

Vaksin Bivalen *Aeromonas hydrophila* untuk Meningkatkan Ketahanan Tubuh Ikan Patin Siam (*Pangasius hypophthalmus*) Terhadap Serangan *Motile aeromonas septicemia*

(*Aeromonas hydrophila* Bivalent Vaccines to Improve Body Resistance catfish (*Pangasius hypophthalmus*) Against Attacks *Motile Aeromonas Septicemia*)

^{1*)} Dwi Mailani, ²⁾ Olga, ^{1,2)} Fatmawati, ^{1,2)} Noor Arida Fauzana

¹⁾ Program Studi Magister Ilmu Perikanan, Universitas Lambung Mangkurat

²⁾ Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Lambung Mangkurat

^{*)} Korespondensi : dwi.mailani@ulm.ac.id

Diterima : 8 Juni 2020 / Disetujui : 24 Juli 2020

ABSTRAK

Penyakit *Motile Aeromonas Septicemia*/MAS akibat infeksi *Aeromonas hydrophila* merupakan kendala dalam budidaya ikan patin siam (*Pangasius hypophthalmus*). Pengendalian MAS dapat dilakukan dengan pemberian vaksin. Tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan dosis vaksin bivalen yang tepat dan efektif untuk pengendalian MAS pada patin Siam (*Pangasius hypophthalmus*). Kedua isolat yang akan dijadikan vaksin adalah strain lokal bakteri *A. hydrophila* CASO.01.G dan SBMI.2. Keduanya diisolasi dari ikan patin siam sakit di kolam budidaya desa Cindai Alus dan Sungai Batang Kabupaten Banjar Kalimantan Selatan. Vaksin dibuat secara pemanasan (*heat killed*) pada suhu 100 °C selama 60 menit. Sebanyak 13 ekor patin siam uji berukuran 9-13 cm dimasukkan dalam tiap akuarium. Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan 5 perlakuan dan 3 ulangan, yaitu vaksin bivalen dengan dosis 10⁹ sel/ml, 10⁸ sel/ml, 10⁷ sel/ml, 10⁶ sel/ml, dan kontrol (larutan PBS pH 7,0). Titer antibodi tertinggi pada ikan yang divaksinasi dengan dosis 10⁷ sel/ml (1.706,67). Efektivitas vaksin dapat dilihat dengan tingginya nilai RPS perlakuan dosis 10⁹ sel/ml (97,22%); 10⁸ sel/ml (100%); 10⁷ sel/ml (97,22%); dan 10⁶ sel/ml (100%). Nilai RWK kontrol adalah 1 hari dengan kematian sebanyak 97,43%, sedangkan pada perlakuan vaksin dosis 10⁷ sel/ml, nilai RWK ulangan ada yang 1 hari, tetapi hanya 1 ekor ikan yang mati. Kualitas air selama penelitian masih mendukung untuk kehidupan ikan dan bukan penyebab kematian ikan selama ujiantang.

Kata Kunci : *Aeromonas hydrophila*, dosis, *Pangasius hypophthalmus*, vaksin bivalen

ABSTRACT

Motile aeromonas septicemia/MAS diseases due to *Aeromonas hydrophila* infection is an obstacle in cultivation of catfish (*Pangasius hypophthalmus*). MAS control can be done by administering vaccines. The purpose of this research is to get the right and effective dose of bivalent vaccine for controlling MAS at catfish. Both isolates will be used as vaccines are local strains of *A. hydrophila* CASO.01.G and SBMI.2. Both of them were isolated from disease catfish in the aquaculture ponds in Cindai Alus and Sungai Batang villages, Banjar Regency, South Kalimantan. Vaccines are made by heating (*heat killed*) at 100°C for 60 minutes. A total of 13 test catfish measuring 9-13 cm were included in

each aquarium. The design used was a completely randomized design with 5 treatments and 3 replications, namely bivalent vaccine with a dose of 10^9 cells/ml, 10^8 cells/ml, 10^7 cells/ml, 10^6 cells/ml, and control (PBS solution pH 7.0). The highest antibody titers in treatments vaccinated fish at a dose of 10^7 cells / ml (1,706.67). The effectiveness of the vaccine can be seen by the high RPS value of the treatment dose 10^9 cells/ml (97.22%); 10^8 cells/ml (100%); 10^7 cells/ml (97.22%); and 10^6 cells/ml (100%). The control MTD value was 1 day with 97.43% mortality, while in the vaccine treatment with dose of 10^7 cells/ml, there was a MTD repeat value for 1 day, but only 1 fish died. Water quality of this research are supportive and not a cause of fish death during the challenge test.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, bivalent vaccine, dose, *Pangasius hypophthalmus*

PENDAHULUAN

Ikan patin (*Pangasius hypophthalmus*) adalah salah satu produksi ikan air tawar yang banyak digemari oleh masyarakat Indonesia, saat ini sistem pembudidayaan telah berkembang menjadi budidaya intensif, karena meningkatnya permintaan konsumen (Fariedah *et al.* 2018). Hal ini dapat meningkatkan resiko wabah penyakit pada ikan. Penyakit yang disebabkan oleh bakteri merupakan salah satu kendala dalam budidaya ikan patin, karena dapat menyebabkan kematian massal dan merusak kualitas ikan. Bakteri yang sering menyerang ikan patin diantaranya *A. hydrophila* (Quswa *et al.* 2016).

Penanggulangan dengan berbagai cara terhadap bakteri sudah diterapkan oleh pembudidaya ikan termasuk perbaikan pengelolaan dan penggunaan obat-obatan, tetapi hasilnya kurang maksimal. Peningkatan kekebalan melalui vaksinasi merupakan alternatif untuk penanggulangan penyakit yang lebih aman (Ellis 1988). Vaksinasi memberikan solusi yang efektif namun murah untuk memerangi resiko penyakit dalam budidaya ikan. Rezim vaksinasi yang tepat untuk mencegah penyakit bakteri memberikan solusi terhadap efek bahaya dari aplikasi antibiotik (Mohd-Aris *et al.* 2019)

Strategi vaksinasi yang diperlukan harus memenuhi kriteria berikut ini, seperti penyakit spesifik yang akan memapar, jenis vaksin, metode vaksinasi, pemilihan waktu vaksinasi dan perlakuan vaksinasi ulangan (*booster*) (Sugiani *et al.* 2015). Ciri khas vaksinasi adalah mengandung zat yang berfungsi sebagai antigen, yang merangsang sistem imun adaptif apabila terpapar antigen patogen, sehingga dalam paparan berikutnya sistem kekebalan akan meningkatkan respon perlindungan yang cepat terhadap patogen yang sama (Ma *et al.* 2019). Vaksinasi ikan umumnya dilakukan untuk meningkatkan daya tahan tubuh ikan terhadap penyakit tertentu. Akan tetapi sejalan dengan perkembangan vaksin, mulai dikembangkan vaksin bivalen yang diharapkan mampu melindungi ikan secara serempak terhadap infeksi dua strain bakteri patogen, karena vaksin ini mengandung dua jenis patogen tertentu. Menurut Toranzo *et al.* (2009) Vaksin bivalen harus mampu memberi perlindungan terhadap semua serotipe dari setiap patogen yang menyebabkan penyakit tertentu.

Beberapa penelitian vaksin bivalen pada ikan menunjukkan hasil yang bervariasi, dan memberikan perlindungan yang baik pada ikan. Nugrahawati *et al.* (2019) menyatakan bahwa vaksin bivalen mampu melawan *black body syndrome* (BBS) pada kakap putih (*Lates calcarifer*) menunjukkan nilai *relative percent survival* (RPS) 80,00%, selanjutnya Mahardika *et al.* (2018) menyatakan vaksin

bivalen pada juvenil kerapu sunu dapat mencegah infeksi virus dan bakteri, yang dibuktikan dari nilai RPS sebesar 71,5%. Menurut Sugiani *et al.* (2015) vaksin bivalen *A. hydrophila* dan *Mycobacterium fortuitum* melalui injeksi dapat mencegah penyakit pada gurami (*Osphronemus goramy*), memberikan nilai RPS 100% setelah ditantang dengan *A. hydrophila* dan 56,7 % ketika ditantang secara koinfeksi. Sedangkan vaksin monovalen *A. hydrophila* maupun *S. agalactiae* hanya mampu memproteksi terhadap bakteri homolog, dan tidak ada perlindungan silang diantara keduanya.

Bakteri *A. hydrophila* mempunyai banyak strain. Strain-strain inilah yang mempengaruhi tingkat patogenisitas pada inang dan terkadang tidak mengenali strain lainnya. Dengan demikian, perlu dibuat vaksin bivalen dengan menggabungkan 2 strain yang berbeda (Mulia *et al.* 2015). Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan dosis vaksin bivalen *A. hydrophila* yang tepat dan mengetahui efektivitasnya untuk pengendalian MAS pada benih ikan patin siam.

METODE PENELITIAN

Ikan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah ikan patin siam yang berukuran panjang 9-13 cm. Ikan patin siam diperoleh dari kolam pembesaran di Desa Cindai Alus Kabupaten Banjar. Ikan dipelihara di dalam akuarium berukuran 50x20x20 cm dengan kepadatan 13 ekor/ akuarium.

Peningkatan Virulensi Isolat *A. hydrophila* CASO.01.G dan SBMI. 2

Isolat bakteri yang dipergunakan untuk membuat vaksin adalah bakteri *A. hydrophila* CASO.01.G dan SBMI. 2 yang merupakan isolat lokal hasil isolasi dari ikan patin siam yang diperoleh dari desa Cindai Alus dan Sungai Batang Kabupaten Banjar Kalimantan Selatan.

Isolat strain CASO.01.G dan SBMI.2 ditingkatkan virulensinya dengan penyuntikkan secara intramuskular suspensi bakteri dengan kepadatan 10^9 sel/ml pada 5 ekor ikan patin siam berukuran panjang 9-13 cm. Bakteri diisolasi dari ikan uji yang telah diinfeksi, kemudian dikultur di medium selektif *Aeromonas Pseudomonas* (GSP agar; Merck), selanjutnya satu koloni yang berwarna kuning dikultur ke medium agar cair *Tryptone Soya Agar* (TSA; Merck) sebagai media kultur awal bakteri dan diinkubasi pada suhu kamar selama 18-24 jam, kemudian diinfeksi lagi ke ikan sehat. Setiap ada kematian ikan, dosis untuk reinfeksi semakin diturunkan dan dilihat gejala dan waktu kematian.

Pembuatan vaksin

Vaksin dibuat mengacu metode Mulia *et al.* (2012) dengan cara antigen bakteri *A. hydrophila* dibuat dengan cara mengkultur bakteri medium *Tryptone Soy Broth* (TSB; Merck) dengan volume 10 ml selama 18-24 jam. Suspensi bakteri yang tumbuh dalam medium TSB dikultur ke dalam media TSA pada cawan petri besar dan diinkubasi kembali selama 18-24 jam. Kultur dipanen dan diinaktivasi dengan pemanasan (*heat killed*) 100 °C selama 1 jam menggunakan waterbath. Disentrifuge dengan kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit dan dicuci dengan larutan *Phosphate Buffered Saline* (PBS) pH 7,0 sebanyak 3 kali.

Selanjutnya dilakukan uji viabilitas untuk mengetahui apakah bakteri yang telah dinaktifkan masih aktif atau tidak.

Vaksinasi

Vaksinasi dilakukan dengan menyuntikkan ikan uji secara intramuskular dengan dosis 0,1 sel/ml/ekor sesuai dosis perlakuan. Kontrol disuntik larutan PBS pH 7,0 steril sebanyak 0,1 ml/ekor. Seminggu kemudian dilakukan vaksin *booster* dengan dosis yang sama seperti yang diberikan pada vaksin awal. Pada minggu ke-0,1,2,3, dan 4 dilakukan pengambilan darah ikan untuk uji titer antibodi. Pengukuran titer antibodi dilakukan mengacu pada metode Anderson (1974). Uji tantang dilakukan dua minggu setelah vaksinasi. Kepadatan bakteri tantang berdasarkan hasil LD₅₀, setelah uji tantang ikan dipelihara selama 14 hari untuk mengamati sintasan, RPS dan rerata waktu kematian. Ikan diberi pakan buatan berupa pelet komersial secara terus menerus sampai ikan tidak mau makan lagi (*ad libitum*) selama penelitian.

Parameter dan Analisis Data

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental. Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 3 ulangan. Perlakuan tersebut adalah pemberian vaksin bivalen *A. hydrophila* dengan dosis 10⁹ sel/ml, 10⁸ sel/ml, 10⁷ sel/ml, 10⁶ sel/ml dan kontrol PBS pH 7,0.

Parameter yang diamati meliputi titer antibodi, *relative percent survival* (RPS), sintasan, rerata waktu kematian (RWK) dan mortalitas. Pengamatan titer antibodi mikrotiter, diamati sebanyak 5 kali. Adapun data, RPS dan RWK diamati setelah uji tantang. Rumus yang digunakan untuk perhitungan adalah:

Tingkat Perlindungan Relatif (*Relative Percent Survival / RPS*) (Johnson *et al.* 1982) dihitung sebagai berikut:

$$RPS = \left(1 - \frac{\% \text{ mortalitas ikan yang divaksin}}{\% \text{ Mortalitas ikan yang tidak divaksin}} \right) \times 100\%$$

Rerata waktu kematian (RWK) /Mean to death (MTD) dihitung mengacu dalam Olga (2012) sebagai berikut:

$$MTD = \frac{\sum_{i=1}^n aibi}{\sum_{i=1}^n bi}$$

Keterangan:
a = waktu kematian (hari)
b = jumlah ikan yang mati (ekor)

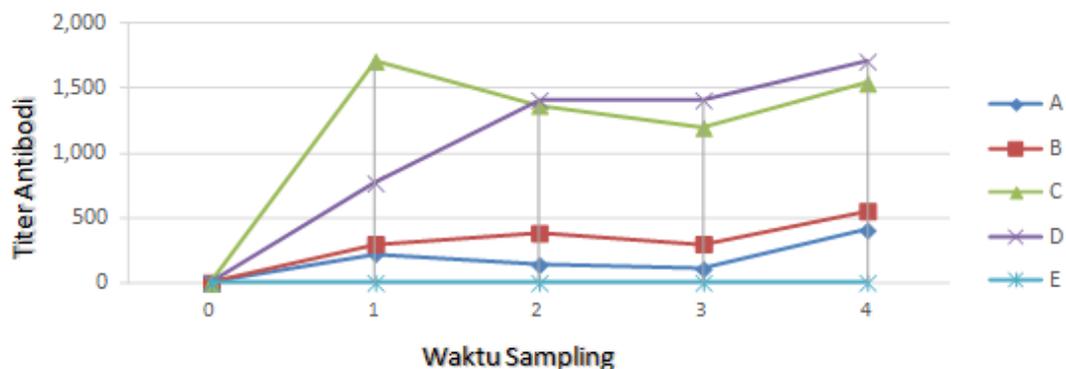
Parameter penunjang lainnya yang diamati adalah kualitas air (DO, CO₂, NH₃, pH dan suhu) dilakukan pada awal perlakuan (vaksinasi awal), vaksinasi *booster*, uji tantang pertama, dan akhir penelitian (setelah uji tantang).

Titer antibodi diamati dengan metode deskriptif dan kuantitatif. Data yang terkumpul dari uji titer antibodi ditransformasikan ke dalam bentuk logaritma (data log 2), kemudian dianalisis dengan analisis sidik ragam (ANOVA). Data lainnya yang diperoleh setelah uji tantang seperti sintasan, RPS dan RWK juga dianalisis dengan ANOVA. Apabila berbeda nyata akan dilanjutkan dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf uji 5 % dan 1 %.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Titer Antibodi

Titer antibodi sebelum vaksinasi menunjukkan bahwa kekebalan spesifik pada patin siam belum terbentuk titer antibodi yang ditunjukkan nilai sebesar 1. Satu minggu setelah vaksinasi, rerata titer antibodi ikan perlakuan dosis vaksin meningkat, yaitu 10^9 sel/ml (224,00); 10^8 sel/ml (298,67); 10^7 sel/ml (1.706,67); 10^6 sel/ml (460,80), dan kontrol sebesar 1. Minggu kedua setelah setelah vaksinasi *booster*, rerata titer antibodi ikan uji yang divaksin dengan dosis 10^6 sel/ml (1.408,00), 10^7 sel/ml (1.365,33) diikuti 10^8 sel/ml (384,00) dan 10^9 sel/ml (138,67), sedangkan pada kontrol adalah 1,00. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan vaksinasi menggunakan Ag O dari strain yang berbeda mampu memproduksi titer antibodi. Pada minggu pertama pasca vaksinasi, titer antibodi ikan mulai meningkat, selanjutnya semakin meningkat pada minggu berikutnya. Dengan demikian vaksin bivalen bakteri *A. hydrophila* dapat memberikan imunogenisitas secara signifikan pada benih patin siam. Kemampuan ikan dalam memproduksi titer antibodi pada masing-masing perlakuan menunjukkan hasil yang berbeda terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Produksi titer antibodi benih patin siam selama penelitian. Axis x menunjukkan waktu sampling sebelum vaksinasi (x=0), vaksinasi *booster* (x = 1), ujiantang pertama (x=2), ujiantang kedua (x=3), dan panen (x=4). Axis y menunjukkan data statistik titer antibodi.

Minggu ketiga (seminggu setelah vaksinasi *booster*), terjadi peningkatan yang sangat pesat pada titer antibodi ikan. Rerata titer antibodi tertinggi terlihat pada 10^6 sel/ml (1.408,00), diikuti 10^7 sel/ml (1.194,67); 10^8 sel/ml (298,6); dan 10^9 sel/ml (106,67), sedangkan pada kontrol mengalami peningkatan, yaitu sebesar 2,00. Hasil ANOVA perlakuan tidak berbeda nyata ($P > 0,05$). Minggu keempat (sebelum ujiantang) rerata titer antibodi tertinggi terlihat pada 10^7 sel/ml (1.706,67); diikuti 10^6 sel/ml (1.536,00); 10^8 sel/ml (554,67); 10^9 sel/ml (405,33); dan kontrol sebesar 1,67. Hasil ANOVA berbeda nyata ($P < 0,1$), dimana rerata produksi titer antibodi antara perlakuan ikan yang divaksin (perlakuan A, B, C dan D) dengan kontrol berbeda nyata. Menurut Mulia (2012) booster dapat memicu peningkatan antibodi, meningkatnya titer antibodi terjadi dikarenakan ikan uji telah memiliki memori imunitas, sehingga dengan *booster* atau vaksinasi ulangan dapat menghasilkan respon imun yang lebih tinggi. Wintoko *et al.* (2013) pemberian vaksin, secara tidak langsung dapat meningkatkan respon imun alami

yang ditandai dengan peningkatan sel fagosit berupa monosit dan limfosit. Sel-sel fagosit tersebut memiliki hubungan korelasi terhadap uji titer antibodi yang telah dilakukan, yaitu sel fagosit berfungsi sebagai pengenalan antigen atau vaksin yang diberikan pada tubuh ikan. Dengan demikian sel fagosit, yaitu limfosit dapat mengenali antigen, dan dapat merangsang sel memori, dan sel B untuk menghasilkan antibodi, yang peningkatannya terlihat pada reaksi agglutinasi dengan uji titer antibodi. Antibodi tidak saja meningkatkan pertahanan humoral tetapi juga pertahanan seluler sehingga hasil kerja masing-masing maupun hasil kerja antara pertahanan humoral dan seluler meningkat.

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Mulia *et al.* (2016) yang menyatakan bahwa vaksin *heat killed A. hydrophila* dapat meningkatkan titer antibodi pada ikan lele hingga mencapai 512, sedangkan pada kontrol mencapai 5,03. Selanjutnya, menurut Mulia *et al.* (2015) potensi imunogenisitas bakteri *A. hydrophila* strain GPL-05 dan GL-02 sebagai kandidat vaksin menghasilkan rata-rata titer antibodi yang sama, yaitu sebesar 841,62, sedangkan kontrol 6,41. Rata-rata titer antibodi pada penelitian ini mengalami peningkatan, titer antibodi tertinggi dihasilkan pada dosis 10^6 sel/ml. Menurut Bellanti (1993) dosis vaksin dapat mengubah imunogenisitas dan ada dosis tertentu dari suatu antigen yang dapat menimbulkan respon antibodi maksimal. Taukhit *et al.* (2014) tingginya nilai titer antibodi tidak sepenuhnya menggambarkan level proteksi mutlak terhadap patogen target, tetapi secara umum dapat dinyatakan bahwa semakin tinggi nilai nilai titer antibodi mengindikasikan adanya pembentukan respon tanggap kebal yang berkorelasi positif dengan kemampuan menangkal infeksi patogen target.

Relative Percent Survival (RPS) dan Sintasan

Tingginya sintasan pada perlakuan ikan bervaksin yang disajikan pada Tabel 1, membuktikan bahwa ketika terjadi serangan MAS, ikan yang divaksinasi lebih mampu untuk bertahan hidup dibandingkan ikan yang tidak divaksinasi. Sedangkan nilai tingkat perlindungan relatif (RPS) benih patin siam dalam penelitian ini berkisar antara 97,22 - 100 % (Tabel 1). Berdasarkan ANOVA rerata nilai RPS antara perlakuan berbeda sangat nyata. Menurut Olga dan Aisiah (2007), hal ini kemungkinan disebabkan setiap individu ikan dalam ulangan perlakuan mempunyai tingkat respon imun yang berbeda dalam menanggapi serangan bakteri *A. hydrophila* pada saat ujiantang. Banyak penelitian vaksin bivalen telah dilakukan pada jenis ikan yang berbeda dan kombinasi bakteri yang berbeda pula. Diantaranya Bastardo *et al.* (2012) menyatakan bahwa vaksin bivalen efektif terhadap infeksi *A. hydrophila* dan *Lactococcus garvieae* pada rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) menghasilkan nilai RPS 95,3 %. Hasil penelitian Sugiani *et al.* (2015) vaksin bivalen *A. hydrophila* dan *Mycobacterium fortuitum* menghasilkan nilai RPS 56,33% pada ikan gurami (*Osphronemus goramy*).

Nilai RPS dalam penelitian ini berkisar antara 97,22–100%. Hal ini menunjukkan bahwa vaksin bivalen yang dibuat dengan cara pemanasan (*heat killed*) efektif dalam melindungi ikan selama ujiantang. Menurut Kementerian Kelautan dan Perikanan persyaratan untuk produksi vaksin ikan yang dapat dikatakan baik dan dapat diedarkan ke pembudidaya harus memiliki RPS > 50%

(Sugiani *et al.* 2018). Dengan demikian vaksin bivalen dalam penelitian ini layak untuk digunakan.

Tabel 1. Rerata RPS benih patin siam setelah uji tantang dengan bakteri *A. hydrophila*.

Perlakuan Dosis	Sintasan (%)	Relative Percent Survival (%)
10 ⁹ sel/ml	97,43 ^b	97,22 ^b
10 ⁸ sel/ml	100 ^a	100 ^a
10 ⁷ sel/ml	97,43 ^b	97,22 ^b
10 ⁶ sel/ml	100 ^a	100 ^a
Kontrol	2,57 ^c	

Keterangan : Rerata dalam satu kolom yang diikuti dengan huruf *superscript* yang sama tidak berbeda nyata (P>0,01)

Dosis 10⁸ sel/ml dan dosis 10⁶ sel/ml memiliki sintasan 100 %, sedangkan dosis 10⁹ sel/ml dan dosis 10⁷ sel/ml memiliki sintasan 97,43%, hal ini disebabkan karena pemberian dosis vaksinasi dapat meningkatkan level ketahanan tubuh ikan dalam pembentukan antibodi lebih tahan terhadap serangan bakteri *A. hydrophila* pada benih ikan patin siam. Menurut Anderson (1992) faktor immunosupresi adalah salah satu yang mempengaruhi respon kekebalan non spesifik dan spesifik. Immunosupresi disebabkan oleh dosis yang terlalu rendah atau tinggi, sehingga tubuh ikan tidak mampu merespon rangsangan antigenik yang masuk ke dalam tubuh ikan. Menurut Tatang (2014) respon kekebalan spesifik akan mulai muncul jika ikan mampu bertahan hidup. Selanjutnya akan terbentuk antibodi spesifik terhadap agen infeksi pada level titer protektif dan terbentuk pula sel-sel memori. Pada saat terjadinya reinfeksi oleh agen penyakit sejenis, maka ikan tersebut akan mampu menahan infeksi karena respon kekebalan sekunder akan terjadi.

Rerata Waktu Kematian (RWK) dan Mortalitas

Berdasarkan hasil penelitian, salah satu ulangan dalam perlakuan ikan yang divaksin dosis 10⁹ sel/ml ada yang mati pada hari kedua sebanyak 1 ekor, sehingga memberikan nilai RWK selama 2 hari, sedangkan ulangan lainnya dan perlakuan dosis 10⁸ sel/ml, serta 10⁶ sel/ml tidak ada yang mati. Selanjutnya ada nilai RWK satu ulangan perlakuan dosis 10⁷ sel/ml sama dengan nilai RWK pada seluruh perlakuan kontrol, selama 1 hari. Adanya persamaan nilai RWK ikan yang divaksin dengan dosis 10⁷ sel/ml dengan perlakuan kontrol, karena ikan di kedua perlakuan tersebut mati di hari yang sama. Meskipun demikian, ikan yang mati dalam ulangan perlakuan dosis 10⁷ sel/ml hanya 1 ekor di hari pertama setelah uji tantang, sedangkan pada kontrol 97,43% ikan mati pada hari pertama.

Data mortalitas yang disajikan di Tabel 2 menunjukkan bahwa 97,43% ikan patin siam perlakuan kontrol mati setelah diuji tantang, sedangkan patin siam pada perlakuan dosis vaksin menunjukkan mortalitas yang relatif sangat rendah dibandingkan kontrol. Banyaknya jumlah ikan perlakuan kontrol yang mati dibandingkan ikan perlakuan vaksin, karena ikan-ikan tidak memiliki sel memori yang mampu mengenali paparan antigen spesifik yang masuk ke dalam tubuh. Selanjutnya, adanya ikan perlakuan vaksin yang mati menunjukkan bahwa adanya respon imun yang berbeda setiap ikan dalam menanggapi tantangan. Diduga

respon imun ikan yang mati rendah dan ada faktor lain yang mungkin terjadi pada saat penanganan, sehingga ikan pada perlakuan dosis 10^7 sel/ml mati.

Nilai RWK pada penelitian ini lebih rendah dari penelitian Olga dan Rini (2006) yang menyatakan bahwa nilai RWK jambal siam yang divaksinasi dengan sel utuh *A. hydrophila* berkisar antara 2,56-2,72 hari. Selanjutnya Olga *et al.* (2007) yang memberikan vaksin protein *A. hydrophila* dengan dosis yang berbeda, dalam penelitian tersebut nilai RWK ikan jambal siam bervaksin berkisar antara 2,19-3,50 hari, sedangkan pada kontrol 1,23 hari. Kamiso dan Triyanto (1992) mengungkapkan bahwa vaksinasi hanya melindungi ikan dari serangan bakteri spesifik. Jika ikan bervaksin dapat diserang, berarti perlakuan vaksinasi tidak berdampak nyata terhadap perkembangan penyakit, sehingga rerata waktu kematiannya tidak berbeda dengan ikan yang tidak bervaksin.

Tabel 2. Rerata Waktu Kematian dan Mortalitas benih patin siam setelah uji tantang dengan bakteri *A. hydrophila*.

Perlakuan Dosis	Rerata Waktu Kematian (hari)			Rerata (hari)	Mortalitas
	Ulangan				
	1	2	3		
10^9 sel/ml	0	2	0	0,67 ^a	2,57
10^8 sel/ml	0	0	0	0 ^a	0
10^7 sel/ml	1	0	0	0,33 ^a	2,57
10^6 sel/ml	0	0	0	0 ^a	0
Kontrol	1	1	1	1 ^b	97,43

Keterangan : Rerata dalam satu kolom yang diikuti dengan huruf *superscript* yang sama tidak berbeda nyata ($P>0,01$)

Menurut Munang'andu *et al.* (2013) perbedaan utama antara ikan yang divaksinasi dan ikan kontrol adalah bahwa pada ikan yang divaksinasi sudah muncul antibodi sebagai respon terhadap vaksinasi dari vaksin *inactive* sebelum ikan diuji tantang, sedangkan pada ikan kontrol, respon muncul terhadap bakteri setelah ditantang. Oleh karena itu, umumnya ikan kontrol tidak dapat bertahan pasca diuji tantang. Peningkatan kadar antibodi ini berhubungan dengan penurunan tingkat infeksi secara keseluruhan. Sebaliknya, pada ikan yang divaksinasi, antibodi dapat melindungi pasca diuji tantang. Peningkatan kadar antibodi ini berhubungan dengan penurunan tingkat infeksi secara keseluruhan.

Kualitas Air

Hasil pengamatan kualitas air selama penelitian menunjukkan bahwa kadar oksigen terlarut (DO) berkisar 3,58-7 ppm, suhu udara 26-31 °C, suhu air 25,5-29 °C, CO₂ bebas 2,6-2,75 ppm, NH₃-N 0,14-0,17 ppm, dan pH 5,73-5,75. Selama masa penelitian, kadar oksigen terlarut (DO) berkisar 3,58-7 ppm masih sesuai SNI 01-6483.5-2002. Wangni *et al.* (2019) mengungkapkan standar produksi ikan patin siam, suhu udara 26-31 °C, suhu air 25,5-29 °C, Kisaran suhu yang optimal untuk benih ikan patin berdasarkan SNI 01-6483.4-2000 yaitu 27-30°C. CO₂ bebas 2,6-2,75 ppm, NH₃-N 0,14-0,17 ppm, dan pH 5,73-5,75 Nilai pH yang optimal untuk pertumbuhan benih ikan patin siam berdasarkan SNI 01-6483.4-2000, yaitu 6,5-8,5. Secara keseluruhan nilai kisaran kualitas air masih

mendukung untuk kehidupan benih patin siam dan bukan penyebab kematian ikan uji selama penelitian

KESIMPULAN

Vaksin bivalen *A. hydrophila* dengan dosis 10^9 sel/ml, dosis 10^8 sel/ml, dosis 10^7 sel/ml, dan dosis 10^6 sel/ml dapat digunakan sebagai vaksin untuk mengendalikan MAS. Dosis 10^6 sel/ml merupakan dosis efektif karena imunogenisitasnya setara dengan 10^9 sel/ml dan dapat menimbulkan respon imun yang baik.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Alm Dr. Ir. Muhammad, MP atas bimbingan yang sangat besar selama proses penelitian dan penulisan sampai akhir hayat beliau. Ucapan terimakasih juga kepada ibu Olga, S.Pi, M.Si yang telah memfasilitasi penelitian dan membimbing tanpa pamrih serta meluangkan waktu dan pikirannya selama penelitian dan penulisan sampai selesai.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson DP. 1974. *Fish Immunology*. In S.F. Snieszko, H.R Axelrod (ED). Disease of Fishes. TFH publication Ltd., Hongkong.
- Anderson DP. 1992. *Immunostimulans, Adjuvants, and Vaccine Corries in Fish Application to Aquaculture*. U.S. Fish and Wildlife Service Kearneysville, West Virginia, USA
- Bastardo A, Ravelo C, Castro N, Calheiros J, Romalde JL. 2012. Effectiveness of Bivalent Vaccines Against *Aeromonas hydrophila* and *Lactococcus garvieae* Infections in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Fish & Shellfish Immunology* 32(5):756-761. DOI: 10.1016/j.fsi.2012.01.028
- Bellanti JA. 1993. *Imunologi III*. 486. diterjemahkan oleh Wahab JA. Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Gadjah Mada University. Yogyakarta.
- Biller-Takahashi JD, Urbinati EC. 2014. *Fish Immunology. The Modification and Manipulation of The Innate Immune System: Brazilian Studies. Anais Da Academia Brasileira de Ciencias* 86(3):484-1506. DOI :10.1590/0001-3765201420130159
- Ellis AE. 1988. *General Principles of Fish Vaccination*. In: *Fish vaccination*. A. E. Ellis (ed). Academic Press. London. Page 32-45
- Fariedah F, Inalya I, Rani Y, A'yunin Q, Evi T. 2018. Penggunaan Tanah Liat untuk Keberhasilan Pemijahan Ikan Patin Siam (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan* 10(2):91-94. <http://dx.doi.org/10.20473/jipk.v10i2.10301>

- Johnson KA, Flynn JK, Amend DF. 1982. Onset of Immunity in Salmonid Fry Vaccinated by Direct Immersion in *Vibrio Anguillarum* and *Yersinia Ruckeri* Bacterins. *Journal Fish Diseases* 5(3):197-205. DOI:10.1111/j.1365-2761.1982.tb00474.x
- Kamiso HN, Triyanto. 1992. Vaksinasi Monovalen dan Polivalen Vaksin untuk Mengatasi Serangan *Aeromonas hydrophilla* pada Ikan Lele (*Clariassp*). *Jurnal Ilmu Pertanian (Agriculture Science)*. 4(8):447–464.
- Ma J, Bruce TJ, Jones EM, Cain KD. 2019. A Review of Fish Vaccine Development Strategies: Conventional Methods and Modern Biotechnological Approaches. *Microorganisms* 7(11):569-586. DOI:10.3390/microorganisms7110569.
- Mahardika K, Mastuti I. 2018. Aplikasi Vaksin Bivalen (Vaksin Rekombinan Protein VNN dan GSDIV) pada Juvenil Kerapu Sunu *Plectropomus leopardus* untuk Pencegahan Infeksi Virus dan Bakteri. *Prosiding Seminar Nasional Kelautan XIII, Fakultas Teknik dan Ilmu Kelautan Universitas Hang Tuah, Page C1.81-89*.
- Mohd-Aris A, Muhamad-Sofie MHN, Zamri SM, Daud HM, Ina-Salwany MdY. 2019. Live Vaccines Against Bacterial Fish Diseases: A review, *Veterinary World* 12 (11) : 1806 - 1815. DOI : www.doi.org/10.14202/vetworld.2019.18006-1815.
- Mulia DS. 2007. Keefektifan Vaksin *Aeromonas hydrophila* untuk Mengendalikan Penyakit MAS (*Motile Aeromonas Septicemia*) pada Gurami (*Osphronemus gouramy* Lac.). *Jurnal Pembangunan Pedesaan* 7(1):43-52.
- Mulia DS, Apriyanti W, Maryanto H, Purbomartono C. 2012. Imunogenisitas Antigen Whole Cell Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Sains Akuatik* 14(1): 25-32.
- Mulia DS, Khusniah A, Maryanto H. 2015. Potential Immunogenicity of Bacteria *Aeromonas hydrophila* GPL-05 and GL-02 Strain as a Candidate Vaccine. *Aquasains (Jurnal Ilmu Perikanan dan Sumberdaya Perairan)* 4(1):335-345.
- Mulia DS, Windarti C, Maryanto H. 2016. Imunogenisitas *Heat Killed Aeromonas hydrophila* Strain GB-01, GPd-02, dan GPI-05 sebagai Kandidat Vaksin. *Techno* 17(2):94-100. DOI: 10.30595/techno.v17i2.1176
- Munang'andu HM, Fredriksen BN, Mutoloki S, Dalmo RA, Evensen O. 2013. Antigen Dose and Humoral Immune Response Correspond with Protection for Inactivated Infectious Pancreatic Necrosis Virus Vaccines in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L). *Veterinary Research* 44(1):7-22. DOI:10.1186/1297-9716-44-7.
- Nugrahawati A, Nurhayati S, Sukenda, Rahman, Brite M, Aditya TW. 2019. Efficacy of Bivalent Vaccine Against *Black body syndrome* (BBS) of Barramundi *Lates calcalifer* B. *Jurnal Akuakultur Indonesia* 18(2):172-181. <http://biofisika.journal.ipb.ac.id/index.php/jai/article/viewFile/87187/17861>. DOI: <https://doi.org/10.19027/jai.18.2.172-181>

- Olga. 2012. Patogenisitas Bakteri *Aeromonas hydrophila* ASB01 pada Ikan Gabus (*Ophiocephalus striatus*). *Sains Akuatik* 14 (1):33-39.
- Olga, Rini RK. 2006. Penggunaan Vaksin Whole Cell untuk Pengendalian Penyakit MAS (*Motile Aeromonas Septicemia*) pada Ikan Patin (*Pangasius hypophthalmus*). *Agroscentiae* 13(1):48-54
- Olga, Aisiah S. 2007. Vaksin Protein Produk Ekstraseluler *Aeromonas hydrophila* untuk Meningkatkan Tanggap Kebal (*Pangasius hypophthalmus*) Terhadap *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS). *Sains Akuatik* 10(2): 105-110
- Olga, Rini RK, Akbar J, Isnansetyo A, Sembiring L. 2007. Protein *Aeromonas hydrophila* Sebagai Vaksin untuk Pengendalian MAS (*Motile Aeromonas Septicemia*) pada Jambal Siam (*Pangasius hypophthalmus*). *Jurnal Perikanan (J. Fish.Sci)* IX (1): 17-25. DOI:<https://doi.org/10.22146/jfs.59>.
- Quswa RGG, Sasanti AD, Yulisman. 2016. Pencegahan Infeksi *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Patin (*Pangasius sp.*) Menggunakan Tepung Paci-paci (*Leucas lavandulaefolia*). *Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia* 4(1):40-52. DOI: <https://doi.org/10.36706/jari.v4i1.4425>
- Sugiani D, Sukenda, Harris E, Lusiastuti AM. 2012. Respon Imun Ikan Tilapia, *Oreochromis niloticus*, terhadap Vaksin Bivalen Sel Utuh dan Ekstra Selular Antigen *Aeromonas hydrophila* dan *Streptococcus agalactiae*. *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur 2012*. 8-11 Juni 2012 di Hotel Arya Duta Makassar, Sulawesi. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perikanan Budidaya. hlm 755–763.
- Sugiani D, Aryati Y, Mufidah T, Purwaningsih U. 2015. Efektivitas Vaksin Bivalen *Aeromonas hydrophila* dan *Mycobacterium fortuitum* untuk Pencegahan Infeksi Penyakit pada Ikan Gurami (*Osphronemus goramy*). *J. Ris. Akuakultur* 10 (4) : 5567 – 577 ; DOI: <http://dx.doi.org/10.15578/jra.10.4.2015.567-577>
- Sugiani D, Arifin OZ, Purwaningsing U, Asependi, Wadjdy EF. 2016. Uji Aplikasi Lapangan Vaksin Bivalen HydrofortyVac dan Vaksin Monovalen (Hydrovac dan Mycofortyvac) pada Benih Ikan Gurami (*Osphronemus goramy*). *Media Akuakultur* 11(2):111-119.
- Sugiani D, Taukhid, Purwaningsing U, Lusiastuti AM. 2018. Vaksin Kering Beku Sel Utuh Bakteri *A. hydrophila* untuk Pencegahan Penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* pada ikan Lele, Nila, dan Gurami. *Jurnal Riset Akuakultur* 13(2):159-167. DOI: <http://dx.doi.org/10.15578/jra.13.2.2018.159-167>
- Tatang. 2014. Sistem Kekebalan Pada Ikan. *Fisheries Extension Worker* on Januari 27, 2014.
- Taukhid, Lusiastuti AM, Sumiartu T, Sugiani D, Puwaningsih U. 2014. Pengembangan Vaksin Bivalen untuk Pencegahan Penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) dan *Streptococcosis* pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Terbaik Tahun 2014*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kelautan dan Perikanan. Jakarta , hlm. 1-18.

- Toranzo AE, Romalde JL, Magarinos B, Barja JL. 2009. Present and Future of Aquaculture Vaccines Against Fish Bacterial Diseases. The Use of Veterinary Drugs and Vaccines in Mediterranean Aquaculture. *Options Mediterraneennes A* 86:155-176.
- Wangni GP, Sugeng P, Sumantriyadi. 2019. Kelangsungan Hidup dan Pertumbuhan Benih Ikan Patin Siam (*Pangasius hypophthalmus*) pada Suhu Media Pemeliharaan Yang Berbeda. *Jurnal Ilmu-ilmu Perikanan dan Budidaya Perairan* 14 : 21 - 28.
DOI: <http://dx.doi.org/10.31851/jipbp.v14i2.3487>
- Wintoko F, Setyawan A, Hudaidah S, Mahrus A. 2013. Imunogenisitas Heat Killed Vaksin Inaktif *Aeromonas salmonicida* pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *e-Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan II*:205-210.