksinasi. Hasil penelitian menunjukkan tingkat mortalitas perlakuan vaksin sel utuh (A), vaksin ECP (B), dan gabungan vaksin sel utuh dengan ECP (C) hingga hari ke-42 masih signifikan ( $P < 0,05$ ) lebih rendah dari perlakuan kontrol yaitu 73,33%; 80%; dan 76%. Tingkat mortalitas perlakuan vaksin A, B, dan C pada hari ke-56 sudah tidak berbeda signifikan ( $P > 0,05$ ) dengan kontrol. Nilai titer antibodi perlakuan vaksin A, B, dan C menunjukkan bahwa reaksi antigen antibodi pada hari ke-28 pascavaksinasi masih signifikan ( $P < 0,05$ ) lebih tinggi dibandingkan kontrol yaitu 3,67; 3,33; dan 3,67. Reaksi antigen antibodi pada hari ke-42 pascavaksinasi masih ditemukan, namun tidak berbeda signifikan ( $P > 0,05$ ) dengan kontrol. Populasi bakteri pada perlakuan A, B, dan C di organ ikan hingga hari ke-28 masih di bawah kontrol  $10^4$  cfu/mL. Durasi proteksi vaksin *S. agalactiae* adalah 42 hari pascavaksinasi.

Kata kunci: ikan nila, *Streptococcus agalactiae*, durasi, vaksin, streptococcosis

#### PENDAHULUAN

Penyakit yang menyebabkan kerugian dalam budidaya ikan nila adalah streptococcosis yang disebabkan oleh bakteri *Streptococcus* (Sheehan *et al.*, 2009; Yang & Li, 2009; Jantrakajorn *et al.*, 2014). Streptococcosis pada ikan yang disebabkan oleh *S. agalactiae* menyebabkan septicemia dan meningoencephalitis (Mian *et al.*, 2009). Infeksi

*Streptococcus* pada budidaya ikan nila skala yang besar menyebabkan tingkat kematian mencapai 90% di Cina dan lebih dari 90% disebabkan oleh bakteri *S. agalactiae* (Ye *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012). Pada daerah wabah *S. agalactiae* ditemukan kematian ikan yang besar disebabkan beberapa faktor lingkungan, seperti tingginya temperatur air dan kadar amonia, serta rendahnya kadar oksigen terlarut (Pasnik *et al.*, 2005a).

Salah satu upaya pencegahan yang dapat dilakukan untuk mengatasi penyakit adalah dengan cara menumbuhkan kekebalan, antara lain dengan vaksinasi. Vaksinasi merupakan cara efektif dalam upaya penanggulangan penyakit ikan (Evans *et al.*, 2006; Sommerset *et al.*, 2005; Muiswinkel, 2008; Secombes, 2011; Gudding *et al.*, 2013). Keberhasilan program vaksinasi terlihat dari menurunnya tingkat mortalitas ikan budidaya akibat infeksi patogen potensial, menurunnya penggunaan antibiotik pada budidaya ikan, dan menurunnya resistensi beberapa jenis patogen terhadap antibiotik (Sun *et al.*, 2014). Vaksinasi dapat meningkatkan kekebalan pada tubuh ikan sehingga tahan terhadap serangan penyakit tertentu selama beberapa waktu, sehingga angka kematian dapat ditekan sekecil mungkin. Vaksin yang mengandung *extracellular product* (ECP) dan sel utuh dari *S. agalactiae* dengan *formalin-killed* yang diinjeksi ke ikan nila, memberikan proteksi yang signifikan terhadap infeksi *S. agalactiae* (Evans *et al.*, 2005; Hardi *et al.*, 2013; Amrullah *et al.*, 2014; Dwinanti *et al.*, 2014).

Vaksinasi pada ikan akan merangsang terbentuknya antibodi yang akan memproteksi terhadap serangan penyakit tertentu, namun dalam jangka waktu tertentu keberadaan antibodi dalam tubuh ikan akan semakin menurun kadarnya sehingga tingkat proteksinya akan menurun pula. Hardi *et al.*, (2013) mengemukakan bahwa antibodi spesifik terhadap *S. agalactiae* baru ditemukan sekitar lima hari setelah infeksi pertama dan kadarnya dalam serum meningkat mencapai puncak setelah 10–14 hari. Antibodi akan menurun kadarnya dalam serum dan menurunkan tingkat proteksi seiring waktu pascavaksinasi pada ikan nila (Pasnik *et al.*, 2005b). Lama waktu keberadaan antibodi protektif dalam tubuh ikan juga dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu; genetik, nutrisi, stres (kualitas air, polutan), dan ikan (umur, spesies dan strain) (Uribe *et al.*, 2011).

Penelitian efikasi perbandingan vaksin *S. agalactiae* yaitu vaksin sel utuh, vaksin ECP dan gabungan vaksin 50% sel utuh dan 50% ECP telah dilakukan, masing-masing diperoleh tingkat proteksi vaksin 79%, 62,5%, dan 92% pada ikan nila selama jangka waktu 14 hari pascavaksinasi (Hardi *et al.*, 2013). Berdasarkan dari penelitian tersebut di atas maka dilakukan penelitian ini untuk mengkaji lama waktu proteksi dari beberapa bentuk vaksin *S. agalactiae*, sehingga dalam proses manajemen pemberian vaksin dapat diketahui waktu pemberian vaksin berikutnya

(*booster*). Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji lama waktu proteksi dari vaksin sel utuh, vaksin ECP serta gabungan vaksin sel utuh dan ECP dari *S. agalactiae* sebagai pencegahan terhadap streptococcosis pada ikan nila.

## BAHAN DAN METODE

### Penyiapan ikan dan bakteri uji

Ikan nila *Oreochromis niloticus* yang digunakan dalam penelitian ini memiliki strain BEST yang berasal dari daerah Cibanteng Proyek Bogor. Benih ikan nila dengan berat 20–25 g yang telah diverifikasi tidak membawa *S. agalactiae* dengan isolasi dan identifikasi pada sepuluh ekor ikan contoh. Uji dilakukan dengan cara mengambil cairan mata dan cairan otak dengan menggunakan jarum ose steril kemudian digores pada cawan media BHIA, selanjutnya media gores diinkubasi selama 48 jam. Apabila tidak ada bakteri yang tumbuh maka diasumsikan bahwa ikan uji tidak membawa *S. agalactiae*. Sebelum digunakan dalam percobaan, ikan uji diadaptasikan terlebih dahulu terhadap kondisi laboratorium di dalam sebuah bak penampungan sementara. Isolat bakteri *S. agalactiae* diperoleh dari koleksi Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar Bogor. Bakteri *S. agalactiae* yang digunakan untuk pembuatan vaksin dan uji tantang dilakukan fasase untuk meningkatkan virulensi serta dikarakterisasi ulang menggunakan Kit API 20 Strep.

### Penyiapan vaksin

Isolat bakteri *S. agalactiae* pada cawan petri diambil sebanyak 1 Ose dan dimasukkan ke dalam 10 mL media *brain heart infusion broth* (BHIB) secara aseptik. Bakteri diinkubasi pada suhu 28 °C dalam inkubator selama 24 jam. Kemudian 1 mL biakan bakteri dimasukkan ke dalam 9 mL media BHIB, dan diinkubasi pada suhu 28 °C selama 24 jam. Masing-masing biakan bakteri sebanyak 10 mL selanjutnya dimasukkan ke dalam 90 mL BHIB dan diinkubasi selama 72 jam dengan asumsi konsentrasi  $4 \times 10^9$  cfu/mL (Evans *et al.*, 2004). Ketiga biakan bakteri dengan volume masing-masing 100 mL ditambahkan formalin 3% dari volume biakan dan diinkubasi kembali selama 24 jam.

Pembuatan vaksin sel utuh: 100 mL biakan bakteri yang telah diinaktivasi dengan formalin 3% kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit dengan suhu 4 °C. Larutan supernatan dan endapan yang terbentuk

kemudian dipisahkan. Endapan bakteri yang telah terpisah kemudian dicuci dengan *phosphate buffered saline* (PBS) 100 mL lalu disentrifugasi pada 5.000 rpm selama 15 menit, kegiatan pencucian sel bakteri dilakukan sebanyak dua kali dengan PBS. Endapan bakteri kemudian ditambahkan kembali PBS hingga 100 mL dan disimpan dalam lemari pendingin hingga dipakai.

Pembuatan vaksin ECP: 100 mL biakan bakteri yang telah diinaktivasi dengan formalin 3% kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit dengan suhu 4 °C. Larutan supernatan yang telah terpisah dengan sel bakteri, kemudian disaring dengan kertas saring ukuran 0,22 µm. Supernatan (ECP) yang telah disaring disimpan dalam lemari pendingin untuk kemudian dipakai pada vaksinasi ikan.

Sebelum vaksin digunakan dilakukan uji viabilitas terlebih dahulu terhadap masing-masing vaksin. Pengujian vaksin sel utuh dilakukan dengan mengkulturkannya dalam media BHIA. Bila tidak ditemukan adanya koloni bakteri yang tumbuh selama 72 jam pengamatan, maka vaksin siap dan aman untuk digunakan. Untuk pengujian keamanan vaksin ECP, vaksin disuntikan pada lima ekor ikan nila dan dilihat perkembangannya selama 72 jam. Jika hingga jam ke-72 tidak muncul kematian dan gejala streptococcosis maka vaksin ECP aman untuk digunakan.

### Vaksinasi dan pemeliharaan ikan

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan empat perlakuan dan tiga ulangan. Sebanyak 300 ekor ikan nila ukuran 20–25 g untuk masing-masing perlakuan disuntik dengan bentuk sediaan vaksin sel utuh (A), ECP (B), gabungan sel utuh dan ECP (C) serta PBS sebagai kontrol (K). Vaksin diberikan sebanyak 0,1 mL per ikan. Perbandingan vaksin gabungan yang digunakan adalah 1:1 dari sediaan vaksin sel utuh dan ECP.

Selanjutnya ikan perlakuan vaksin dan kontrol dipelihara dalam empat buah bak fiber berukuran 2 ton pada suhu 30 °C serta diberi aerasi, setiap bak perlakuan berisi 100 ekor ikan uji. Ikan diberikan pakan komersil berprotein 32% dengan *feeding rate* 3% dari bobot biomassa, dan diberikan dua kali sehari, yaitu pagi dan sore hari. Kualitas air dijaga pada kondisi suhu berkisar 28–30 °C, pH 6,5–7 dan kelarutan oksigen lebih dari 3 ppm.

### Uji tantang

Uji tantang dilakukan pada hari ke-14, 28, 42, dan 56 setelah ikan divaksinasi. Bakteri

patogen *S. agalactiae* 10<sup>4</sup> cfu/mL disuntikkan secara intraperitoneal sebanyak 0,1 mL per ikan. Jumlah ikan yang diuji tantang sebanyak 30 ekor per perlakuan, di mana masing-masing akuarium dengan ukuran 60×30×35 cm<sup>3</sup> berisi sepuluh ekor ikan dan diulang sebanyak tiga kali ulangan.

### Relative percent survival

Mortalitas ikan dicatat dan tingkat proteksi relatif vaksin dihitung dengan *relative percent survival* (RPS) (Ellis, 1988) untuk mengetahui efektivitas vaksin yang diberikan pasca uji tantang. RPS dihitung pada akhir pemeliharaan uji tantang dengan rumus sebagai berikut:

$$RPS = \left(1 - \frac{\% \text{ mortalitas perlakuan}}{\% \text{ mortalitas kontrol}}\right) \times 100$$

### Jumlah leukosit

Pengambilan sampel darah dilakukan pada hari ke-14, 28, 42, dan 56 setelah ikan divaksinasi. Jumlah leukosit dihitung menggunakan metode Blaxhall dan Daisley (1973). Darah dihisap menggunakan pipet hemasitometer berbulir putih sampai skala 0,5 lalu diencerkan dengan larutan Turk's sampai skala 11. Kedua ujung ditutup sejajar kemudian digoyangkan membentuk angka delapan selama tiga hingga lima menit. Setelah itu, larutan pada bagian ujung pipet yang tidak teraduk dibuang sebanyak dua tetes. Tetesan berikutnya dimasukkan ke dalam hemasitometer yang telah dilengkapi dengan kaca penutup. Perhitungan dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 400× dan jumlah leukosit dihitung pada lima kotak besar haemasitometer dengan faktor pengenceran 20 kali. Jumlah sel leukosit terhitung kemudian dikalikan dengan volume kotak besar dan faktor pengencer.

### Titer antibodi

Pengambilan sampel darah dilakukan pada hari ke-14, 28, 42, dan 56 setelah ikan divaksinasi. Darah diambil dari lima ekor ikan setiap perlakuan. Darah disentrifugasi dengan kecepatan 3.000 rpm selama lima menit. Setelah serum terpisah dengan sel darah, serum dipindahkan ke tabung mikro dan diinkubasi pada suhu 44 °C selama 20 menit untuk menginaktifkan komplemen. Serum selanjutnya dapat disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4 °C untuk pengamatan titer antibodi. Pengukuran titer antibodi dilakukan dengan mengambil larutan PBS sebanyak 25 µL dan dimasukan ke dalam *microplate* pada lubang

pertama sampai ke-12, selanjutnya dimasukkan serum darah pada lubang pertama sebanyak 25  $\mu\text{L}$  kemudian dilakukan pengenceran bertingkat hingga lubang ke-11. Suspensi bakteri sebanyak 25  $\mu\text{L}$  dimasukkan ke dalam lubang pertama sampai ke-12, campuran dihomogenkan dengan menggoyangkan *microplate* secara perlahan, selanjutnya disimpan selama dua jam dalam inkubator pada suhu 37 °C. Suspensi bakteri disimpan di dalam lemari pendingin pada suhu 4 °C selama satu malam, titer antibodi ditentukan dari lubang terakhir yang masih ditemukan reaksi aglutinasi.

### Populasi *S. agalactiae* di organ ikan

Perhitungan total populasi *S. agalactiae* di organ mata dan otak ikan dilakukan pada 48 jam setelah ikan diuji tantang bakteri *S. agalactiae* virulen  $10^4$  cfu/mL dan dilaksanakan pada hari ke-14, ke-28, ke-42, dan ke-56 pascavaksinasi. Ikan yang dibedah diambil organ mata dan otaknya kemudian ditimbang dan dimasukkan ke dalam PBS dengan perbandingan 1:10 kemudian dihomogenkan dengan cara menggerus sampai tercampur merata dengan PBS. Selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat dan diambil sebanyak 0,1 mL dan disebar pada media BHIA dengan dua ulangan. Perhitungan bakteri pada organ ditentukan dengan metode *plate count*.

### Analisis data

Data yang diperoleh ditabulasi dengan perangkat lunak *Microsoft Excel*. Data RPS, mortalitas, dan nilai titer antibodi dianalisis menggunakan ANOVA, perangkat lunak SPSS versi 16 melalui program dengan tingkat selang kepercayaan 95%, jika signifikan maka akan diuji lanjut dengan uji lanjut Duncan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

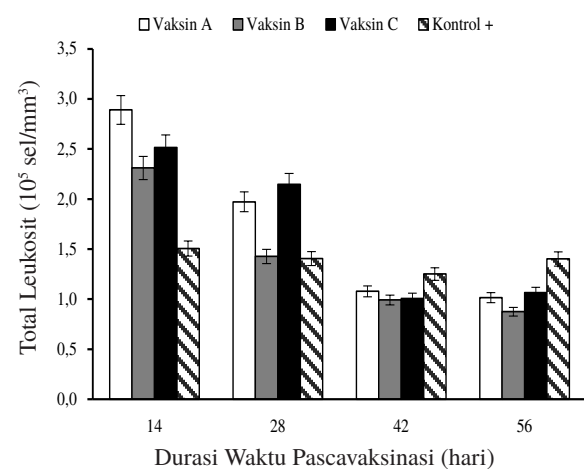
### Total leukosit ikan

Respons pertahanan seluler dapat dilihat melalui total leukosit ikan sebagai pertahanan non spesifik dari infeksi bakteri. Pada fase infeksi patogen tersebut jenis sel leukosit yang berperan adalah neutrofil, monosit, dan limosit (Whyte, 2007; Katzenback & Belosevic, 2009; Hirano *et al.*, 2011). Neutrofil dan monosit merupakan sel-sel fagosit yang aktif ketika ada benda asing yang masuk kedalam tubuh sebagai pertahanan nonspesifik (Katzenback & Belosevic, 2009). Sel limosit terdiri atas limosit T dan B yang bekerja secara spesifik terhadap patogen tertentu

(Callén *et al.*, 2007; Weaver *et al.*, 2007; Ivanov *et al.*, 2008; Milone *et al.*, 2009; Kochenderfer *et al.*, 2010; Hirano *et al.*, 2011; Takizawa *et al.*, 2011, Zhu *et al.*, 2014). Sel limosit B menghasilkan antibodi (humoral) dan limosit T merupakan sel peranta yang bekerja spesifik terhadap patogen (Mariuzza *et al.*, 2010). Total leukosit ikan berdasarkan lama waktu pascavaksinasi dapat dilihat pada Gambar 2.

Berdasarkan hasil analisis, rata-rata kadar total leukosit darah ikan setelah divaksin tertinggi diperoleh setelah 14 hari pascavaksinasi dan terus mengalami penurunan pada 28 hari, 42 hari, dan 56 hari pascavaksinasi, namun tetap dalam batas normal leukosit ikan. Total leukosit ikan yang divaksin lebih tinggi dibanding dengan ikan kontrol hingga hari ke-28 pascavaksinasi, namun pada hari ke-42 dan ke-56 pascavaksinasi total leukosit antara ikan yang divaksin dengan kontrol relatif sama. Hal ini menunjukkan bahwa imunitas spesifik dan nonspesifik bekerja secara bersama setelah vaksinasi ikan pada hari ke-14 dan hari ke-28 pascavaksinasi. Perlakuan vaksin lebih tinggi dibanding kontrol, ini menunjukkan bahwa perlakuan vaksin dapat meningkatkan kemampuan sel-sel sistem imun (leukosit) untuk berproliferasi dan berdiferensiasi akibat adanya infeksi bakteri. Martins *et al.*, (2008) menyatakan bahwa jumlah leukosit pada ikan yang diinjeksi bakteri patogen mengalami peningkatan sebagai upaya meningkatkan mekanisme pertahanan.

Meningkatnya total leukosit dapat digunakan sebagai tanda adanya fase awal infeksi patogen, stres, leukimia, proses peradangan, gangguan nutrisi, perubahan fisiologi atau perubahan kondisi lingkungan (Clauss *et al.*, 2008). Rata-rata



Gambar 2. Total leukosit ikan berdasarkan lama waktu pascavaksinasi. Keterangan: A: sel utuh, B: *extracellular product* (ECP), C: sel utuh+ECP, K: kontrol positif.



leukosit pada ikan sakit lebih tinggi daripada ikan karier laten dan ikan sehat. Hal ini dikarenakan ketika ikan sakit, maka tubuh akan terangsang memproduksi leukosit lebih banyak lagi untuk melawan infeksi patogen (Hardi *et al.*, 2011a,b).

### Titer antibodi

Respons imun spesifik merupakan seperti antibodi merupakan parameter penting untuk mengevaluasi pemberian vaksin. Antibodi ditemukan dalam konsentrasi yang tinggi pada serum ikan (Magnadottir, 2010). Berdasarkan hasil analisis nilai titer antibodi dengan lama waktu 14 hari pascavaksinasi pada perlakuan vaksin A (5,67) mempunyai nilai titer lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) dan tidak berbeda ( $P > 0,05$ ) terhadap perlakuan vaksin C (4,33), namun titer antibodi perlakuan vaksin C tidak berbeda dengan perlakuan vaksin B. Nilai titer antibodi perlakuan vaksin A, B, dan C dengan lama waktu 28 hari pascavaksinasi tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ). Namun nilai titer antibodi perlakuan vaksin A, B, dan C pada hari ke-14 dan 28 masih signifikan ( $P > 0,05$ ) lebih tinggi dibandingkan kontrol. Nilai titer antibodi dari perlakuan vaksin A, B dan C dengan lama waktu 42 dan 56 hari pascavaksinasi tidak berbeda nyata dengan perlakuan kontrol

( $P > 0,05$ ). Nilai titer antibodi ikan pascavaksinasi dapat dilihat pada Tabel 1.

Respons kekebalan spesifik terhadap infeksi dan vaksinasi telah dilaporkan di ikan dengan mengukur respons antibodi melalui reaksi aglutinasi (Sanmartín *et al.*, 2008; Peñaranda *et al.*, 2011). Hari ke-42 masih ditemukan reaksi antigen-antibodi dari hasil pengujian, namun jumlahnya sangat sedikit. Walaupun terjadi penurunan nilai titer antibodi hingga hari ke-42 pascavaksinasi, namun antibodi protektif yang telah terbentuk masih mampu memproteksi ikan dari infeksi *S. agalactiae*. Titer antibodi tidak ditemukan lagi pada semua perlakuan pada hari ke-56 pascavaksinasi pada semua perlakuan. Hardi *et al.*, (2013) mengatakan bahwa pada hari ke-25 pascavaksinasi masih ditemukan adanya reaksi antigen-antibodi pada uji aglutinasi. Yi *et al.*, (2014) juga melaporkan bahwa titer antibodi spesifik secara signifikan meningkat pada hari 28 pascainfeksi dan vaksinasi *S. agalactiae*. Huang *et al.*, (2014) menjelaskan adanya peningkatan nilai antibodi pada hari ke-30 dan mulai menurun pada hari ke-42 pascavaksinasi.

### Uji tantang

Tingkat proteksi vaksin setelah uji tantang

Tabel 1. Hasil analisis nilai titer antibodi ikan pascavaksinasi

Durasi pascavaksinasi (hari)	Perlakuan	Titer Antibodi (-log2)
14	Vaksin A	5,67±0,58a
	Vaksin B	4,00±1,00b
	Vaksin C	4,33±0,58ab
	Kontrol	0,00±0,00c
28	Vaksin A	3,67±1,15a
	Vaksin B	3,33±1,00a
	Vaksin C	3,67±1,53a
	Kontrol	0,00±0,00b
42	Vaksin A	0,67±1,15a
	Vaksin B	1,33±1,15a
	Vaksin C	1,33±1,15a
	Kontrol	0,00±0,00a
56	Vaksin A	0,00±0,00a
	Vaksin B	0,00±0,00a
	Vaksin C	0,00±0,00a
	Kontrol	0,00±0,00a

Keterangan: A: vaksin sel utuh ; B: vaksin *extracellular product* (ECP) ; C: vaksin 50% sel utuh+50% ECP; kontrol: injeksi dengan PBS. Huruf yang berbeda pada kolom dan waktu durasi pascavaksinasi yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan yang berbeda nyata (uji Duncan;  $P < 0,05$ ).

menunjukkan bahwa nilai RPS mengalami penurunan seiring dengan lamanya waktu setelah vaksinasi. Hal ini menunjukkan bahwa terbentuknya antibodi spesifik protektif dalam tubuh yang telah divaksin akan menurun kadar dan tingkat proteksinya seiring dengan lamanya waktu setelah vaksinasi. Pasnik *et al.*, (2005b) telah melaporkan bahwa titer antibodi spesifik bakteri *S. agalactiae* memiliki korelasi dengan proteksi pascavaksinasi dengan bakteri *S. agalactiae*.

Tingkat kematian ikan yang divaksin sel utuh, ECP dan gabungan keduanya adalah 13,33%; 30%; dan 26,67%. Perlakuan vaksin C tidak berbeda signifikan ( $P>0,05$ ) dengan vaksin A dan B, sedangkan vaksin B berbeda signifikan ( $P>0,05$ ) lebih tinggi dengan vaksin A. Tingkat kematian ikan pada hari ke-28 pascavaksinasi dari vaksin A, B, dan C yaitu 33,33%; 40%; dan 30% dan pada hari ke-42 yaitu 73,33%; 80%; dan 96,67%. Tingkat kematian perlakuan vaksin A, B, dan C tidak berbeda signifikan ( $P>0,05$ ) pada hari ke-28 dan hari ke-42 namun tingkat kematian pada hari ke-14, 28, dan hari ke-42 pascavaksinasi ikan masih berbeda signifikan ( $P<0,05$ ) lebih rendah dari kontrol. Tingkat mortalitas perlakuan

vaksin A, B, dan C pada hari ke-56 sudah tidak berbeda signifikan ( $P>0,05$ ) dengan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa pada hari ke-14, 28 dan 42 pascavaksinasi ikan tingkat proteksi vaksin yang diberikan mampu memproteksi ikan dari infeksi *S. agalactiae*. Vaksin yang diberikan sudah tidak mampu memproteksi ikan pada hari ke-56. Tingkat mortalitas ikan pascavaksinasi dapat dilihat pada Tabel 2.

Hasil analisis RPS menunjukkan bahwa perlakuan vaksin A (84,67%) berbeda signifikan ( $P<0,05$ ) lebih tinggi terhadap vaksin lainnya pada hari ke-14, namun pada hari ke-28, 42, dan 56 memiliki RPS yang tidak berbeda signifikan ( $P>0,05$ ). Ketiga jenis vaksin yang diberikan diketahui mampu memproteksi ikan dari infeksi *S. agalactiae* hingga hari ke-42 pascavaksinasi dengan tingkat proteksi vaksin A (23,67%), vaksin B (17%), dan vaksin C (20,33%) dengan tingkat mortalitas masih dibawah perlakuan kontrol. Hal ini menandakan bahwa dengan semakin lamanya waktu pascavaksinasi, antibodi yang terbentuk sudah sangat berkurang kadarnya dalam tubuh ikan sehingga kurang mampu memproteksi ikan dari infeksi *S. agalactiae*. Pasnik *et al.*, (2005b) melaporkan bahwa terjadi penurunan

Tabel 2. Nilai RPS ikan yang divaksin berdasarkan lama waktu pascavaksinasi

Durasi pascavaksinasi (hari)	Perlakuan	$\Sigma$ ikan (ekor)	$\Sigma$ ikan yang mati (ekor)	Mortalitas (%)	RPS (%)
14	Vaksin A	30	4	13,33±0,58c	84,67±8,39a
	Vaksin B	30	9	30,00±1,00db	67±7,51b
	Vaksin C	30	8	26,67±0,58bc	70±4,04b
	Kontrol	30	25	83,33±1,00ba	-
28	Vaksin A	30	10	33,33±0,58b	60,67±9,24a
	Vaksin B	30	12	40,00±1,00b	52,67±14,64a
	Vaksin C	30	9	30,00±0,58b	60,67±9,24a
	Kontrol	30	26	86,67±0,58a	-
42	Vaksin A	30	22	73,33±0,58b	23,67±10,97a
	Vaksin B	30	24	80,00±1,00b	17,00±11,27a
	Vaksin C	30	23	76,67±0,58b	20,33±9,63a
	Kontrol	30	29	96,67±0,58a	-
56	Vaksin A	30	26	86,67±0,58a	10,00±10,00a
	Vaksin B	30	25	83,33±1,53a	12,17±12,17a
	Vaksin C	30	23	76,67±1,15a	20,67±10,07a
	Kontrol	30	29	96,67±0,58a	-

Keterangan: A: vaksin sel utuh ; B: vaksin *extracellular product* (ECP); C: vaksin 50% sel utuh+50% ECP; kontrol: injeksi dengan PBS. RPS: *relative percent survival*. Huruf yang berbeda pada kolom dan waktu durasi pascavaksinasi yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan yang berbeda nyata (uji Duncan;  $P<0,05$ ).

antibodi ikan pascavaksinasi yang diikuti dengan penurunan nilai RPS. Jumlah antibodi ikan yang rendah juga menyebabkan tingkat proteksi terhadap infeksi bakteri patogen spesifik berkurang dan meningkatnya nilai mortalitas (Nur *et al.*, 2004; Sukenda *et al.*, 2014).

### Populasi *S. agalactiae* di organ ikan

Infeksi bakteri *S. agalactiae* menyebabkan perubahan secara mikroskopis pada organ mata dan otak ikan nila (Hernández *et al.*, 2009; Amal

*et al.*, 2010; Alsaïd *et al.*, 2010; Hardi *et al.*, 2011a; Najiah *et al.*, 2012; Koh *et al.*, 2014). Total populasi bakteri *S. agalactiae* di organ mata dan otak ikan setelah 48 jam pascauji tantang dapat dilihat pada Tabel 3. Total populasi bakteri *S. agalactiae* pada tubuh ikan khususnya pada organ mata dan organ otak ikan yang divaksin dengan lama waktu 14 dan 28 hari pascavaksinasi, belum mencapai  $10^4$  cfu/g sehingga kematian ikan relatif kecil. Akan tetapi pada kontrol, bakteri di organ otak dan mata ikan telah melebihi  $10^4$  cfu/g yang

Tabel 3. Total populasi *S. agalactiae* pada organ mata dan otak ikan pascavaksinasi

Vaksin	Organ	Total populasi (cfu/g) berdasarkan lama waktu pascavaksinasi (hari)			
		14	28	42	56
A	otak	$7,50 \times 10^2$	$6,80 \times 10^2$	$9,84 \times 10^4$	$1,15 \times 10^5$
	mata	$7,90 \times 10^2$	$8,04 \times 10^2$	$4,28 \times 10^4$	$4,28 \times 10^4$
B	otak	$7,20 \times 10^2$	$9,98 \times 10^2$	$9,98 \times 10^4$	$1,09 \times 10^5$
	mata	$7,20 \times 10^2$	$8,00 \times 10^2$	$1,72 \times 10^4$	$1,72 \times 10^4$
C	otak	$8,0 \times 10^2$	$6,40 \times 10^2$	$1,02 \times 10^5$	$1,02 \times 10^5$
	mata	$8,00 \times 10^2$	$7,60 \times 10^2$	$1,08 \times 10^4$	$1,08 \times 10^4$
D	otak	$2,40 \times 10^4$	$1,68 \times 10^4$	$1,04 \times 10^5$	$1,04 \times 10^4$
	mata	$3,12 \times 10^4$	$3,56 \times 10^4$	$3,56 \times 10^4$	$3,56 \times 10^4$

Keterangan: A: vaksin sel utuh; B: vaksin *extracellular product* (ECP); C: vaksin 50% sel utuh+50% ECP; K: kontrol positif.

menyebabkan mortalitas ikan lebih tinggi jika dibandingkan dengan ikan yang divaksin. Hal ini menunjukkan bahwa sistem imun yang sudah terbentuk pada perlakuan ikan yang telah divaksin mampu mengurangi perkembangan bakteri.

Berdasarkan Tabel 3 diketahui juga bahwa pada perlakuan ikan yang telah divaksin pada hari ke-42 dan hari ke-56 dengan waktu pengamatan 48 jam setelah uji tantang, jumlah bakteri dalam organ otak dan mata terjadi peningkatan dengan lamanya waktu vaksinasi yaitu dari  $10^4$ – $10^5$  cfu/g organ. Hal ini menandakan bahwa sistem imun spesifik yang terbentuk setelah ikan divaksin sudah berkurang kadarnya sehingga tidak mampu lagi untuk memproteksi ikan dari infeksi *S. agalactiae*.

Perkembangan bakteri pada kelompok ikan yang diberi vaksin lebih lambat jika dibandingkan dengan ikan yang tidak diberi vaksin. Selain itu lama waktu pascavaksinasi menyebabkan adanya perbedaan jumlah bakteri yang tumbuh pada organ target *S. agalactiae* dibandingkan dengan ikan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa sistem imun yang sudah terbentuk pada ikan yang telah divaksin mampu mengurangi perkembangan

bakteri pada tubuh ikan dibandingkan dengan ikan yang tidak divaksin (kontrol). Berkurangnya jumlah bakteri *S. agalactiae* pada hari ke-14 dan 28 disebabkan masih tingginya nilai antibodi ditubuh ikan. Immunoglobulin seperti IgM dapat mengopsonin bakteri, sehingga dapat didegradasi dan diberantas oleh sel-sel fagosit (Schroeder & Cavacini, 2010; Pradipta *et al.*, 2012). Hal ini menunjukkan bahwa antibodi spesifik memainkan peran penting dalam perlindungan ikan terhadap infeksi patogen.

### KESIMPULAN

Lama waktu proteksi vaksin A, B, dan C yang diberikan pada ikan nila adalah 42 hari setelah vaksinasi, dengan tingkat proteksi vaksin A (vaksin sel utuh) 23,67%, vaksin B (vaksin ECP) 17%, dan vaksin C (gabungan vaksin sel utuh dengan vaksin ECP) adalah 20,67%.

### DAFTAR PUSTAKA

Alsaïd M, Daud H, Bejo SK, Abuseliana A. 2010. Antimicrobial activities of some culinary spice

- extracts against *Streptococcus agalactiae* and its prophylactic uses to prevent streptococcal infection in red hybrid tilapia *Oreochromis* sp. *World Journal of Fish and Marine Sciences* 2: 532–538.
- Amal MNA, Zamri-Saad M, Zulkafli AR, Siti-Zahrah A, Misri S, Ramley B, Shahidan H, Sabri MY. 2010. Water thermocline confirms susceptibility of tilapia cultured in lakes to *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9: 2.811–2.817.
- Amrullah, Sukenda, Harris E, Alimuddin, Lusiastuti AM. 2014. Immunogenicity of the 89 kDa toxin protein from extracellular products of *Streptococcus* in *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 9: 176–186.
- Blaxhall PC, Daisley KW. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *Fish Biology* 5: 577–581.
- Callén E, Jankovic M, Difilippantonio S, Daniel JA, Chen HT, Celeste A, Pellegrini M, McBride K, Wangsa D, Bredemeyer A, Sleckman BP, Ried T, Nussenzweig M, Nussenzweig A. 2007. ATM prevents the persistence and propagation of chromosome breaks in lymphocytes. *Cell* 130: 63–75.
- Chen M, Li LP, Wang R, Liang WW, Huang Y, Li J, Lei AY, Huang WY, Gan X. 2012. PCR detection and PFGE genotype analyses of streptococcal clinical isolates from tilapia in China. *Veterinary Microbiology* 159: 526–530.
- Clauss TM, Dove ADM, Arnold JE. 2008. Hematologic disorders of fish. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice* 11: 445–462.
- Dwinanti SH, Sukenda, Yuhana M, Lusiastuti AM. 2014. Toksisitas dan imunogenisitas produk ekstraseluler *Streptococcus agalactiae* tipe non-hemolitik pada ikan nila *Oreochromis niloticus*. *Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia* 2: 105–116.
- Ellis AE. 1988. *Fish Vaccination*. New York, USA: Academic Press.
- Evans JJ, Klesius PH, Shoemaker CA, Fitzpatrick BT. 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, 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. 2006. An overview of *Streptococcus* in warm water fish. *Aquaculture Health International* 7: 10–14.
- Gudding R, Van Muiswinkel WB. 2013. A history of fish vaccination: science-based disease prevention in aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology* 35: 1.683–1.688.
- Hardi EH, Sukenda, Harris E, Lusiastuti AM. 2011a. Karakteristik dan patogenisitas *Streptococcus agalactiae* tipe  $\beta$ -hemolitik dan non-hemolitik pada ikan nila. *Jurnal Veteriner* 12: 152–164.
- Hardi EH, Sukenda, Harris E, Lusiastuti AM. 2011b. Toksisitas produk ekstraseluler (ECP) *Streptococcus agalactiae* pada ikan nila *Oreochromis niloticus*. *Jurnal Natur Indonesia* 13: 187–199.
- Hardi EH, Sukenda, Harris E, Lusiastuti AM. 2013. Kandidat vaksin potensial *Streptococcus agalactiae* untuk pencegahan penyakit streptococcosis pada ikan nila *Oreochromis niloticus*. *Jurnal Veteriner* 14: 408–416.
- Hernández E, Figueroa J, Iregui C. 2009. Streptococcosis on a red tilapia *Oreochromis* sp. farm: a case study. *Journal of Fish Diseases* 32: 247–252.
- Hirano M, Das S, Guo P, Cooper MD. 2011. The evolution of adaptive immunity in vertebrates. *Advances in Immunology* 109: 125–157.
- Huang LY, Wang KY, Xiao D, Chen DF, Geng Y, Wang J, Hea Y, Wang EL, Huang JL, Xiao GY. 2014. Safety and immunogenicity of an oral DNA vaccine encoding sip of *Streptococcus agalactiae* from Nile tilapia *Oreochromis niloticus* delivered by live attenuated *Salmonella typhimurium*. *Fish & Shellfish Immunology* 38: 34–41.
- Ivanov II, de Llanos, Frutos R, Manel N, Yoshinaga K, Rifkin DB, Sartor RB, Finlay BB, Littman DR. 2008. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host and Microbe* 4: 337–349.
- Jantrakajorn S, Maisak H, Wongtavatchai J. 2014. Comprehensive investigation of streptococcosis outbreaks in cultured Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, and red tilapia, *Oreochromis* sp., of Thailand. *Journal of the World Aquaculture Society* 45: 392–402.
- Katzenback BA, Belosevic M. 2009. Isolation and functional characterization of neutrophil-like cells, from goldfish *Carassius auratus* L. kidney. *Developmental and Comparative*



- Immunology 33: 601–611.
- Kochenderfer JN, Wilson WH, Janik JE, Dudley ME, Stetler-Stevenson M, Feldman SA, Maric I, Raffeld M, Nathan DN, Lanier BJ, Morgan RA, Rosenberg SA. 2010. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood* 116: 4.099–4.102.
- Koh CB, Romano N, Zahrah AS, Ng WK. 2014. Effects of a dietary organic acids blend and oxytetracycline on the growth, nutrient utilization and total cultivable gut microbiota of the red hybrid tilapia *Oreochromis* sp. and resistance to *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture Research* 47: 357–369.
- Magnadottir B. 2010. Immunological control of fish diseases. *Journal of Marine Biotechnology* 12: 361–379.
- Mariuzza RA, Velikovskiy CA, Deng L, Xu G, Pancer Z. 2010. Structural insights into the evolution of the adaptive immune system: the variable lymphocyte receptors of jawless vertebrates. *Journal of Biological Chemistry* 391: 753–760.
- 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. *Journal of Biology* 68: 657–661.
- Mian GF, Godoy DT, Leal CAG, Yuhara TY, Costa GM, Figueiredo. 2009. Aspect of the natural history and virulence of *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia. *Journal of Veterinary Microbiology* 136: 180–183.
- Milone MC, Fish JD, Carpenito C, Carroll RG, Binder GK, Teachey D, Samanta M, Lakhall M, Gloss B, Danet-Desnoyers G, Campana D, Riley JL, Grupp SA, June CH. 2009. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo. *Molecular Therapy* 17: 1.453–1.464.
- Muiswinkel WBV. 2008. A history of fish immunology and vaccination I. The early days. *Fish & Shellfish Immunology* 25: 397–408.
- Najiah M, Aqilah NI, Lee KL, Khairulbariyyah Z, Mithun S, Chowdhury AJK, Nadirah M. 2012. Massive mortality associated with *Streptococcus agalactiae* infection in cage-cultured red hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* in Como River, Kenyir Lake, Malaysia. *Journal of Biological Sciences* 12: 438–442.
- Nur I, Sukenda, Dana D. 2004. Ketahanan benih ikan nila *Oreochromis niloticus* dari hasil induk yang diberi vaksin terhadap infeksi buatan *Streptococcus iniae*. *Jurnal Akuakultur Indonesia* 3: 37–43.
- Pasnik DJ, Evans JJ, Klesius PH. 2005b. Duration of protective antibodies and correlation with survival in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* following *Streptococcus agalactiae* vaccination. *Journal of Fish Diseases* 66: 129–134.
- Pasnik DJ, Evans JJ, Panangla VS, Klesius PH, Shelby RA, Shoemaker CA. 2005a. Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy. *Journal of Fish Diseases* 28: 205–212.
- Penaranda MM, Lapatra SE, Kurath G. 2011. Specific city of DNA vaccines against the U and M genogroups of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish & Shellfish Immunology* 31: 43–51.
- Pradipta R, Rauta, Bismita N, Das S. 2012. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. *Immunology Letters* 148: 23–33.
- Sanmartín ML, Paramá A, Castro R, Cabaleiro S, Leiro J, Lamas J, Barja JL. 2008. Vaccination of turbot, *Psetta maxima* (L.), against the protozoan parasite *Philasterides dicentrarchi*: effects on antibody production and protection. *Journal of Fish Diseases* 31: 135–140.
- Schroeder HW JR, Cavacini L. 2010. Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy & Clinical Immunology* 125: S41–52.
- Secombes CJ. 2011. Fish immunity: the potential impact on vaccine development and performance. *Aquaculture Research* 42: 90–92.
- Sheehan B, Labrie L, Lee YS, Wong FS, Chan J, Komar C, Wendover N, Grisez L. 2009. Streptococcal diseases in farmed tilapia. *Aquaculture Asia Pacific* 5: 26–29.
- Sommerset I, Krossoy B, Biering E, Frost P. 2005. Vaccines for fish in aquaculture: Review Expert Review of Vaccines 4: 89–101.
- Sukenda, Febriansyah TR, Nuryati S. 2014. Efikasi vaksin sel utuh *Streptococcus agalactiae* pada ikan nila *Oreochromis niloticus* melalui perendaman. *Jurnal Akuakultur Indonesia* 13: 83–93.
- Sun BG, Dang W, Sun L, Hu YH. 2014.

- Vibrio harveyi* Hsp70: 503 immunogenicity and application in the development of an experimental vaccine against *V. harveyi* and *Streptococcus iniae*. *Aquaculture* 418–419: 144–187.
- Takizawa F, Dijkstra JM, Kotterba P, Korytář T, Kocke H, Köllner B, Jaureguiberry B, Nakanishi T, Fischer U. 2011. The expression of CD8 $\alpha$  discriminates distinct T cell subsets in teleost fish. *Developmental and Comparative Immunology* 35: 752–763.
- Uribe C, Folch H, Enriquez R, Moran G. 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni Medicina* 5: 486–503.
- Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. 2007. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annual Review of Immunology* 25: 821–852.
- Whyte SK. 2007. The innate immune response of finfish: a review of current knowledge. *Fish & Shellfish Immunology* 23: 1.127–1.151.
- Yang W, Li A. 2009. Isolation and characterization of *Streptococcus dysgalactiae* from diseased *Acipenser schrenckii*. *Aquaculture* 294: 14–17.
- Ye X, Li J, Lu MX, Deng GC, Jiang XY, Tian YY, Quan YC, Jian Q. 2011. Identification and molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from pond-cultured tilapia in China. *Fisheries Science* 77: 623–632.
- Yi T, Li WY, Liu L, Xiao XX, Li AX. 2014. Protection of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. against *Streptococcus agalactiae* following immunization with recombinant FbsA and  $\alpha$ -enolase. *Aquaculture* 428–429: 35–40.
- Zhu LY, Lin AF, Shao T, Nie L, Dong WR, Xiang LX, Shao JZ. 2014. B cells in teleost fish act as pivotal initiating APCs in priming adaptive immunity: an evolutionary perspective on the origin of the B-1 cell subset and B7 molecules. *The Journal of Immunology* 192: 2.699–2.714.