EFIKASI BEBERAPA SEDIAAN VAKSIN *Streptococcus agalactiae*-N14G UNTUK PENCEGAHAN PENYAKIT STREPTOCOCCOSIS PADA IKAN NILA, *Oreochromis niloticus*

Taukhid, Uni Purwaningsih, dan Angela Mariana Lusiastuti

Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar

Jl. Sempur No. 1, Bogor 16154

E-mail: taukhid_as@yahoo.co.id; lusiastuti_61@yahoo.co.id

(Naskah diterima: 19 Maret 2014; Disetujui publikasi: 7 Juli 2014)

ABSTRAK

Penelitian dengan tujuan untuk mengetahui efikasi berbagai sediaan (biakan cair, sel utuh, supernatan dengan dan tanpa penyaringan) vaksin *Streptococcus agalactiae*-N14G untuk pencegahan penyakit Streptococcosis pada ikan nila telah dilakukan pada skala laboratorium. Isolat bakteri *Streptococcus agalactiae*-N14G digunakan sebagai sumber antigen dalam pembuatan vaksin. Ikan nila dengan rata-rata ukuran 10-15 g/ekor dan diasumsikan bebas penyakit infeksi *Streptococcus agalactiae* (*specific pathogen free*, SPF) terhadap patogen target digunakan sebagai ikan uji. Pada hari ke-14 pasca vaksinasi, dilakukan ujiantang dengan bakteri homolog aktif pada dosis lethal (LD_{50}), dan pengamatan dilakukan selama 21 hari. Hasil penelitian menunjukkan efikasi sediaan vaksin tertinggi diperoleh pada sediaan vaksin sel utuh (B) (76,0%), selanjutnya diikuti oleh sediaan vaksin biakan cair (A) (65,0%), sediaan vaksin supernatan tanpa penyaringan (C) (49,0%), dan sediaan vaksin dengan penyaringan (D) (36,0%); sedangkan pada kelompok kontrol positif dan negatif, masing-masing sebesar 25,0% dan 34,0%. Dua jenis sediaan vaksin masuk kategori efektif dengan nilai *relative percentage survival* (RPS) $\geq$ 50%, yaitu jenis vaksin sel utuh (68,00%) dan jenis sediaan vaksin biakan cair (53,37%).

KATA KUNCI: efikasi, vaksin, Streptococcosis, ikan nila

ABSTRACT: *Efficacy of different preparations of Streptococcus agalactiae vaccine to prevent Streptococcosis on tilapia, Oreochromis niloticus. By: Taukhid, Uni Purwaningsih, and Angela Mariana Lusiastuti*

The research with the aim to know an efficacious of different preparations (A. broth, B. whole cell, C. crude extra cellular product, D. pure extra cellular product), and control group (positive and negative) of *Streptococcus agalactiae* vaccine to prevent Streptococcosis on tilapia has been carried out at laboratory level. *S. agalactiae* isolate code number of N14G was used as a master seed on vaccine production. Challenge test against homolog bacteria at the lethal dose (LD_{50}) was done at 14th days post vaccination for 21 days observation. The results showed that the efficacious vaccine preparation was evaluated by survival rate indicators were: whole cell vaccine (B) (76.0%), followed by broth vaccine (A) (65.0%), crude extra cellular product (C) (49.0%), and pure extra cellular product vaccine (D) (36.0%). Survival rate of positive control was 25.0%, and 34.0% for negative control. Two types of vaccine preparation

showed effective grade based on relative percentage survival (RPS) value, namely whole cell vaccine (68.00%), and broth vaccine (53.37%).

KEYWORDS: *eficative, vaccine, Streptococcosis, tilapia*

PENDAHULUAN

Ikan nila dikenal sebagai jenis ikan budidaya yang cepat tumbuh, teknik budidayanya relatif mudah, memiliki toleransi yang luas terhadap variasi kondisi lingkungan budidaya, serta relatif tahan terhadap gangguan penyakit. Sejalan dengan perkembangan budidaya ikan nila yang makin intensif, masalah penyakit telah menjadi salah satu kendala dan harus menjadi perhatian serius dalam pengembangan budidaya ikan nila di Indonesia.

Streptococcosis merupakan penyakit infeksius yang semakin sering terjadi pada budidaya ikan nila. Taukhid & Purwaningsih (2009) menyatakan bahwa kasus Streptococcosis pada ikan nila di beberapa sentra-sentra budidaya ikan nila di Jawa Barat dan Jawa Tengah umumnya disebabkan oleh infeksi bakteri *S. agalactiae* (85%) dan *S. iniae* (15%).

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 pada bagian eksternal, serta luka. Pada organ internal menunjukkan gejala adanya *ascites*, pembengkakan limfa, ginjal, hati, dan organ dalam lainnya (Plumb, 1975). Kasus Streptococcosis pada ikan nila dengan kematian yang tinggi umumnya terkait dengan multi faktor seperti fluktuasi suhu air, peningkatan kadar ammonia dan kadar oksigen terlarut yang rendah (Evans *et al.*, 2002).

Selama ini, teknik pengendalian penyakit pada perikanan budidaya lebih mengandalkan pada penggunaan bahan kimia/obat/antibiotik. Terkait dengan penggunaan bahan kimia/obat/antibiotik dalam proses produksi perikanan, pemerintah telah mengeluarkan regulasi yang tegas.

Teknologi pengendalian penyakit ikan melalui pendekatan biologis seperti vaksinasi, pemanfaatan mikroba esensial, serta terapi herbal merupakan opsi solusi yang sangat realistis, prospektif, aplikatif, dan ramah lingkungan.

Pencegahan merupakan langkah paling ideal untuk pengendalian penyakit pada perikanan budidaya. Strategi pencegahan penyakit secara dini yang sudah diyakini cukup efektif adalah melalui vaksinasi. Vaksinasi pada perikanan budidaya telah terbukti memberi kontribusi yang sangat signifikan terhadap peningkatan produksi perikanan budidaya, terutama industri salmon dan trout di Eropa.

Vaksin untuk pencegahan Streptococcosis pada ikan telah dieksplorasi, antara lain oleh Eldar *et al.* (1995) terhadap infeksi *S. difficle*, Akhlaghi *et al.* (1996) terhadap infeksi *Streptococcus* sp., terhadap *S. iniae* oleh Eldar *et al.* (1997), serta Klesius *et al.* (2000), dan Evans *et al.* (2004a, 2004b, dan 2004c) yang mengevaluasi efikasi dari vaksin inaktif yang mengandung *extracellular products* (ECP) dan *formalin-killed* sel utuh *S. agalactiae*. Taukhid & Purwaningsih (2009) menyatakan bahwa pemberian vaksin *whole cell* yang diinaktivasi dengan menggunakan formalin memberikan titer antibodi dan sintasan ikan uji yang lebih baik, dibandingkan dengan proses inaktivasi melalui pemanasan maupun sonikasi. Sedangkan Pasnik *et al.* (2005) menyatakan bahwa pemberian vaksin ECP *S. agalactiae* pada ikan nila memberikan perlindungan terhadap infeksi bakteri homolog hingga 180 hari pasca pemberian vaksin.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efikasi berbagai sediaan vaksin *Streptococcus agalactiae*-N14G (biakan cair, sel utuh, supernatan dengan dan tanpa penyaringan) untuk pencegahan penyakit Streptococcosis pada ikan nila.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan pada skala laboratorium, prosedur pelaksanaan kegiatan melalui tahapan sebagai berikut:

Ikan Uji

Ikan uji yang digunakan adalah ikan nila sebagai inang rentan (*susceptible host*) terhadap infeksi *S. agalactiae* dengan ukuran ± 15 g/ekor. Ikan uji berasal dari populasi ho-

mogen 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 *ad-libitum* sebanyak 3 kali/hari (pagi, siang, dan sore). Jenis pakan yang digunakan adalah pakan komersial (pelet apung) dengan kadar protein kasar sebesar $\pm 20\%$.

Aktivasi Bakteri untuk Sediaan Vaksin *S. agalactiae*-N14G

Sediaan bakteri *S. agalactiae*-N14G yang dibiakkan pada media cair (BHI + gliserol) dan disimpan pada suhu -20°C , ditumbuhkan kembali pada media BHIB. Selanjutnya, prosedur *Koch's postulate* dilakukan dengan menyuntikan 0,1 mL inokulum ke ikan nila uji secara *intraperitoneal* (IP). Reisolasi dilakukan terhadap individu ikan uji yang menunjukkan gejala klinis, selanjutnya isolat bakteri tersebut direkarakterisasi (SNI 7545.3:2009) yang meliputi: pengujian pewarnaan gram, motilitas, oksidase, oksidatif-fermentatif, katalase, penumbuhan dalam *bile salt* 40%, penumbuhan dalam NaCl 6,5%, hemolisis darah, *aesculin hydrolysis*, dan asam *D-mannitol*.

Pengujian Efikasi

Pengujian efikasi masing-masing sediaan vaksin dilakukan melalui penyuntikan terhadap ikan nila uji pada dosis yang diasumsikan relatif sama. Perlakuan yang diterapkan adalah pemberian lima macam sediaan vaksin dengan ulangan sebanyak tiga kali. Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL). Kelima macam sediaan vaksin tersebut adalah, A: vaksin biakan cair (*Broth vaccine*) kepadatan 10^8 cfu/mL; B: vaksin sel utuh (*whole cells vaccine*) kepadatan 10^8 cfu/mL; C: supernatan tanpa penyaringan (*crude ECP*) dari biakan baku 10^8 cfu/mL; D: supernatan dengan penyaringan (*pure ECP*) dari biakan baku 10^8 cfu/mL; E: kontrol positif, larutan *phosphate buffer saline* (PBS); F: kontrol negatif, tanpa pemberian materi apapun.

Penyiapan Sediaan Vaksin

Vaksin disiapkan dengan cara membiakkan bakteri *S. agalactiae* terpilih pada media BHIB dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 29°C selama 24 jam. Proses inaktivasi dilaku-

kan dengan menambahkan formalin (*formalin killed*) sebanyak 1% (v/v) pada biakan baku. Pengujian viabilitas dilakukan 24 jam pasca proses inaktivasi untuk mengetahui bahwa sediaan vaksin sudah benar-benar inaktif.

Uji viabilitas dilakukan dengan cara menumbuhkan sediaan vaksin yang telah diinaktivasi dengan larutan formalin 1% pada media BHIA, dan diinkubasi pada suhu 29°C selama 24-72 jam. Apabila tidak ada pertumbuhan bakteri pada medium BHIA selama 72 jam pengamatan, maka sediaan vaksin tersebut sudah inaktif. Sediaan biakan cair yang telah memenuhi persyaratan, selanjutnya digunakan sebagai sediaan vaksin biakan cair.

Penyiapan sediaan vaksin sel utuh dilakukan melalui sentrifugasi sebanyak dua kali pada 7.000 rpm, masing-masing selama 30 menit pada suhu 4°C . Supernatan kemudian dibuang, endapan (*pellet*) dicuci dengan larutan *phosphat buffer saline* (PBS) steril. *Pellet* yang didapat, disuspensikan ke dalam larutan PBS steril hingga mencapai volume awal, sehingga sediaan vaksin sel utuh tersebut diasumsikan memiliki konsentrasi yang sama dengan sediaan vaksin biakan cair.

Penyiapan sediaan vaksin supernatan tanpa penyaringan dilakukan dengan mensentrifus sediaan vaksin biakan cair pada 7.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C . Fraksi cair/supernatan hasil proses sentrifus tersebut diambil, dan digunakan sebagai sediaan vaksin supernatan tanpa penyaringan, sedangkan sisa endapan atau fraksi *pellet* dibuang.

Penyiapan sediaan vaksin supernatan dengan penyaringan dilakukan melalui penyaringan larutan vaksin biakan cair yang tidak diinaktivasi, disentrifus dengan kecepatan 7.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C . Fraksi cair dari proses pemusungan tersebut diambil, dan disaring dengan milipore *filter* $0,45\ \mu\text{m}$. Hasil penyaringan tersebut digunakan sebagai sediaan vaksin supernatan dengan penyaringan.

Vaksinasi

Vaksin yang telah dipersiapkan dalam beberapa sediaan, diberikan ke ikan uji melalui penyuntikan masing-masing sebanyak 0,1 mL/ekor secara *intraperitoneal* (IP). Rata-rata bobot ikan uji berkisar antara 10-15 g/ekor, dan jumlah ikan untuk setiap kelompok perlakuan adalah 200 ekor. Ikan yang telah divaksin, selanjutnya dipelihara dalam bak *fiber glass*

volume 200 L selama 14 hari secara *pooling* sesuai dengan kelompok perlakuan yang diberikan.

Selama masa vaksinasi, ikan uji diberi pakan dengan frekuensi tiga kali sehari yakni pada pagi (08.00), siang (12.00), dan sore hari (16.00) sebanyak 3%-5% dari bobot biomassa. Penyiponan dan penggantian air baru dilakukan setiap hari untuk membuang sisa pakan dan sisa metabolisme.

Uji Tantang

Pada hari ke-14 pasca pemberian vaksin, masing-masing kelompok perlakuan dilakukan ujiantang terhadap homolog bakteri aktif. Ujiantang secara eksperimental, dilakukan dalam akuarium ukuran 30 cm x 40 cm x 35 cm diisi air sebanyak 40 L dengan kepadatan 15 ekor/wadah. Masing-masing kelompok perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Ujiantang dilakukan melalui teknik penyuntikan bakteri aktif secara IP pada dosis LD₅₀, dan pengamatan dilakukan selama 21 hari.

Pengamatan terhadap tingkah laku, gejala klinis, dan mortalitas ikan uji dilakukan setiap hari hingga akhir periode pengujian. Efektivitas vaksin dievaluasi berdasarkan pendekatan nilai titer antibodi dengan teknik *direct agglutination test*. Level proteksi relatif diukur melalui ujiantang ikan uji terhadap patogen target pada dosis letal (LD₅₀), untuk selanjutnya dihitung nilai mortalitas kumulatif, *survival rate* (SR), serta *relative percentage survival* (RPS) selama proses pengujian. Penentuan nilai LD₅₀ dari isolat bakteri yang digunakan pada pengujian ini didasarkan pada nilai LD₅₀ dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Tauhid & Purwaningsih (2009) dengan nilai matematis $Y = 15,4062 + 10,4127X$ atau setara dengan $2,1 \times 10^3$ cfu/mL.

Evaluasi keamanan vaksin (*vaccine safety*) dihitung melalui ada tidaknya kematian pasca vaksinasi yang dihitung berdasarkan jumlah kematian yang terjadi secara akut selama 24 jam pada kelompok ikan yang divaksin dibandingkan dengan kelompok ikan kontrol.

Analisis Data

Data sintasan dianalisis menggunakan sidik ragam (Anova) untuk mengetahui pengaruh perlakuan yang diterapkan. Sebelum dianalisis, data terlebih dahulu diuji dengan uji homogenitas, uji normalitas, dan uji aditifitas.

Analisis dilakukan menggunakan program *statistical analysis system* (SAS) dengan program *general linear model* (GLM), jika hasil analisis diperoleh beda nyata ($P < 0,05$) atau sangat beda nyata ($P < 0,01$) maka dilanjutkan dengan uji Duncan untuk melihat perbedaan dari masing-masing dan untuk mengetahui interaksi antar perlakuan.

HASIL DAN BAHASAN

Hasil

Hasil pemeriksaan secara bakteriologis, tidak ditemukan adanya infeksi bakteri *Streptococcus* spp. pada seluruh sampel yang diisolasi. Berdasarkan hasil pemeriksaan awal tersebut, maka dapat diasumsikan bahwa populasi ikan nila yang digunakan pada penelitian ini adalah populasi bebas penyakit infeksi *S. agalactiae*.

Hasil karakterisasi secara biokimia menurut metode Standar Nasional Indonesia (SNI 7545.3:2009) "Metode identifikasi bakteri *Streptococcus iniae* dan *S. agalactiae* pada ikan secara konvensional", serta API 20 STREP System terhadap isolat bakteri *S. agalactiae* yang digunakan sebagai sediaan bakteri untuk pembuatan vaksin selengkapannya disajikan pada Tabel 1. Berdasarkan hasil uji bakteriologi, maka secara definitif bahwa jenis bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah *S. agalactiae*.

Preparasi sediaan larutan baku vaksin yang dilakukan pada penelitian ini mengacu pada teknik pembuatan yang dilakukan oleh Tauhid & Purwaningsih (2009).

Nilai titer antibodi pada serum darah ikan uji untuk masing-masing kelompok perlakuan memperlihatkan bahwa fluktuasi nilai titer antibodi pada masing-masing kelompok perlakuan sangat variatif, baik terhadap nilai rata-rata persentase sintasan maupun periode pengamatan. Nilai-nilai tersebut selengkapannya dapat dilihat pada Tabel 2. Pada Tabel 2 menunjukkan bahwa nilai titer antibodi yang tinggi hingga pengenceran ke-256 dan terdeteksi pada kelompok perlakuan D (vaksin ECP dengan penyaringan) pada minggu ke-4, dan pada kelompok perlakuan B (vaksin sel utuh) pada minggu ke-5 dan 7.

Ujiantang dengan cara infeksi buatan dengan bakteri homolog pada hari ke-14 pasca pemberian vaksin dilakukan melalui penyuntikan secara *intra peritoneal* pada dosis le-

Tabel 1. Hasil karakterisasi uji-biokimia isolat bakteri *Streptococcus agalactiae*-N14G yang diisolasi dari hasil Koch's Postulate kedua, dan digunakan sebagai *master seed* pembuatan vaksin

Table 1. Biochemical test of *Streptococcus agalactiae*-N14G from Koch's Postulate which used as master seed of vaccine

Uji (Test)	Karakter (Character)
Bentuk (Form)	Kokus (Coccus)
Gram	Positif (Positive)
Motilitas (Motility)	Non motile
Oksidase	Negatif (Negative)
Oksidative/Fermentative	Fermentative
Katalase	Negatif (Negative)
Bile salt 40%	Positif (Tumbuh setelah 48 jam) Positive (Grow after 48 hours)
Tumbuh pada NaCl 6,5% Growth at NaCl 6.5%	Positif (Tumbuh setelah 24 jam) Positive (Grow after 24 hours)
Aesculin hydrolysis	Negatif (Pengamatan 48 jam) Negative (Observation at 48 hours)
Asam D-manitol	Negatif (Pengamatan 48 jam) Negative (Observation at 48 hours)
Haemolysis	Negatif (Negative)

Gambar 1. Beberapa sediaan vaksin *Streptococcus agalactiae*-N14G yang siap untuk digunakan untuk vaksinasi (A) dan pemberian vaksin ke ikan uji melalui teknik penyuntikan secara *intra peritoneal* (B)

Figure 1. Several kind of vaccine of *Streptococcus agalactiae*-N14G which ready to use (A) and vaccine application via *intra peritoneal* injection (B)

thal (LD_{50}) (Gambar 1). Setelah 24 jam pasca pemberian infeksi buatan, terlihat adanya perubahan tingkah laku dan mulai muncul gejala klinis seperti lemah, warna gelap, hilang nafsu makan, disorientasi atau hilang keseimbangan. Pada hari ke-3 hingga hari ke-7 mulai terlihat adanya gejala *uni/bilateral exophthalmia*

dengan kornea mata berwarna pucat, pendarahan pada bagian eksternal, luka, dan pada organ internal menunjukkan gejala adanya *ascites*, pembengkakan limfa, ginjal, hati, dan organ dalam lainnya. Kematian ikan uji pada masing-masing kelompok perlakuan mulai terjadi 24 jam pasca pemberian infeksi buatan,

Tabel 2. Nilai titer antibodi serum darah ikan uji selama proses induksi kekebalan spesifik terhadap *Streptococcus agalactiae*

Table 2. Serum antibody titer value of fish test inspecific immunity induction against *Streptococcus agalactiae*

Sampling	Perlakuan Treatments	Pengenceran (Dilution)									
		0	2	4	8	16	32	64	128	256	512
Minggu (Week) 0	Pooled	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-
Minggu I Week 1	A	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-
	B	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-
	C	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	D	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-
	E	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Minggu II Week 2	A	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-
	C	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	D	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-
	E	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Minggu III Week 3	A	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-
	B	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
	C	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-
	D	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-
	E	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-
	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Minggu IV Week 4	A	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-
	B	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-
	C	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-
	D	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-
	E	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-
	F	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Minggu V Week 5	A	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-
	B	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
	C	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-
	D	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-
	E	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-
	F	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Minggu VI Week 6	A	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-
	B	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-
	C	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-
	D	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-
	E	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-
	F	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Lanjutan Tabel 2 (Table 2 continued)

Sampling	Perlakuan Treatments	Pengenceran (<i>Dilution</i>)									
		0	2	4	8	16	32	64	128	256	512
Minggu VII Week 7	A	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-
	B	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-
	C	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-
	D	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-
	E	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-
	F	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan (*Remarks*):

A = Vaksin biakan cair, B = Vaksin sel utuh, C = Vaksin ECP tanpa penyingkapan, D = Vaksin ECP dengan penyingkapan, E = Kontrol positif dengan *phosphate buffered saline* (PBS), F = Kontrol negatif, tanpa perlakuan (A = *Broth vaccine*, B = *Whole cell vaccine*, C = *Crude ECP vaccine*, D = *Pure ECP vaccine*, E = *Positive control phosphate buffered saline* (PBS), F = *Negative control, without treatment*)

dan rata-rata mortalitas tertinggi mulai terjadi pada hari ke-5 hingga hari ke-11.

Reisolasi bakteri dari sampel ikan uji yang sedang sekarat (*moribund fish*) dari masing-masing kelompok perlakuan menunjukkan bahwa dari organ mata dan otak ditemukan bakteri *S. agalactiae* dengan prevalensi 100%; sedangkan dari organ ginjal dan hati diperoleh nilai prevalensi masing-masing sebesar 70% dan 60%. Berdasarkan hasil tersebut, maka dapat dipastikan bahwa kematian selama proses ujiantang yang terjadi pada ikan nila uji disebabkan oleh infeksi bakteri *S. agalactiae* yang diinfeksi secara buatan.

Rata-rata nilai persentase sintasan pasca ujiantang yang diamati selama tiga minggu terhadap isolat bakteri homolog (*S. agalactiae*-N14G) menunjukkan bahwa secara umum pemberian sediaan vaksin sel utuh (B) memberikan nilai sintasan tertinggi yaitu sebesar 76,0%; selanjutnya diikuti oleh kelompok perlakuan sediaan vaksin biakan cair (A) sebesar 65,0%; sediaan vaksin supernatan tanpa penyingkapan (C) sebesar 49,0% dan sediaan vaksin dengan penyingkapan (D) sebesar 36,0%. Sedangkan pada kelompok kontrol positif dan negatif, masing-masing sebesar 25,0% dan 34,0%. Nilai rata-rata persentase sintasan kumulatif setiap minggu hingga akhir periode pengamatan dari masing-masing kelompok perlakuan selengkapnya disajikan pada Tabel 3.

Selain indikator nilai rata-rata persentase sintasan, efektivitas suatu jenis vaksin juga dapat dievaluasi berdasarkan nilai *relative percent survival* (RPS) yang merupakan nilai

persentase relatif sintasan kelompok ikan yang divaksin dibandingkan dengan nilai parameter yang sama dari kelompok ikan kontrol. Nilai RPS ikan uji pada akhir pengujian dari masing-masing kelompok perlakuan selengkapnya disajikan pada Tabel 4. Pada Tabel tersebut diketahui bahwa nilai RPS tertinggi diperoleh pada kelompok perlakuan pemberian vaksin sel utuh yaitu sebesar 68,00%; selanjutnya diikuti oleh kelompok perlakuan pemberian vaksin biakan cair sebesar 53,37%; vaksin supernatan tanpa penyingkapan sebesar 32,00% dan vaksin supernatan dengan penyingkapan sebesar 14,67%.

Jika ada kematian yang terjadi secara akut selama 24 jam pasca vaksinasi maka mengindikasikan bahwa vaksin yang digunakan berpengaruh negatif terhadap ikan yang divaksin. Pada penelitian ini ternyata tidak ditemukan adanya kematian ikan uji selama 24 jam pasca vaksinasi sehingga vaksin aman untuk diaplikasikan pada ikan.

HASIL DAN BAHASAN

Fluktuasi nilai titer antibodi pada serum darah ikan uji yang sangat variatif tersebut merupakan konsekuensi dari teknik pengamatan yang dilakukan melalui pendekatan populasi atau *pooling system*. Pendekatan teknik ini didasarkan pada kenyataan bahwa ukuran ikan yang digunakan masih relatif kecil (10-15 g/ekor), sehingga untuk mendapatkan sejumlah volume serum darah yang cukup untuk keperluan analisis harus diperoleh dari beberapa ekor ikan uji pada masing-masing kelompok perlakuan. Kesulitan teknis lainnya

Tabel 3. Nilai rata-rata sintasan (%) ikan uji pada akhir proses uji tantangan terhadap *Streptococcus agalactiae*-N14G yang diamati selama 21 hari (tiga minggu)

Table 3. The value of the average survival rate (%) of fish at the end of challenge test against *Streptococcus agalactiae*-N14G which was observed for 21 days (three weeks)

Perlakuan <i>Treatments</i>	Sintasan (<i>Survival rate</i>) (%)		
	Minggu ke-1 <i>Week 1</i>	Minggu ke-2 <i>Week 2</i>	Minggu ke-3 <i>Week 3</i>
A Biakan cair (<i>Broth vaccine</i>)	73.4 ^b	69.0 ^b	65.0 ^b
B Sel utuh (<i>Whole cell vaccine</i>)	87.0 ^a	87.0 ^a	76.0 ^a
C Supernatan tanpa penyaringan <i>Crude extra cellular product</i>	80.0 ^a	63.0 ^b	49.0 ^c
D Supernatan dengan penyaringan <i>Pure extra cellular product</i>	71.2 ^b	63.0 ^c	36.0 ^d
E Kontrol positif dengan <i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS) <i>Positive control Phosphate Buffered Saline (PBS)</i>	45.0 ^d	42.3 ^d	25.0 ^f
F Kontrol negatif, tanpa perlakuan <i>Negative control, without treatment</i>	62.3 ^c	49.0 ^d	34.0 ^e

Keterangan (*Remarks*):

Angka yang diikuti *superscript* yang sama memberikan pengaruh yang tidak berbeda menurut uji Duncan pada taraf 5% (*The number in the same superscript are not significant different according to Duncan test*)

Tabel 4. Nilai sintasan dan persentase relatif sintasan pemberian berbagai sediaan vaksin *Streptococcus agalactiae*-N14G terhadap populasi ikan uji

Table 4. The value of survival rate and relative percent survival after *Streptococcus agalactiae*-N14G vaccine application on fish population

Perlakuan <i>Treatments</i>	Sintasan <i>Survival rate (%)</i>	RPS
A Biakan cair (<i>Broth vaccine</i>)	65	53.37
B Sel utuh (<i>Whole cell vaccine</i>)	76	68
C Supernatan tanpa penyaringan <i>Crude extra cellular product</i>	49	32
D Supernatan dengan penyaringan <i>Pure extra cellular product</i>	36	14.67
E Kontrol positif dengan <i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS) <i>Positive control Phosphate Buffered Saline (PBS)</i>	25	-
F Kontrol negatif, tanpa perlakuan <i>Negative control, without treatment</i>	34	-

yang terkait dengan proses pengambilan serum darah adalah sulit untuk menjamin bahwa ikan yang sudah diambil darahnya pada satu titik pengamatan, sudah pulih kembali dan layak untuk diambil darahnya pada periode pengamatan berikutnya.

Kematian ikan uji pada masing-masing kelompok perlakuan mulai terjadi 24 jam pasca pemberian infeksi buatan, dan rata-rata mortalitas tertinggi mulai terjadi pada hari ke-5 hingga hari ke-11. Nilai rata-rata mortalitas kumulatif yang berkisar antara 24% hingga 75%

selama proses ujiantang yang berlangsung selama 21 hari mengindikasikan bahwa infeksi bakteri *S. agalactiae* pada ikan nila bersifat akut, dan hal ini sesuai dengan kesimpulan Taukhid & Purwaningsih (2009) bahwa secara laboratoris, infeksi *S. agalactiae* pada ikan nila bersifat akut; sedangkan infeksi *S. iniae* lebih bersifat kronis.

Efikasi sediaan vaksin pada penelitian ini yang dievaluasi berdasarkan rata-rata nilai persentase sintasan pasca ujiantang yang diamati selama tiga minggu terhadap isolat bakteri homolog (*S. agalactiae*-N14G) menunjukkan bahwa sediaan vaksin sel utuh (B) memberikan nilai sintasan tertinggi (76,0%), selanjutnya diikuti oleh sediaan vaksin biakan cair (A) (65,0%), sediaan vaksin supernatan tanpa penyaringan (C) (49,0%), dan sediaan vaksin dengan penyaringan (D) (36,0%); sedangkan pada kelompok kontrol positif dan negatif, masing-masing sebesar 25,0% dan 34,0%. Hasil yang relatif sama diperoleh oleh Pasnik *et al.* (2005) yang melakukan pengujian efikasi dan durasi protensi pemberian vaksin *S. agalactiae* terhadap ikan nila dalam bentuk sediaan sel utuh (*formalin killed*) dan sediaan *extracellular product* (ECP) diperoleh rata-rata nilai sintasan yang berbeda nyata antara kelompok ikan yang divaksin dibandingkan dengan kelompok kontrol. Perbedaan tersebut terjadi dari hasil ujiantang yang dilakukan secara seri pada hari ke-47, 90, dan 180 pasca vaksinasi yang diberikan melalui penyuntikan secara *intra peritoneal*. Rataan sintasan pada kelompok ikan kontrol sebesar 16%, 16%, dan 4% untuk masing-masing periode ujiantang. Sintasan pada kelompok ikan yang divaksin sebesar 67%, 62%, dan 49%. Antibodi spesifik pada kelompok ikan yang divaksin masih terdeteksi hingga hari ke-180, sedangkan pada kelompok ikan kontrol tidak mengalami peningkatan hingga akhir penelitian.

Performa dari capaian yang diperoleh masing-masing jenis sediaan vaksin pada penelitian ini dapat dijelaskan sebagai berikut: pada sediaan vaksin sel utuh, unsur-unsur imunogenik yang dimiliki oleh bakteri tersebut masih relatif lengkap, dan tidak ada lagi unsur toksikan karena telah dilakukan pencucian. Pada jenis sediaan vaksin biakan cair, meskipun berisi unsur-unsur imunogenik yang terkandung dalam sel utuh dan supernatan; namun masih mengandung unsur toksikan yang sangat mungkin berlaku sebagai immunosupresif. Kondisi yang sama, terjadi pada jenis sediaan vaksin supernatan dengan

penyaringan maupun tanpa penyaringan. Toksikan berasal dari ECP bakteri dan kandungan formalin. Tetapi penggunaan formalin dalam sediaan vaksin masih dapat diterima dengan catatan bahwa konsentrasinya tidak tinggi sehingga tidak toksik ketika diaplikasikan baik melalui suntik, perendaman maupun melalui pakan. Jung *et al.* (2001) melakukan penelitian mengenai residu formalin 37% pada urat daging ikan olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) dan black rockfish (*Sebastes schlegelii*) setelah divaksin dengan cara perendaman. Residu formalin dalam urat daging dapat luruh hingga konsentrasi yang setara dengan normal (kontrol) setelah 72 jam, yaitu kandungan residu yang terdeteksi pada perlakuan 100 mg/L setelah 1, 24, 48, dan 72 jam berturut-turut adalah 0,8; 0,7; 0,8; 0,9 µg/g. Begitu juga dengan residu pada air pemeliharaan dengan perlakuan 25, 50, 100, 150, dan 200 mg/L yang akan luruh berturut-turut dalam jangka waktu 2, 6, 8, 9, dan 10 hari ketika diaerasi, tanpa diganti air dan luruh dalam jangka waktu 7, 9, 11, 13, dan 19 hari tanpa aerasi dan tanpa ganti air.

Formaldehid yang dipakai untuk membuat bahan buffer formalin merupakan bahan kimia yang umum digunakan dalam proses inaktivasi sediaan vaksin. Fungsi formaldehid adalah untuk menstabilkan komponen protein atau untuk inaktivasi molekul toksin dari bakteri. Formaldehid bereaksi dengan grup asam amino lizin yang merupakan produk tidak stabil membentuk ikan metilen sehingga menjadi grup asam amino yang stabil, reaksi ini dapat terbentuk antar asam amino dengan molekul yang sama sehingga membentuk ikatan silang antar internal protein atau antara dua molekul yang sama sehingga membentuk ikatan silang antar internal protein atau antara dua molekul membentuk ikatan dimer (senyawa kimia yang terdiri atas dua molekul monomer yang identik dan terikat bersama-sama) (Sato *et al.*, 1984).

Relative percentage survival (RPS) merupakan nilai persen relatif sintasan kelompok ikan yang divaksin dibandingkan dengan nilai parameter yang sama dari kelompok ikan kontrol. Ellis (1998) menyatakan bahwa vaksin ikan masuk kategori efektif apabila memiliki nilai RPS ≥ 50%. Berdasarkan kriteria tersebut, maka ada dua jenis sediaan vaksin yang perlu dikembangkan untuk tujuan pencegahan penyakit Streptococcosis pada ikan nila, yaitu jenis vaksin sel utuh yang memiliki nilai RPS sebesar 68,00% dan jenis sediaan vaksin

biakan cair yang memiliki nilai RPS sebesar 53,37%.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Efikasi sediaan vaksin tertinggi diperoleh pada sediaan vaksin sel utuh (B) (76,0%), selanjutnya diikuti oleh sediaan vaksin biakan cair (A) (65,0%), sediaan vaksin supernatan tanpa penyaringan (C) (49,0%), dan sediaan vaksin dengan penyaringan (D) (36,0%); sedangkan pada kelompok kontrol positif dan negatif, masing-masing sebesar 25,0% dan 34,0%.

Efektivitas vaksin yang didasarkan pada nilai RPS, diperoleh dua jenis vaksin kategori efektif, yaitu jenis vaksin sel utuh dengan nilai RPS sebesar 68,00% dan jenis sediaan vaksin biakan cair dengan nilai RPS sebesar 53,37%.

Saran

Perlu kajian yang lebih detail terhadap dosis efektif sediaan vaksin sel utuh dan biakan cair untuk dikembangkan hingga diperoleh produk biologi yang efektif, aplikatif, dan ekonomis dan perlu kajian tentang periode pembentukan dan peluruhan kadar antibodi protektif, sehingga dapat digunakan untuk menentukan perlu tidaknya vaksinasi ulang (*booster*) untuk memberi perlindungan total selama masa pemeliharaan ikan nila.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kepada Saudara Edy Farid, Ahmad Wahyudi, Mikdarullah, dan Bambang Priadi atas bantuannya selama pelaksanaan kegiatan riset. Riset ini dibiayai oleh DIPA 2010 Balai Penelitian dan Pengembangan Perikanan Budidaya Air Tawar, Bogor

DAFTAR ACUAN

Akhlaghi, M., Munday, B., & Whittington, R. 1996. Comparison of passive and active immunization of fish against streptococcosis (enterococcosis). *Journal of Fish Diseases*, 19: 251-258.

Eldar, A., Shapiro, O., Bejerano, Y., & Bercovier, H. 1995. Vaccination with whole-cell vaccine and bacterial protein extracts protects tilapia against *Streptococcus difficile* meningoencephalitis. *Vaccine*, 13: 867-870.

Eldar, A., Horovitz, A., & Bercovier, H. 1997. Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in

farmed rainbow trout. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 56: 175-183.

Ellis, A.E. 1998. *Fish Vaccination*. Academic Press Limited. London, 255 pp.

Evans, J.J., Klesius, P.H., Glibert, P.M., Shoemaker, C.A., Al Sarawi, M.A., Landsberg, J., Duremdez, R., Al Marzouk, A., & Al Zenki, S. 2002. Characterization of beta-haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* (L.) and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. *Journal of Fish Diseases*, 25: 505-513.

Evans, J.J., Klesius, P.H., & Shoemaker, C.A. 2004a. *Streptococcus agalactiae* Vaccine. Invention Report No. 0170.03. ARS Subject Invention Serial# 10/807,575. Filed March 18, 2004. Patent pending.

Evans, J.J., Klesius, P.H., Shoemaker, C.A., & Fitzpatrick, B.T. 2004b. *Streptococcus agalactiae* vaccination and infection stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied Aquaculture*, 22: 3,769-3,773.

Evans, J.J., Shoemaker, C.A., & Klesius, P.H. 2004c. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (Group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. *Vaccine*, 22: 3,769-3,773.

Jung, S.H., Kim, J.W., Jeon, I.G., & Lee, Y.H. 2001. Formaldehyde residues in formalin-treated olive flounder *Paralichthys olivaceus*, black rockfish *Sebastes schlegelii* and seawater. *Aquaculture*, 194: 253-262.

Klesius, P.H., Shoemaker, C.A., & Evans, J.J. 2000. Efficacy of a killed *Streptococcus iniae* vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 19(1): 38-41

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. *Journal of Fish Diseases*, 28(4): 205-212.

Plumb, J.A., Schachte, J.H., Gaines, J.L., Peltier, W., & Carroll, B. 1975. *Streptococcus* sp. from marine fishes along the Alabama and Northwest Florida coast of the Gulf of Mexico. *Transactions of the American Fisheries Society*, 103: 358-361.

Sato, Y., Kimura, M., & Fukumi, H. 1984. Development of a pertussis component vaccine in Japan. *Lancetti*, p. 122-126.

Taukhid & Purwaningsih, U. 2009. Screening isolat, preparasi, dan viabilitas bakteri

Streptococcus spp. sebagai kandidat anti-gen dalam pembuatan vaksin untuk pencegahan penyakit streptococciasis pada ikan nila, *Oreochromis niloticus*. Laporan

Teknis Riset Perikanan Budidaya Air Tawar.
Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar.
(Tidak dipublikasi).