

PENAPISAN ISOLAT BAKTERI *Streptococcus* spp. SEBAGAI KANDIDAT ANTIGEN DALAM PEMBUATAN VAKSIN, SERTA EFIKASINYA UNTUK PENCEGAHAN PENYAKIT STREPTOCOCCOSIS PADA IKAN NILA, *Oreochromis niloticus*

Taukhid dan Uni Purwaningsih

Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar

Jl. Sempur No. 1, Bogor 16154

E-mail: taukhid_as@yahoo.co.id

(Naskah diterima: 22 Agustus 2010; Disetujui publikasi: 21 Maret 2011)

ABSTRAK

Riset dengan tujuan untuk memperoleh isolat kandidat yang imunogenik bagi pembuatan vaksin untuk pengendalian penyakit streptococcosis pada ikan nila telah dilakukan. Karakterisasi dilakukan secara biokimia dan API 20 STREP terhadap 15 isolat bakteri *Streptococcus* spp. Uji Koch's Postulate kemudian dilakukan untuk mengetahui peran bakteri pada infeksi streptococcosis pada ikan nila. Konfirmasi taksonomis hingga level spesies isolat bakteri *S. agalactiae* dilakukan dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan primer spesifik. Uji patogenisitas dilakukan terhadap 6 isolat yang terdiri atas 5 isolat *S. agalactiae* (N3M, N4M, N14G, N17O, NK1) dan 1 isolat *S. iniae* (N2O). Hasil penapisan menunjukkan bahwa bakteri *S. agalactiae* (N4M) memiliki nilai LD₅₀ terkecil, dan nilai terbesar dimiliki oleh bakteri *S. iniae* (N2O). Isolat bakteri N4M digunakan sebagai sumber antigen dalam pembuatan vaksin anti streptococcosis. Vaksin disiapkan dalam bentuk sel utuh dan diinaktivasi dengan formalin, pemanasan, dan sonikasi. Nilai titer antibodi dan sintasan tertinggi diperoleh pada kelompok ikan yang divaksin dengan *formalin killed vaccine* dibandingkan dengan teknik inaktivasi lainnya (*heat killed vaccine* dan *sonicated vaccine*).

KATA KUNCI: penapisan, streptococcosis, vaksin, ikan nila

ABSTRACT: *Screening of Streptococcus spp. isolates as an antigen candidate in vaccine development, and its efficacy to prevent streptococcosis on tilapia, Oreochromis niloticus. By: Taukhid and Uni Purwaningsih*

The research with the aim to find an immunogenic isolate candidate for vaccine development to prevent streptococcosis on tilapia has been carried out at laboratory scale. Characterization was done using biochemical characterization and API 20 Strep system on 15 Streptococcus spp. bacterial. It was followed by Koch's Postulate to know the role of bacterial isolates in streptococcosis infection in tilapia. Taxonomic confirmation to species level of the bacteria was conducted using Polymerase Chain Reaction (PCR) technique with specific primer set. The pathogenicity test of six selected bacterial isolates consisted of five Streptococcus agalactiae isolates (N3M, N4M, N14G, N17O, NK1), and one isolate of S. iniae (N2O) was artificially done by infecting the isolates into the tilapia population. The whole cell vaccine was prepared in liquid broth medium, and inactivated by formalin killed, heat killed, and sonicated killed. The results of the screening revealed that S. agalactiae (N4M) has the lowest LD₅₀ level, and the highest was S. iniae (N2O). Based on the screening protocol, the N4M

was used as an antigen source in vaccine development, and its efficacy was evaluated accordingly. The highest titre antibody level and survival rate of vaccinated fish was attained from formalin killed vaccine compared to the others (heat killed and sonicated vaccine).

KEYWORDS: *screening, streptococcosis, vaccine, tilapia, Oreochromis niloticus*

PENDAHULUAN

Ikan nila merupakan salah satu primadona perikanan budidaya air tawar yang diharapkan mampu meningkatkan produksi perikanan nasional, kesejahteraan masyarakat, serta konsumsi protein hewani asal ikan. Beberapa keunggulan komparatif dan kompetitif yang dimiliki ikan nila, antara lain: laju pertumbuhan yang cepat, toleran terhadap kualitas lingkungan perairan yang ekstrim, siklus reproduksi yang cepat, tekstur daging yang kompak dan berwarna putih sehingga banyak diminati pasar sebagai pemasok protein hewani asal ikan.

Program pemerintah (c.q. Kementerian Kelautan dan Perikanan) menargetkan produksi perikanan meningkat hingga 353% pada akhir tahun 2014. Realisasi dari program tersebut terutama difokuskan melalui peningkatan produksi dari sub sektor perikanan budidaya, terutama melalui program intensifikasi. Intensifikasi budidaya merupakan upaya peningkatan produksi biomassa dalam wadah dan media yang terbatas melalui penerapan kepadatan tinggi, pemberian pakan buatan, serta sistem pengelolaan budidaya yang lebih seksama, termasuk upaya pengendalian penyakit. Secara umum, program pengendalian penyakit belum diterapkan sebagai bagian yang terintegrasi dalam budidaya ikan; sehingga apabila terjadi suatu kasus penyakit lebih banyak ditanggapi dengan kepanikan dan kepasrahan. Kecenderungan global terhadap produk perikanan budidaya menuntut persyaratan 4 (empat) sehat, yaitu: (1) sehat lingkungan budidaya, (2) sehat proses produksi, (3) sehat ikan, dan (4) sehat produk. Kunci untuk dapat memenuhi keempat kondisi tersebut adalah penerapan program pengelolaan kesehatan ikan secara konsekuen, terintegrasi, dan ramah lingkungan.

Pembudidayaan ikan nila di danau, waduk, sungai, serta di kolam-kolam telah terbukti sebagai usaha ekonomi rakyat yang potensial dan terus berkembang. Intensifikasi merupakan salah satu alternatif untuk meningkatkan

produksi ikan nila secara signifikan. Namun intensifikasi akan mengakibatkan tekanan (stress) yang lebih besar terhadap komoditas ikan yang dibudidayakan, sehingga menjadi lebih rentan terhadap penyakit. Salah satu penyakit infeksius yang semakin sering terjadi pada budidaya ikan nila adalah penyakit streptococciosis yang disebabkan oleh *Streptococcus iniae* dan *S. agalactiae* (Yanong & Floyd, 2002), dan infeksi jenis bakteri tersebut dapat bersifat akut yang mengakibatkan kematian massal (>50%) dalam tempo 3-7 hari, atau kematian berpola kronik yang persisten selama beberapa minggu. Infeksi *Streptococcus* spp. pada ikan mengakibatkan penyakit yang disebut "*syndrome meningoencephalitis dan panophthalmitis*" dengan gejala umum seperti: lemah, warna gelap, hilang nafsu makan, disorientasi atau hilang keseimbangan, *uni/bilateral exophthalmia* dengan kornea mata berwarna pucat, pendarahan dan luka pada bagian eksternal. Pada organ internal menunjukkan gejala adanya *ascites*, pembengkakan limpa, ginjal, hati, dan organ dalam lainnya.

Hingga kini belum diketahui jenis bahan kimia/antibiotik yang efektif untuk mengendalikan penyakit streptococcosis pada ikan. Issue global yang sudah mulai berkembang berkenaan dengan penggunaan obat dan antibiotik pada budidaya perikanan, antara lain: (1). Pengaruh penggunaan zat aditif, antibiotik, hormon, desinfektan, dan bahan kimia lain pada proses produksi ikan terhadap lingkungan perairan, diversitas biologi (*bio-diversity*) atau keaneka ragaman hayati serta kesehatan manusia, (2). Pengaruh akumulasi/residu obat/ antibiotik pada produk perikanan (terutama *consumption products*) terhadap kesehatan konsumen, dan (3). Berkembangnya resistensi patogen terhadap obat/antibiotik, terutama akibat penggunaan satu jenis antibiotik yang dilakukan berulang-ulang dan kurang terkontrol.

Vaksinasi pada perikanan budidaya telah terbukti memberi kontribusi yang sangat signifikan terhadap peningkatan produksi

perikanan budidaya, terutama industri salmon dan *trout* di Eropa. Selain vaksin untuk kedua jenis ikan tersebut, beberapa jenis vaksin juga telah beredar secara komersial untuk ikan *channel catfish* di Amerika, kakap & kerapu di Eropa, serta *amberjack*, ekor kuning, tilapia dan Atlantic *cod*. Saat ini, sedikitnya ada 10 jenis vaksin telah dipasarkan secara umum dan diaplikasikan oleh pembudidaya ikan di Amerika, Eropa, dan Jepang. Keberhasilan program vaksinasi tersebut sangat meyakinkan, hal itu terlihat dari (1) menurunnya tingkat mortalitas ikan budidaya akibat infeksi patogen potensial, (2) menurunnya penggunaan antibiotik pada budidaya ikan, dan (3) menurunnya daya resistensi beberapa jenis patogen terhadap antibiotik.

Teknologi pengendalian penyakit ikan yang efisien, efektif, dan ramah lingkungan merupakan satu-satunya alternatif yang harus dikembangkan untuk mendukung program peningkatan produksi perikanan budidaya. Penggunaan vaksin untuk pencegahan terhadap penyakit potensial pada perikanan budidaya merupakan opsi solusi yang sangat realistis dan prospektif. Riset ini bertujuan untuk memperoleh isolat kandidat serta sediaan antigen yang memiliki potensi imunogenik bagi pembuatan vaksin untuk pengendalian penyakit streptococcosis pada ikan nila.

BAHAN DAN METODE

Ikan Uji

Ikan uji yang digunakan adalah ikan nila sebagai inang rentan (*susceptible host*) terhadap infeksi *Streptococcus* spp. dengan ukuran ± 15 gram/ekor. Ikan uji berasal dari populasi homogen dan diasumsikan "*specific pathogen free* (SPF)" terhadap patogen target berdasarkan hasil diagnosa secara bakteriologis yang dilakukan secara acak terhadap populasi tersebut sebelum proses aklimatisasi.

Pemberian pakan dilakukan secara *adlibitum* sebanyak 3 kali/hari (pagi, siang, dan sore). Jenis pakan yang digunakan adalah pakan komersial (pellet apung) dengan kadar protein kasar sebesar $\pm 20\%$.

Penapisan (*Screening*) Isolat Kandidat

Karakterisasi dan Koch's Postulate

Penapisan isolat bakteri *Streptococcus* spp. dilakukan terhadap koleksi isolat yang

tersedia di *Biological Culture Collection* (BCC) milik Laboratorium Kesehatan dan Patologi Ikan, Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar, serta isolat yang diperoleh dari kasus penyakit streptococcosis pada ikan nila di wilayah Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, Sulawesi Utara, dan Papua Barat.

Karakterisasi terhadap seluruh isolat bakteri *Streptococcus* spp. yang akan disertakan dalam proses penapisan awal dilakukan dengan metode uji biokimia yang mengacu pada metode Rancangan Standar Nasional Indonesia (RSNI) "Metode identifikasi bakteri *Streptococcus iniae* dan *S. agalactiae* pada ikan secara konvensional", API 20 STREP System, serta metode identifikasi bakteri patogen pada ikan menurut Austin & Austin (2001).

Seluruh isolat yang sudah diketahui secara definitif sebagai *Streptococcus* spp., terlebih dahulu diuji keabsahannya sebagai patogen penyebab streptococcosis sesuai kaidah Koch's Postulate: (1). Organisme/patogen harus ditemukan pada hewan yang sakit, (2). Organisme/patogen harus bisa diisolasi dari hewan yang sakit, dan dapat ditumbuhkan secara murni, (3). Penyakit harus dapat timbul kembali (*reproduced*) apabila organisme dari biakan murni diinfeksi ke hewan sehat yang rentan (*healthy susceptible host*) \approx individu SPF, dan (4). Organisme/patogen harus dapat direisolasi dari hewan yang diinfeksi secara buatan.

Masing-masing isolat ditumbuhkan pada media *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA) dan diinkubasikan pada suhu 28°C selama 24 jam. Sebanyak satu Ose koloni bakteri dilarutkan dalam 1 mL media BHIA, sehingga "diasumsikan" bahwa setiap larutan bakteri tersebut memiliki konsentrasi yang sama. Bakteri diinfeksi ke ikan uji melalui penyuntikan secara *intra peritoneal* (IP) sebanyak 0,1 mL/ekor dari stok kultur mengandung 10^8 cfu/mL. Jumlah ikan uji yang digunakan untuk masing-masing jenis isolat adalah 5 ekor.

Ikan uji yang menunjukkan tingkah laku dan gejala klinis spesifik (\approx diduga kuat akibat infeksi *Streptococcus* spp.) segera direisolasi pada media BHIA, dan karakterisasi ulang secara bakteriologis untuk memastikan bahwa isolat bakteri tersebut merupakan isolat bakteri *Streptococcus* spp. yang diinfeksi. Uji Koch's Postulate terhadap masing-masing isolat bakteri dilakukan sebanyak 2 (dua) kali dengan jumlah ikan uji dan prosedur yang sama.

Penapisan isolat kandidat

Penapisan dilakukan dengan teknik dan prosedur yang sama dalam uji Koch's Postulate. Ke-15 isolat yang sudah definitif sebagai *Streptococcus* spp. hasil reisolasi dan rekarakterisasi segera dibiakkan dalam media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam. Bakteri dari media biakan cair tersebut diencerkan 10 kali dalam media BHIB, untuk selanjutnya diinfeksi ke populasi ikan uji melalui penyuntikan IP sebanyak 0,1 mL/ekor. Sebanyak 15 ekor ikan uji digunakan untuk setiap isolat bakteri yang disertakan dalam proses penapisan ini.

Pengamatan terhadap tingkah laku, gejala klinis, dan mortalitas ikan uji dilakukan setiap hari hingga akhir proses penapisan yang ditentukan pada hari ke-14 pasca proses infeksi. Reisolasi dan rekarakterisasi dilakukan pada masing-masing kelompok terhadap minimal satu ekor ikan yang sedang sekarat (*moribund fish*). Seperti halnya pada uji Koch's Postulate, ikan yang menunjukkan tingkah laku dan gejala klinis spesifik (\approx diduga kuat akibat infeksi *Streptococcus* spp.) segera direisolasi pada media BHIA, dan karakterisasi ulang secara bakteriologis untuk memastikan bahwa isolat bakteri tersebut merupakan isolat bakteri *Streptococcus* spp. yang diinfeksi.

Proses penapisan ini digunakan untuk memilih isolat-isolat bakteri yang akan disertakan dalam proses penentuan isolat kandidat sebagai sumber antigen dalam pembuatan vaksin anti-streptococcosis. Evaluasi hasil proses penapisan dibangun berdasarkan 2 (dua) kriteria, yaitu: (1). Dalam tempo 7 (tujuh) hari pertama mengakibatkan kematian ikan uji lebih dari 75%, dan (2). Apabila lebih dari satu isolat *Streptococcus* spp. berasal dari individu ikan yang sama, maka dipilih satu isolat sebagai representasi dari individu tersebut.

Penentuan Isolat Kandidat (Uji Patogenisitas)

Penentuan isolat kandidat pada riset ini dilakukan melalui pendekatan nilai patogenisitas isolat bakteri *Streptococcus* spp. yang dihitung berdasarkan nilai dosis/konsentrasi bakteri yang mengakibatkan kematian sebanyak 50% dari total populasi selama periode tertentu (LD_{50}) dari masing-masing isolat terhadap ikan uji. Hasil evaluasi

proses penapisan, terpilih 6 (enam) isolat bakteri *Streptococcus* spp. untuk disertakan pada proses selanjutnya.

Penghitungan konsentrasi bakteri dari hasil biakan dalam media BHIB dihitung dengan teknik standar *Total Plate Count* (TPC). Penyiapan bakteri dalam proses uji tantang dilakukan dalam media BHIB, dan pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sesuai dengan perlakuan juga dilakukan dengan media BHIB steril.

Keenam isolat bakteri *Streptococcus* spp. yang disertakan pada proses uji patogenisitas adalah isolat: (1). N2O, (2). N3M, (3). N4M, (4). N14G, (5). N17O, dan (6). NK1. Uji patogenisitas dilakukan dengan infeksi buatan melalui penyuntikan secara IP sebanyak 0,1 mL/ekor dengan konsentrasi bakteri yang berbeda sebagai perlakuan, dan masing-masing kelompok perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 3 (tiga) kali. Konsentrasi bakteri yang diterapkan pada pengujian ini adalah:

- A. $1,75 \times 10^7$ cfu/ekor
- B. $1,75 \times 10^5$ cfu/ekor
- C. $1,75 \times 10^3$ cfu/ekor
- D. BHIB steril sebagai kontrol

Selama proses uji patogenisitas yang berlangsung selama 14 (empat belas) hari, ikan dipelihara dalam bak plastik yang diisi air sebanyak 80 liter, dilengkapi pengudaraan (aerasi), dan diisi ikan uji sebanyak 20 ekor/wadah. Selama proses pengujian tidak dilakukan penggantian air, dan pemberian pakan dilakukan secara *adlibitum* sebanyak 3 kali/hari (pagi, siang dan sore).

Pengamatan terhadap tingkah laku, gejala klinis dan mortalitas ikan uji dilakukan setiap hari hingga akhir proses uji patogenisitas yang ditentukan pada hari ke-14 pasca proses infeksi. Reisolasi dan rekarakterisasi dilakukan pada masing-masing kelompok terhadap minimal satu ekor ikan yang sedang sekarat (*moribund fish*).

Preparasi Vaksin

Isolat bakteri yang digunakan sebagai sumber antigen adalah bakteri *Streptococcus agalactiae* dengan kode isolat N4M. Pembiakan bakteri dilakukan dalam media cair *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) dengan prosedur standar yang dikembangkan secara internal dan divalidasi untuk memperoleh hasil yang

konsisten. Kuantifikasi untuk mengetahui konsentrasi larutan baku (*stock solution*) vaksin dilakukan melalui konversi hasil TPC.

Biakan bakteri diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam, kemudian panen bakteri diinaktivasi dengan 3 (tiga) teknik, yaitu: (1). Penggunaan larutan formalin 0,3% selama 60 menit (*formalin killed*), (2). Pemanasan pada suhu 100°C selama 60 menit (*heat killed*), dan (3). Pemecahan sel bakteri melalui proses sonikasi pada amplitud standar selama 4 x 15 detik (*sonicated killed*). Selanjutnya, larutan baku vaksin dicuci dengan larutan saline (0,85%) steril sebanyak 2 kali melalui proses sentrifugasi pada 6.000 rpm. Sediaan vaksin dalam bentuk sel utuh (*whole cell vaccine*) selanjutnya disimpan pada suhu $\pm 4^\circ\text{C}$ dan siap untuk digunakan.

Viabilitas Vaksin

Secara homogen, sebanyak 3 x 0,2 mL sediaan vaksin ditumbuhkan pada media BHIA dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 2 x 24 jam untuk mengetahui sterilitas dan viabilitas (kemampuan untuk tumbuh dan berkembang) bakteri yang digunakan dalam pembuatan vaksin.

Potensi Immunogenisitas

Pengujian immunogenisitas dilakukan terhadap ketiga teknik inaktivasi vaksin, yaitu (1). *formalin killed*, (2). *heat killed*, (3). *sonicated killed*, dan (4) larutan BHIB steril sebagai kontrol. Populasi ikan nila SPF dengan ukuran ± 15 gram/ekor digunakan sebagai hewan uji. Sebanyak 0,1 mL/ekor larutan vaksin dengan konsentrasi $1,75 \times 10^6$ cfu/mL diberikan melalui penyuntikan secara IP.

Selama periode induksi kekebalan yang ditentukan selama 4 (empat) minggu pasca vaksinasi, ikan uji dipelihara secara *pooling* dari masing-masing kelompok perlakuan dalam wadah berupa *fiber glass* volume 200 liter yang diisi ikan sebanyak 500 ekor. Ikan uji diberi pakan secara *ad libitum* sebanyak 3 kali/hari (pagi, siang, dan sore). Selama periode induksi kekebalan, suhu air dipertahankan pada kisaran 27-29°C dan penggantian air dilakukan setiap hari melalui penyifonan sebanyak 50% dari total volume.

Pada minggu ke-IV pasca pemberian vaksin, dilakukan uji tantang terhadap ikan uji dari masing-masing kelompok perlakuan. Uji

tantang secara eksperimental, dilakukan dalam akuarium ukuran 30 cm x 40 cm x 35 cm diisi air sebanyak 40 liter dengan kepadatan 20 ekor/wadah. Masing-masing kelompok perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Uji tantang dilakukan melalui teknik penyuntikan bakteri aktif isolat *S. agalactiae* kode isolat N4M secara IP pada dosis $\text{LD}_{50} \approx 10^3$ cfu/ekor, dan berlangsung selama 14 (empat belas) hari.

Pengamatan terhadap tingkah laku, gejala klinis dan mortalitas ikan uji dilakukan setiap hari hingga akhir berlangsungnya kegiatan riset. Pengamatan secara intensif terhadap parameter-parameter tersebut terutama dilakukan selama proses uji tantang. Pada periode uji tantang, dilakukan pengambilan sampel selektif terhadap individu yang menunjukkan tingkah laku dan/atau gejala klinis spesifik, minimal sebanyak satu ekor dari masing-masing kelompok perlakuan untuk diagnosa/identifikasi patogen target.

Potensi immunogenisitas (efektivitas vaksin) diukur melalui 2 (dua) indikator, yaitu nilai titer antibodi dan sintasan ikan uji selama proses uji tantang. Pengukuran titer antibodi (*in vitro*) dilakukan secara *pooling* dari masing-masing kelompok perlakuan, dan dilakukan secara berkala setiap minggu sejak hari ke-0 hingga akhir penelitian. Pengambilan darah dilakukan dengan alat suntik volume 1,0 mL melalui *dorsal aorta puncture*, untuk selanjutnya diproses secara serologis hingga diperoleh serum darah ikan yang relatif murni.

Pengukuran/pengamatan titer antibodi dilakukan secara langsung dengan teknik *direct agglutination test* menurut metode yang dikembangkan oleh Roberson (1990), yaitu mereaksikan antara serum darah ikan uji dengan bakteri *S. agalactiae* aktif. Kuantifikasi titer antibodi dilakukan melalui pengenceran serum darah ikan uji secara seri dalam 96-well plate.

Level proteksi relatif diukur melalui nilai sintasan ikan uji pada akhir periode uji tantang. Pengamatan juga dilakukan terhadap tingkah laku dan gejala klinis selama proses uji tantang. Efikasi vaksin diukur dengan nilai persentase sintasan relatif (*Relative percent survival/RPS*) yang dihitung dengan formula:

$$\text{RPS} = 1 - \frac{\% \text{ mortalitas ikan yang divaksin}}{\% \text{ mortalitas ikan kontrol}} \times 100$$

Parameter-parameter yang dielaborasi selama berlangsungnya riset, dianalisis secara deskriptif dan/atau statistik sesuai dengan rancangan percobaan yang diterapkan, serta jenis informasi/data yang diperoleh.

HASIL DAN BAHASAN

Hasil

Isolat bakteri yang diisolasi dari ikan sakit pada saat terjadi kasus penyakit pada budidaya ikan nila di beberapa wilayah di Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, Sulawesi Utara, dan Papua Barat terkumpul sebanyak 55 (lima puluh lima) isolat bakteri. Hasil karakterisasi dan/atau identifikasi secara biokimia terhadap 55 isolat bakteri yang diduga sebagai *Streptococcus* spp., diperoleh sebanyak 15 (lima belas) isolat

yang secara definitif adalah bakteri *Streptococcus* spp. Hasil karakterisasi secara biokimia menurut Rancangan Standar Nasional Indonesia (RSNI) "Metode identifikasi bakteri *Streptococcus iniae* dan *S. agalactiae* pada ikan secara konvensional" serta API 20 STREP System terhadap kelima belas isolat bakteri tersebut selengkapnya disajikan pada Tabel 1.

Berdasarkan hasil karakterisasi sebagaimana tercantum pada Tabel 1, apabila mengacu pada metode RSNI maka sebanyak 12 isolat (80%) adalah *S. agalactiae* dan 3 isolat (20%) adalah *S. iniae*. Konfirmasi taksonomis hingga level jenis/spesies isolat bakteri *S. agalactiae* yang disertakan pada proses uji tantang juga dilakukan melalui teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan

Tabel 1. Hasil karakterisasi biokimia isolat bakteri *Streptococcus* spp. yang disertakan dalam proses penapisan awal melalui metode Koch's postulate.

Table 1. The result of biochemical characterization from *Streptococcus* spp. isolates in first screening process using koch's postulate method

Kode isolat	Karakter											
	Bentuk	Gram	Motilitas	Oksidase	O/F	Katalase	Bile salt	NaCl 6,5%	Aesculin hydrolysis	Asam D-manitol	Tumbuh pada 37 °C	Pendugaan spesies
N2M	cc	+	nm	-	F	-	-	+	+	+	+	<i>S. iniae</i>
N2O	cc	+	nm	-	F	-	-	+	+	+	+	<i>S. iniae</i>
N3M	cc	+	nm	-	F	-	-	+	-	-	+	<i>S. agalactiae</i>
N3G	cc	+	nm	-	F	-	-	+	-	-	+	<i>S. agalactiae</i>
N4M	cc	+	nm	-	F	-	-	+	-	-	+	<i>S. agalactiae</i>
N4O	cc	+	nm	-	F	-	-	+	-	-	+	<i>S. agalactiae</i>
N4G	cc	+	nm	-	F	-	-	+	-	-	+	<i>S. agalactiae</i>
N14M	cc	+	nm	-	F	-	-	+	-	-	+	<i>S. agalactiae</i>
N14O	cc	+	nm	-	F	-	-	+	-	-	+	<i>S. agalactiae</i>
N14G	cc	+	nm	-	F	-	-	+	-	-	+	<i>S. agalactiae</i>
N17M	cc	+	nm	-	F	-	-	+	-	-	+	<i>S. agalactiae</i>
N17O	cc	+	nm	-	F	-	-	+	-	-	+	<i>S. agalactiae</i>
N7TO	cc	+	nm	-	F	-	-	+	-	-	+	<i>S. iniae</i>
NK1	cc	+	nm	-	F	-	-	+	+	+	+	<i>S. agalactiae</i>
NY	cc	+	nm	-	F	-	-	+	-	-	+	<i>S. agalactiae</i>

Keterangan (Note): cc = coccus, nm = non motile, F = fermentative

menggunakan primer spesifik. Hasil konfirmasi tersebut memberikan hasil positif seperti terlihat pada Gambar 1.

Hasil isolasi bakteri *Streptococcus* spp. dari 20 ekor ikan nila uji yang diambil secara acak menunjukkan hasil negatif, demikian pula dengan hasil pengamatan secara mikroskopis terhadap keberadaan infestasi parasit. Representasi dari sampel yang diamati mengindikasikan bahwa populasi ikan uji telah memenuhi persyaratan sebagai populasi ikan yang sehat dan dapat diasumsikan SPF terhadap infeksi *Streptococcus* spp.

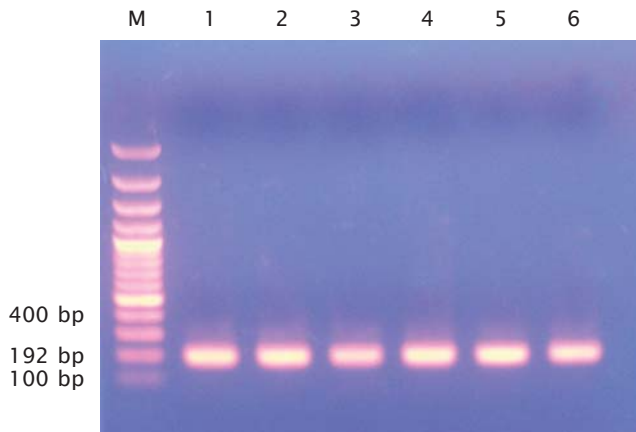
Pengujian melalui kaidah Koch's Postulat untuk membuktikan bahwa kelima belas isolat yang tersaring pada penapisan awal memiliki potensi patogenik terhadap ikan nila, menunjukkan bahwa seluruh koleksi isolat tersebut mengakibatkan tingkah laku, gejala klinis, dan kematian terhadap ikan uji; bahkan sebagian besar di antaranya bersifat akut. Gejala klinis yang teramati sangat nyata pada seluruh ikan uji seperti lemah, warna gelap, hilang nafsu makan, disorientasi atau hilang keseimbangan, dan *uni/bilateral exophthalmia* dengan kornea mata berwarna pucat. Tampilan dari gejala-gejala klinis tersebut dapat dilihat pada Gambar 2 sampai 5.

Berdasarkan kriteria yang telah dibangun dalam evaluasi penapisan awal, maka pada

penapisan berikutnya diperoleh 6 (enam) isolat yaitu: (1). N2O, (2). N3M, (3). N4M, (4). N14G, (5). N17O, dan (6). NK1 yang disertakan pada proses uji patogenisitas. Rataan mortalitas kumulatif ikan selama proses uji patogenisitas dari keenam isolat bakteri *Streptococcus* spp., yang terdiri atas 5 isolat bakteri *S. agalactiae* dan 1 isolat bakteri *S. iniae* selengkapnya disajikan pada Gambar 6 sampai 11.

Pengamatan terjadinya kematian pada ikan uji pasca infeksi buatan, pada hari pertama dilakukan setiap 8 jam sekali; dan untuk hari berikutnya dilakukan pada selang 24 jam. Pada Gambar Gambar 6 sampai 11 terlihat bahwa hampir seluruh isolat bakteri mampu mengakibatkan kematian sejak hari pertama untuk ketiga konsentrasi bakteri yang diuji; kecuali untuk isolat NK1 yang hanya terjadi pada konsentrasi bakteri 10^7 cfu/ekor ikan. Mulai hari ke-2 hingga hari ke-10 terjadi kematian yang sporadis untuk masing-masing isolat dan konsentrasi bakteri, dan untuk individu yang bertahan hidup hingga hari ke-14 umumnya mengalami penyembuhan dan bertahan hidup hingga berminggu-minggu kemudian.

Berdasarkan nilai rata-rata persen mortalitas kumulatif yang diperoleh selama proses uji patogenisitas, nilai LD_{50} dianalisis dengan regresi linier sederhana untuk memperoleh formulasi matematis LD_{50} dari masing-masing



Gambar 1. Profil produk *Polymerase Chain Reaction* (PCR) DNA bakteri *Streptococcus agalactiae* (192 bp). (M= 100 bp DNA ladder, 1= isolat N3M, 2= isolat N4M, 3= isolat N4O, 4= isolat N14G, 5= isolat N17O, dan 6= isolat NK1)

Figure 1. *Product Profile of Polymerase Chain Reaction* (PCR) DNA bacteria *Streptococcus agalactiae* (192 bp). (M= 100 bp DNA ladder, 1= isolate N3M, 2= isolate N4M, 3= isolate N4M, 4= isolate N14G, 5= isolate N17O, and 6= isolate NK1)



Gambar 2 & 3. Gejala klinis ikan nila yang diinfeksi bakteri *Streptococcus agalactiae* secara buatan, warna tubuh gelap (Gambar 2), dan satu sisi mata menonjol/*unilateral exophthalmia* dengan kornea mata berwarna pucat (Gambar 3)

Figure 2 & 3. Clinical signs of Nile fish that was injected with artificial infection of *Streptococcus agalactiae*, the whole body becomes dark (figure 2) and unilateral exophthalmia with pale cornea (figure 3)



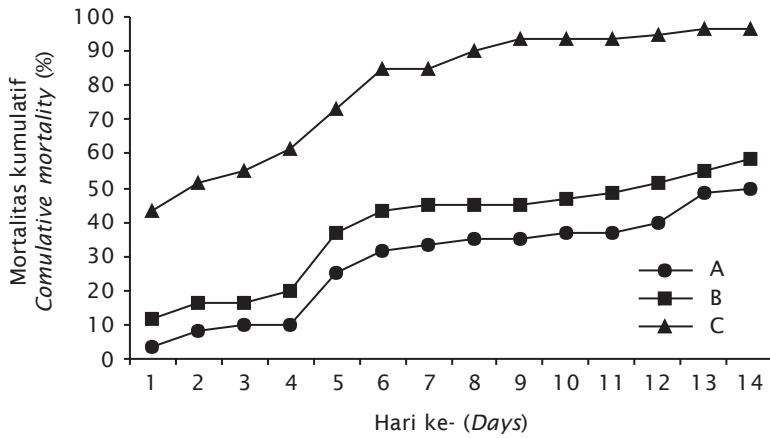
Gambar 4 & 5. Gejala klinis ikan nila yang diinfeksi bakteri *Streptococcus agalactiae* secara buatan, disorientasi/hilang keseimbangan (Gambar 4) dan dua sisi mata menonjol/*bilateral exophthalmia* (Gambar 5)

Figure 4 & 5. Clinical signs of Nile fish that was injected with artificial infection of *Streptococcus agalactiae*, disorientation/loss balancing (Figure 4) and bilateral exophthalmia (Figure 5)

isolat bakteri. Formulasi matematis dari masing-masing isolat bakteri selengkapnya disajikan pada Tabel 2. Pada Tabel 2 terlihat bahwa nilai LD_{50} paling rendah dimiliki oleh bakteri *S. agalactiae* dengan kode isolate N4M yaitu sebesar $6,44 \times 10^2$ cfu, dan nilai LD_{50} terbesar dimiliki oleh bakteri *S. iniae* dengan kode isolat N20 yaitu sebesar $8,3 \times 10^5$ cfu. Pemilihan kandidat isolat bakteri *Streptococcus* spp. yang digunakan pada riset ini didasarkan pada pendekatan patogenisitas, oleh karena itu

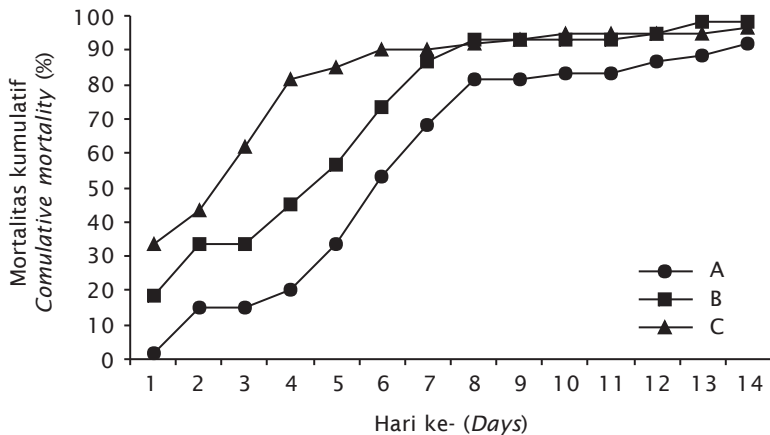
isolat bakteri N4M digunakan sebagai sumber antigen dalam pembuatan vaksin anti streptococcus.

Nilai titer antibodi dalam serum darah ikan uji yang diberi vaksin melalui penyuntikan dengan sediaan vaksin yang diinaktivasi dengan teknik yang berbeda memperlihatkan bahwa pada kelompok ikan uji yang diberi vaksin yang diinaktivasi dengan formalin memberikan nilai titer antibodi yang relatif lebih tinggi dibandingkan dengan teknik



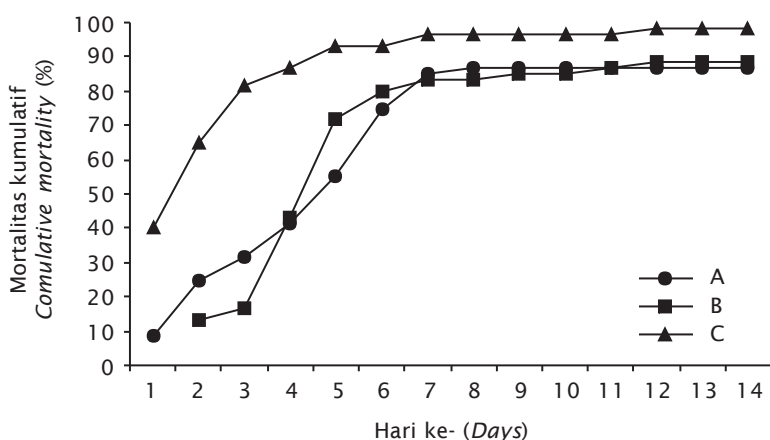
Gambar 6. Rataan persen mortalitas kumulatif ikan uji yang diinfeksi bakteri *Streptococcus iniae* isolat N2O pada konsentrasi bakterin yang berbeda (A= 10³ cfu/ekor, B= 10⁵ cfu/ekor, dan C= 10⁷ cfu/ekor)

Figure 6. Percentage average of total mortality of sampled fish infected with *Streptococcus iniae* code N2O in different concentrations (A= 10³ cfu/sample, B= 10⁵ cfu/sample, and C= 10⁷ cfu/sample)



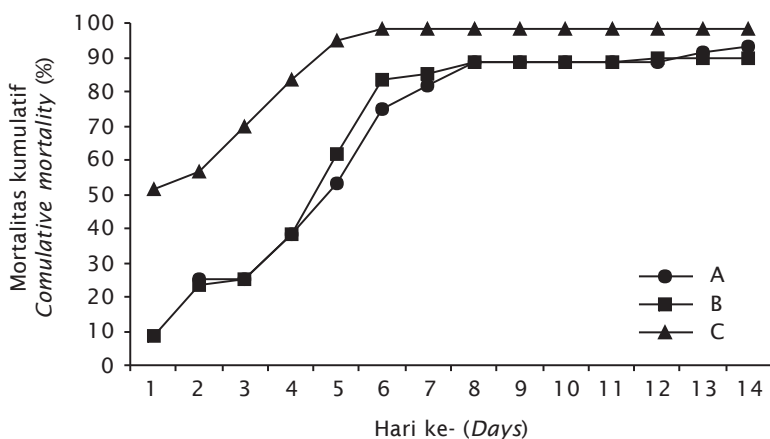
Gambar 7. Rataan persen mortalitas kumulatif ikan uji yang diinfeksi bakteri *Streptococcus agalactiae* isolat N3M pada konsentrasi bakterin yang berbeda (A= 10³ cfu/ekor, B= 10⁵ cfu/ekor, dan C= 10⁷ cfu/ekor)

Figure 7. Percentage average of total mortality of sampled fish infected with *Streptococcus agalactiae* code N3M in different concentrations (A= 10³ cfu/sample, B= 10⁵ cfu/sample, and C= 10⁷ cfu/sample)



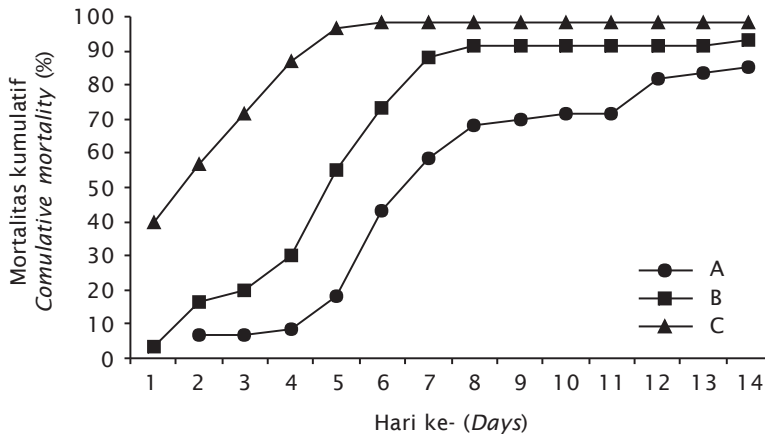
Gambar 8. Rataan persen mortalitas kumulatif ikan uji yang diinfeksi bakteri *Streptococcus agalactiae* isolat N4M pada konsentrasi bakterin yang berbeda (A= 10^3 cfu/ekor, B= 10^5 cfu/ekor, dan C= 10^7 cfu/ekor)

Figure 8. Percentage average of total mortality of sampled fish infected with *Streptococcus agalactiae* code N4M in different concentrations (A= 10^3 cfu/sample, B= 10^5 cfu/sample, and C= 10^7 cfu/sample)



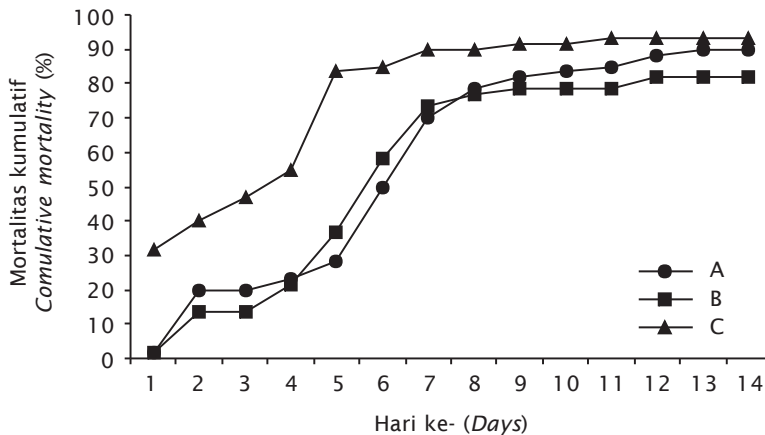
Gambar 9. Rataan persen mortalitas kumulatif ikan uji yang diinfeksi bakteri *Streptococcus agalactiae* isolat N14G pada konsentrasi bakterin yang berbeda (A= 10^3 cfu/ekor, B= 10^5 cfu/ekor, dan C= 10^7 cfu/ekor)

Figure 9. Percentage average of total mortality of sampled fish infected with *Streptococcus agalactiae* code N14G in different concentrations (A= 10^3 cfu/sample, B= 10^5 cfu/sample, and C= 10^7 cfu/sample)



Gambar 10. Rataan persen mortalitas kumulatif ikan uji yang diinfeksi bakteri *Streptococcus agalactiae* isolat N170 pada konsentrasi bakterin yang berbeda (A= 10^3 cfu/ekor, B= 10^5 cfu/ekor, dan C= 10^7 cfu/ekor)

Figure 10. Percentage average of total mortality of sampled fish infected with *Streptococcus agalactiae* code N170 in different concentrations (A= 10^3 cfu/sample, B= 10^5 cfu/sample, and C= 10^7 cfu/sample)



Gambar 11. Rataan persen mortalitas kumulatif ikan uji yang diinfeksi bakteri *Streptococcus agalactiae* isolat NK1 pada konsentrasi bakterin yang berbeda (A= 10^3 cfu/ekor, B= 10^5 cfu/ekor, dan C= 10^7 cfu/ekor)

Figure 11. Percentage average of total mortality of sampled fish infected with *Streptococcus agalactiae* code NK1 in different concentrations (A= 10^3 cfu/sample, B= 10^5 cfu/sample, and C= 10^7 cfu/sample)

Tabel 2. Formulasi dan nilai LD₅₀ dari 6 isolat bakteri *Streptococcus* spp. yang dihitung melalui analisis regresi linier sederhana

Table 2. The formulation and LD₅₀ from 6 *Streptococcus* spp isolates calculated from a simple analysis of regression linier

Jenis bakteri	Kode isolat	Formula nilai LD50	Nilai LD50
<i>S. iniae</i>	N2O	$Y = 6.224 + 7.396X$	8.3×10^5 cfu
<i>S. agalactiae</i>	N3M	$Y = -9.368 + 12.9127X$	3.96×10^4 cfu
<i>S. agalactiae</i>	N4M	$Y = 23.065 + 9.5877X$	6.44×10^2 cfu
<i>S. agalactiae</i>	N14G	$Y = 15.4062 + 10.4127X$	2.1×10^3 cfu
<i>S. agalactiae</i>	N17O	$Y = -45.9666 + 19.5753X$	7.9873×10^4 cfu
<i>S. agalactiae</i>	NK1	$Y = -22.6423 + 13.7502X$	1.9187×10^5 cfu

inaktivasi lainnya. Nilai-nilai tersebut selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 3.

Rataan persen sintasan ikan pasca uji tantang terhadap isolat bakteri homolog (*S. agalactiae* isolat N4M) menunjukkan bahwa vaksin yang diinaktivasi dengan formalin juga memberikan level proteksi yang relatif lebih

baik dibandingkan dengan teknik inaktivasi lainnya. Nilai persen sintasan ikan uji dari masing-masing kelompok perlakuan selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4. Dari Tabel 3 dan 4 mengisyaratkan bahwa teknik inaktivasi sediaan vaksin dengan formalin 3% memberikan level proteksi yang lebih baik

Tabel 3. Nilai kualitatif titer antibodi serum darah ikan uji selama proses induksi kekebalan spesifik terhadap *Streptococcus agalactiae*

Table 3. Qualitative values of antibody titre from fish blood during induction specific immunity responses to *Streptococcus agalactiae*

Sampling	Perlakuan (Treatment)	Pengenceran ke- (Dilution number -)									
		0	2	4	8	16	32	64	128	256	512
Minggu 0	Pooled	+	+	+	±						
Minggu I (First week)	A	+	+	+	+	±					
	B	+	+	+	+	+	±				
	C	+	+	+	+	+	±				
	D	+	+	+	+	±					
Minggu II (Second week)	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±
	B	+	+	+	+	+	+	+	±		
	C	+	+	+	+	+	+	+	+	±	
	D	+	+	+	+	±					
Minggu III (Third week)	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±
	B	+	+	+	+	+	+	+	±		
	C	+	+	+	+	+	+	+	+	±	
	D	+	+	+	+	±					

Keterangan (Note):

A = Formalin killed, B = Heat killed, C = Sonicated kill, dan D = Kontrol

Tabel 4. Nilai sintasan (%) ikan uji pada akhir proses uji tantang terhadap *Streptococcus agalactiae* serta nilai relative percent survival (RPS)

Table 4. Survival rate values of fish at last challenge test to *Streptococcus agalactiae* and relative percentage survival values (RPS)

Perlakuan Treatment	Sintasan Survival rate	RPS
A (Formalin killed)	15.57	13.6
B (Heat killed)	4.47	2.3
C (Sonicated killed)	8.93	6.8
D (Control)	2.23	-

dibandingkan dengan teknik inaktivasi lainnya; hal ini terlihat dari nilai titer antibodi serta tingkat sintasan hidup ikan uji yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok lainnya.

Pembahasan

Keunggulan ikan nila yang kompetitif dan komparatif telah menjadikan dirinya sebagai primadona budidaya air tawar yang diharapkan mampu meningkatkan produksi perikanan nasional, kesejahteraan, serta konsumsi protein hewani asal ikan. Pembudidayaan ikan nila di Indonesia dilakukan dalam berbagai sistem (ekstensif, semi-intensif, intensif, monokultur, polikultur, monoseks kultur, dll.) tergantung pada kondisi pembudidaya, karakteristik lokasi, kondisi lingkungan, faktor sosial ekonomi, penguasaan teknologi, dan potensi pasar. Selama ini ikan nila diyakini sebagai salah satu ikan budidaya yang tahan terhadap penyakit, namun indikasi ini sudah mulai pudar karena sering dilaporkan adanya kasus penyakit pada budidaya ikan nila, terutama yang disebabkan oleh golongan bakteri. Berdasarkan sampel yang dikirim oleh pembudidaya ikan ke Laboratorium Kesehatan dan Patologi Ikan BRPBAT, secara umum dapat dikatakan bahwa *Streptococcus* spp. merupakan bakteri yang paling sering teridentifikasi dari kasus penyakit pada ikan nila; sedangkan *Flavobacterium columnare* umumnya menginfeksi ikan nila pada stadia awal.

Jenis bakteri yang terisolasi dari kasus penyakit streptococcosis pada budidaya ikan nila di lokasi pengambilan sampel pada riset ini didominasi oleh *Streptococcus agalactiae*

(12/15 \approx 80%) dibandingkan dengan *S. iniae* (3/15 \approx 20%). Keragaan yang hampir sama dilaporkan dari monitoring yang dilakukan oleh Labrie *et al.* (2007) dari kasus streptococcosis pada ikan nila, yaitu *S. agalactiae* (219/294 \approx 74,5%) dan *S. iniae* (75/294 \approx 25,5%) dari 36 lokasi di wilayah Asia. Sedangkan Supriyadi & Bastiawan (2002) melaporkan hasil monitoring penyakit streptococcosis pada ikan nila di wilayah Jawa Barat dan Banten hanya ditemukan adanya infeksi *S. iniae*, dan tidak ditemukan adanya infeksi *S. agalactiae* tetapi Supriyadi *et al.* (2005) menemukan *S. agalactiae* dari Cirata dan Gajah Mungkur.

Pemeriksaan secara mikroskopis terhadap 20 ekor ikan uji untuk mengetahui keberadaan infestasi eksternal parasit diketahui bahwa populasi ikan uji relatif bersih dari infestasi parasit. Hasil isolasi bakteri target (*Streptococcus* spp.) uji juga menunjukkan hasil negatif, sehingga populasi ikan uji diasumsikan sebagai populasi SPF terhadap *Streptococcus* spp., dan populasi tersebut telah memenuhi persyaratan untuk digunakan sebagai ikan uji dalam kegiatan riset ini.

Evaluasi potensi patogenik kelima belas isolat menunjukkan bahwa seluruh isolat bersifat patogenik, menimbulkan perubahan secara klinis serta mengakibatkan kematian ikan uji; bahkan sebagian besar di antaranya bersifat akut. Yanong & Floyd (2002) menyatakan bahwa infeksi *Streptococcus* spp. pada ikan nila dapat bersifat akut yang mengakibatkan kematian massal (>50%) dalam tempo 3-7 hari, atau kematian berpola kronik yang persisten selama beberapa minggu. Pola yang sama terjadi pula pada riset ini, meskipun dapat dikatakan bahwa infeksi *S. agalactiae* umumnya lebih bersifat akut; sedangkan *S. iniae* umumnya bersifat kronik, kecuali isolat N2O.

Penyakit "syndrome meningoencephalitis and panophthalmitis" merupakan nama lain untuk streptococcosis pada ikan, dan penyakit ini nampaknya berpotensi sebagai salah satu kendala yang serius dalam program intensifikasi ikan nila. Bakteri *Streptococcus* spp. yang berukuran sangat kecil (diameter rata-rata 1 mm) adalah bakteri gram positif yang memiliki *outer membrane sel* (OTS) cukup tebal dan diselimuti oleh *fibrils* yang memiliki potensi toksik terhadap inang. Selain itu, kelompok bakteri ini mampu hidup di sel makrofag yang merupakan komponen penting dalam sistem kekebalan tubuh ikan, baik spesifik maupun non spesifik. Sehingga tidak

mengherankan apabila Clark *et al.* (1999) menyatakan bahwa penggunaan antibiotik untuk melawan infeksi kelompok bakteri ini kurang berhasil, karena dibutuhkan dosis yang cukup tinggi untuk melawan sel bakteri yang berada di dalam sel makrofag; namun penerapan dosis tersebut juga akan mematikan sel makrofag sehingga sistem kekebalan tubuh inang akan menurun drastis.

Secara matematis, nilai LD_{50} pada jumlah bakteri paling rendah dimiliki oleh bakteri *S. agalactiae* dengan kode isolate N4M yaitu sebesar $6,44 \times 10^2$ cfu ini artinya bahwa bakteri tersebut digolongkan pada golongan patogenitas tinggi, dan nilai LD_{50} terbesar dimiliki oleh bakteri *S. iniae* dengan kode isolat N2O yaitu sebesar $8,3 \times 10^5$ cfu. Nilai LD_{50} yang diperoleh pada riset ini jauh lebih rendah daripada yang diperoleh Al-Harbi (1996) yang melakukan uji kerentanan beberapa strain ikan nila terhadap infeksi *Streptococcus* spp., dan diperoleh nilai LD_{50} terendah sebesar $2,8 \times 10^5$ cfu, dan nilai tertinggi adalah $9,2 \times 10^7$ cfu per ekor ikan. Rendahnya nilai LD_{50} mengindikasikan bahwa isolat bakteri tersebut memiliki potensi patogenik yang lebih tinggi, terlebih lagi untuk isolat N4M. Secara teoritis dapat diprediksi bahwa apabila dalam suatu populasi ikan nila berukuran ± 15 gram/ekor, dan masing-masing ekor ikan terinfeksi oleh 500-1.000 sel bakteri *S. agalactiae* (N4M), maka hanya dalam periode 5 hari (120 jam) akan mengakibatkan kematian 850% dari total populasi.

Nilai titer antibodi dalam serum darah ikan uji yang diberi vaksin melalui penyuntikan dengan sediaan vaksin yang diinaktivasi dengan teknik berbeda memperlihatkan bahwa sediaan vaksin yang diinaktivasi dengan formalin memberikan nilai titer antibodi yang relatif lebih tinggi mulai minggu ke-2 dibandingkan dengan teknik inaktivasi lainnya. Paramater lain yang sinergis dengan indikasi ini adalah nilai rata-rata persen mortalitas kumulatif pasca uji tantang terhadap isolat bakteri homolog. Pada kelompok ikan yang diberi vaksin yang diinaktivasi dengan formalin juga memberikan level proteksi yang relatif lebih baik dibandingkan dengan teknik inaktivasi lainnya.

Fenomena ini terjadi diduga karena proses pemanasan (*heat killed vaccine*) pada suhu 100°C terhadap sediaan baku vaksin dapat merusak struktur dasar antigen (denaturasi)

serta koagulasi protein antigen yang merupakan material yang bersifat antigenik. Secara hipotetik, inaktivasi vaksin melalui sonikasi (*sonicated vaccine*) diharapkan dapat memberikan hasil yang lebih baik karena fraksi-fraksi sel bakteri akan terpecah sehingga diyakini akan mempermudah sel-sel fungsional untuk mengenalinya. Namun berdasarkan hasil uji viabilitas, masih ditemukan adanya pertumbuhan koloni bakteri; sehingga vaksin tersebut tidak aman terhadap ikan uji. Hal ini terlihat dari tingginya mortalitas ikan uji dari kelompok perlakuan ini selama periode induksi kekebalan yang ditetapkan selama 3 minggu.

Nilai titer antibodi yang teramati (reaksi antigen-antibodi dalam bentuk aglutinasi) mengindikasikan bahwa vaksin sel utuh bakteri *S. agalactiae* isolat N4M memiliki potensi imunogenik. Namun, secara sederhana dapat dikatakan bahwa antibodi spesifik yang terbentuk belum mampu memberikan level proteksi yang baik, karena nilai RPS masih jauh di bawah 50%. Klesius *et al.* (1999) melakukan vaksinasi pada ikan nila dengan vaksin *S. inae*, dan tidak diperoleh hasil yang memuaskan setelah diuji tantang dengan bakteri homolog; dimana mortalitas mencapai 100% pada kelompok ikan setelah hari ke-4 pasca uji tantang, sedangkan tingkat mortalitas yang sama pada kelompok ikan kontrol baru terjadi pada hari ke-11. Sedangkan Pasnik *et al.* (2005) berhasil membuat vaksin anti *S. agalactiae* yang cukup protektif. Sediaan vaksin tersebut berupa sel utuh yang diinaktivasi dengan formalin (*formalin killed vaccine*) dan *extra-cellular products* (ECP) dari *S. agalactiae*. Selanjutnya dinyatakan bahwa ECP *S. agalactiae* mengandung antigen yang berbobot molekul 55 kDa, yang dalam hal ini telah diketahui sebagai antigen potensial untuk memproduksi antibodi dan proteksi terhadap bakteri tersebut.

Dari kajian ini secara eksplisit mengisyaratkan adanya dugaan bahwa materi imogenik berada pada sel bakteri yang masih relatif utuh, dan konsentrasi formalin yang digunakan belum optimal, sehingga berpengaruh terhadap keutuhan struktur dan/atau pelepasan material imunogenik dari sel bakteri. Selain itu, karakteristik biologis dari bakteri *S. agalactiae* yang menginfeksi ikan nila belum sepenuhnya terungkap, termasuk faktor-faktor lingkungan yang permisif dan non-permisif.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Karakterisasi secara biokimia terhadap 15 isolat bakteri *Streptococcus* spp. diketahui sebanyak 12 isolat (80%) adalah *S. agalactiae* dan 3 isolat (20%) adalah *S. iniae*. Koch's Postulate terhadap seluruh isolat membuktikan bahwa semuanya memiliki potensi patogenik terhadap ikan nila. Konfirmasi taksonomis hingga level spesies isolat bakteri *S. agalactiae* dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) diperoleh hasil positif.
2. Dari 6 isolat hasil penapisan awal yang terdiri atas 5 isolat bakteri *S. agalactiae* (N3M, N4M, N14G, N17O, NK1) dan 1 isolat bakteri *S. iniae* (N2O); bakteri *S. agalactiae* (N4M) memiliki nilai LD₅₀ terkecil yaitu 6,44 x 10² cfu, dan nilai LD₅₀ terbesar dimiliki oleh bakteri *S. iniae* dengan kode isolat N2O yaitu sebesar 8,3 x 10⁵ cfu.
3. Isolat bakteri N4M bersifat virulensi tinggi dan dapat memiliki tingkat virulensi yang paling tinggi sehingga digunakan sumber antigen dalam pembuatan vaksin anti streptococcosis.
4. Nilai titer antibodi dan sintasan tertinggi diperoleh pada kelompok ikan yang divaksin dengan *formalin killed vaccine* dibandingkan dengan teknik inaktivasi lainnya (*heat killed vaccine* dan *sonicated vaccine*). Meskipun demikian, secara umum dapat disimpulkan bahwa antibodi yang terbentuk masih jauh dari level proteksi, karena nilai RPS masih di bawah 50%.

Saran

Perlu kajian yang lebih detail terhadap efektivitas berbagai sediaan, teknik inaktivasi dan aplikasi vaksin; serta eksplorasi unsur imunogenik dari sel bakteri *Streptococcus agalactiae*, sehingga dapat dikembangkan sediaan vaksin yang lebih tepat, efektif, dan protektif.

UCAPAN TERIMA KASIH

- Riset ini dibiayai oleh DIPA 2009 Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar, Bogor.
- Penulis mengucapkan terima kepada Saudara Ahmad Wahyudi, Mikdarullah, Edy Farid, dan Bambang Priadi atas bantuannya selama pelaksanaan kegiatan riset ini.

DAFTAR ACUAN

- Al-Harbi, A.H. 1996. Susceptibility of five species of Tilapia to *Streptococcus* spp. Asian Fisheries Science. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 9: 177-181.
- Austin, B. & Austin, D.A. 2001. Chapter 2- Characteristics of the diseases. In Bacterial Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish, p. 13-15.
- Berridge, B.R., Bercovier, H., & Frelie, P.F. 2001. *S. agalactiae* and *S. difficile* 16S-23S Intergenic rDNA Genetic Homogeneity and Species-Specific PCR. Vet. Microbiol., 78: 165-173.
- Clark, J.S., Paller, B., & Smith, P.D. 1999. Prevention of streptococcus in tilapia by vaccination : the Philippine experience. Journal of Fish Diseases, 27: 144-150.
- Ellis, A.E. 1998. Fish Vaccination. Academic Press Limited, London, 255 pp.
- Ferguson, H.W., Morales, J.A., & Ostland, V.E. 1994. Streptococcosis in aquarium fish, *Diseases of Aquatic Organisms*, 19(1): 1-6.
- Frerichs, G.N. & Millar, S.D. 1993. Manual for the Isolation and Identification of Fish Bacterial Pathogens. Pisces Press. Stirling, 60 pp.
- Inglis, V., Roberts, R.J., & Bromage, N.R. 1993. Chapter 12, Streptococcal Infections. In Bacterial Diseases of Fish, Halsted Press, John Wiley & Sons, Inc., NY, p. 196-97.
- Klesius, P.H., Shoemaker, C.A., & Evans, J.J. 1999. Efficacy of a killed *Streptococcus iniae* vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Bull. Eur Ass Fish Pathol., 19(1): 38-41.
- Labrie, L., Joseph, N., Komar, C., & Sheehan, B. 2007. Bacterial Diseases of Finfish in the South East Asian Region. Intervet Aquatic Animal Health Newsletter. 15 November 2007. Singapore, p. 11-12.
- Pasnik, D.J., Evans, J.J., Panangala, V.S., Klesius, P.H., Shelby, R.A., & Shoemaker, C.A. 2005. Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy. In Journal of Fish Diseases, 28(4): 205-212.
- Roberson, B.S. 1990. Bacterial Agglutination dalam Fish Immunology Technical Communication No. 1 edited by Stolen, J.S., T.C. Fletcher, D.P. Anderson, B.S. Roberson and W.B. van Muiswinkel. SOS Publications. Fair Haven, N.J., 197 pp.
- Shoemaker, C. & Klesius, P. 1997. Streptococ-

- cal Disease Problems and Control: A Review. *In* Tilapia Aquaculture, K. Fitzsimmons, Editor, NREAES 106, Ithaca, NY, 2: 671-80.
- Supriyadi, H. & Bastiawan, D. 2002. Karakterisasi dan identifikasi patogen penyebab penyakit streptococciosis pada ikan air tawar yang dibudidayakan. Laporan Teknis Proyek Riset Perikanan Budidaya Air Tawar. Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar. (Tidak dipublikasikan).
- Supriyadi, H., Widiyati, A., Sunarto, A., & Prihadi, T.H. 2005. Keragaan penyakit bakterial ikan nila (*O. Niloticus*), pada KJA di lokasi berbeda, *J. Pen. Perik. Indonesia*, 11(7): 35-46.
- Taukhid, Komarudin, O., Supriyadi, H., & Bastiawan, D. 2005. Strategi pengendalian penyakit pada budidaya ikan air tawar. *Serial Bunga Rampai: Strategi Pengelolaan dan Pengendalian Penyakit KHV*, suatu upaya pemecahan dalam pembudidayaan ikan air tawar. Pusat Riset Perikanan Budidaya, Badan Riset Kelautan dan Perikanan, Departemen Kelautan dan Perikanan, hlm. 17-30.
- Yanong, R.P.E. & Floyd, R.F. 2002. Streptococcal infection of fish. Circular FA057. Department of Fisheries and Aquatic Sciences, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.