

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/btla>

TEKNIK PREPARASI VAKSIN *Aeromonas hydrophila* DAN *Streptococcus agalactiae* MELALUI METODE KERING BEKU (*FREEZE DRY*)

Setiadi dan Edi Farid Wadjdy

Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan
Jl. Sempur No. 1, Bogor 16129
E-mail: pelnisbpbpat@yahoo.com

ABSTRAK

Penyakit *Motile Aeromonads Septicemia* (MAS) dan *Streptococcosis* yang disebabkan oleh infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Streptococcus agalactiae* merupakan penyakit bakterial yang bersifat akut, menginfeksi semua umur dan jenis ikan air tawar, serta dapat mengakibatkan kematian hingga 100%. Perkembangan penanggulangan penyakit dalam budidaya ikan lebih cenderung memilih cara pencegahan dengan strategi vaksinasi yang secara spesifik dapat melindungi baik dari tipe patogen maupun spesies ikan. Tujuan dari kegiatan ini adalah menyiapkan vaksin *Aeromonas hydrophila* dan *Streptococcus agalactiae* dan mengetahui perbedaan sediaan vaksin kering beku setelah melalui metode *freeze dry*. Metode yang dilakukan adalah pembuatan media kultur bakteri, melakukan Postulat Koch, reisolasi, rekarakterisasi, preparasi sediaan vaksin, uji viabilitas, dan proses kering beku (*freeze dry*). Hasil vaksin *Aeromonas hydrophila* dan *Streptococcus agalactiae* setelah dilakukan *freeze dry* didapatkan hasil dalam bentuk tepung (*powder*) yang berbeda secara organoleptis. Vaksin *Aeromonas hydrophila* diperoleh *powder* dalam jumlah lebih banyak dan berwarna putih kemerahan sedangkan vaksin *Streptococcus agalactiae* memiliki jumlah *powder* yang lebih sedikit dan berwarna kekuningan.

KATA KUNCI: *freeze dry*; vaksin; MAS; *Streptococcosis*

PENDAHULUAN

Penyakit ikan menjadi salah satu kendala serius dalam pengembangan perikanan budidaya. Penyakit juga terbukti sebagai penyebab utama kegagalan produksi pada beberapa komoditas unggulan perikanan budidaya, terutama pada budidaya udang penaeid, ikan kerapu, dan ikan mas. Penyakit dapat menimbulkan berbagai kerugian antara lain penurunan produksi, produktivitas, kualitas, efisiensi, penurunan daya saing, penolakan pasar, menghambat intensifikasi, dan ekstensifikasi budidaya karena usaha budidaya menjadi berisiko tinggi dan tidak berkelanjutan (Tauhid *et al.*, 2015). *Motil Aeromonads Septicemia* (MAS) disebabkan oleh infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*, merupakan penyakit bakterial yang bersifat akut, menginfeksi semua umur dan jenis ikan air tawar, serta dapat mengakibatkan kematian hingga 100%, dan sering menimbulkan kerugian yang signifikan (Kamelia & Laila, 2009). *Streptococcosis* merupakan penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri *Streptococcus sp.*, *Lactococcus sp.*, dan *Vagacoccus sp.*, penyakit ini menyebabkan tingginya kematian ikan nila. Ikan yang

terinfeksi bakteri *Streptococcus* umumnya mengalami infeksi sistemik yang menyerang mata, hati, dan limpa (Gardenia & Koesharyani, 2011). Untuk itu perlu penanggulangan yang efektif dan aplikatif. Perkembangan penanggulangan penyakit dalam budidaya ikan lebih memilih cara pencegahan dengan strategi vaksinasi yang dapat spesifik melindungi baik dari tipe patogen maupun spesies ikan daripada cara pengobatan (terapi). Penggunaan vaksin yang dikombinasikan dengan praktek sistem manajemen budidaya yang baik dapat menjadi substansi pencegahan penyakit sehingga hasil produksi lebih dapat diprediksi. Sediaan vaksin yang selama ini dibuat merupakan vaksin dalam bentuk cair (*water based vaccine*), terdapat beberapa kekurangan untuk sediaan tersebut di antaranya cara pengemasan dan penyimpanan jangka panjang yang kurang praktis, untuk itu perlu dicari solusi yang praktis yaitu dengan cara pembuatan vaksin melalui *freeze dry* (vaksin kering beku). Tujuan dari kegiatan ini adalah menyiapkan vaksin *Aeromonas hydrophila* dan *Streptococcus agalactiae* dan mengetahui perbedaan sediaan vaksin kering beku setelah melalui metode *freeze dry*,

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Kegiatan ini dilakukan pada bulan Juni-Agustus 2016 di Instalasi Riset Pengendalian Penyakit Ikan (IRP2I), Depok yang berada di bawah Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan Bogor.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam kegiatan ini adalah bakteri *Aeromonas hydrophila* isolat AHL0905-2 dan *Streptococcus agalactiae* isolat N₁₄G, Phosfat Buffer Saline (PBS), media *Tryptic Soy Agar* (TSA), *Tryptic Soy Broth* (TSB), *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA), *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB), formalin 100%, alkohol 70%. Sedangkan alat yang digunakan terdiri atas: mesin *freeze dry*, timbangan, cawan petri, batang penyebar (*L glass*), *erlenmeyer*, gelas ukur, *laminar flow*, bunsen, botol semprot, *magnetic stirrer*, jarum ose, inkubator, pipet, *autoclave*, dan botol 10 mL.

METODE

Penyiapan Media

Medium adalah campuran bahan-bahan dalam bentuk cairan atau padatan yang mengandung nutrisi seperti protein, karbohidrat, lemak, mineral, dan sumber nutrisi lain yang dibutuhkan untuk menumbuhkan mikroorganisme. Adapun langkah-langkah penyiapan medium seperti berikut: pembuatan medium *Tryptic Soy Broth* (TSB), dengan cara akuades ditakar dengan menggunakan gelas ukur sebanyak 1.000 mL. Kemudian TSB ditimbang sebanyak 30 g (Gambar 1), dan dicampur dalam akuades dengan menggunakan wadah gelas erlenmeyer ukuran 1.000 mL lalu dipanaskan di atas *hot plate* sambil di-*stirrer* sampai mendidih. Selanjutnya medium tersebut dipindah ke dalam tabung reaksi masing-masing 10 mL/tabung dan ujung tabung ditutup dengan menggunakan kapas.

Tryptic Soy Agar (TSA) ditimbang sebanyak 40 g, dilarutkan dalam akuades 1.000 mL dengan menggunakan wadah gelas erlenmeyer ukuran 1.000 mL, dipanaskan di atas *hot plate* sambil di-*stirrer* sampai mendidih. Untuk media BHIB ditimbang 37 g dilarutkan dalam akuades 1.000 mL, BHIA ditimbang 47 g dilarutkan dalam akuades 1.000 mL, pembuatan media BHIB dan BHIA proses sama seperti pembuatan TSB dan TSA. Selanjutnya media tersebut disterilisasi dengan cara di-*autoclave* pada suhu 121°C 1 atm selama 15 menit (Gambar 2), dibiarkan sampai suhu turun ± 50°C. Setelah sterilisasi selesai media TSA dituang ke dalam cawan petri steril sebanyak 15 mL/petri

secara aseptik (Gambar 3), dibiarkan sampai dingin dan padat. Kemudian cawan petri dibalik untuk mencegah terjadinya tetesan air pada permukaan agar dari hasil kondensasi uap air, setelah itu media tersebut disimpan dalam refrigerator -4°C sampai akan digunakan (Gambar 4).



Gambar 1. Proses penimbangan.



Gambar 2. Proses sterilisasi.



Gambar 3. Proses penuangan media.



Gambar 4. Alat penyimpanan media.

Penyiapan Isolat Bakteri

Bakteri yang digunakan sebagai *master seed* (bibit vaksin) adalah *A. hydrophila* isolat AHL0905-2 dan *S. agalactiae* N₁₄G bakteri tersebut merupakan koleksi BRPBATPP, Bogor. Bakteri diambil dari stok penyimpanan media cair + gliserol yang disimpan di *refrigerator* -20°C (Gambar 5). Kemudian diambil sebanyak 0,1 mL untuk bakteri *A. hydrophila* dikultur

pada media TSB (Gambar 6), diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 28°C (Gambar 7). Sedangkan untuk bakteri *S. agalactiae* dikultur pada media BHIB diinkubasi dalam inkubator selama 72 jam pada suhu 30°C. Inokulan yang telah tumbuh diambil 1 mL ditanam kembali pada media TSB 9 mL untuk bakteri *Aeromonas hydrophila* dan BHIB 9 mL untuk bakteri *Streptococcus agalactiae*, di inkubasi dalam inkubator selama 24 jam, setelah 24 jam bakteri tersebut selanjutnya disuntikkan pada ikan nila sebagai uji postulat Koch.



Gambar 5. Stok bakteri pada penyimpanan media TSB dan BHIB+ Glicerol.



Gambar 6. Proses kultur bakteri.



Gambar 7. Proses inkubasi.

Postulat Koch

Postulat Koch dilakukan untuk membuktikan bahwa isolat bakteri tersebut masih patogen pada ikan. Postulat Koch dilakukan dengan cara menyuntikkan 0,1 mL inokulan pada ikan uji (Gambar 8), selanjutnya ikan tersebut dipelihara pada bak pemeliharaan (Gambar 9), dilakukan pengamatan sampai terdapat gejala klinis. Reisolasi dilakukan terhadap individu ikan uji yang menunjukkan gejala klinis untuk diambil bakterinya (Gambar 10), ada beberapa organ target isolasi bakteri

diantaranya mata, hati, ginjal, otot dan otak. Untuk isolasi bakteri *Aeromonas hydrophila* diisolasi pada bagian otot, sedangkan untuk bakteri *Streptococcus agalactiae* diisolasi pada bagian otak.



Gambar 8. Proses penyuntikan ikan uji.



Gambar 9. Bak pemeliharaan.



A B

Gambar 10. Ikan terinfeksi bakteri *A hydrophila* (A) dan ikan terinfeksi bakteri *S. agalactiae* (B).

Setelah dilakukan isolasi dan didapatkan bakterinya, selanjutnya isolat bakteri tersebut dilakukan pemurnian, setelah didapatkan bakteri murni bakteri tersebut dikarakterisasi, yang mengacu pada SNI 7303-2009 dan SNI 7545.3.2-2009 yang meliputi: pengujian pewarnaan Gram, motilitas, oksidase, katalase, oksidatif-fermentatif, dan uji RS dan pertumbuhan dalam NaCl 6,5%. Karakterisasi merupakan tahapan awal yang dilakukan dalam proses identifikasi bakteri, tahap ini biasanya dapat menentukan jenis bakteri sampai tingkat genus (Wahyudi *et al.*, 2012). Setelah dilakukan karakterisasi bakteri mengarah pada bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Streptococcus agalactiae*. Reisolasi dan rekarakterisasi dimaksudkan untuk memastikan *seed* yang dipakai adalah sesuai dan tidak ada kontaminan. Selanjutnya bakteri tersebut ditanam pada media agar miring diinkubasi dalam inkubator untuk sediaan preparasi vaksin.

Preparasi Sediaan Vaksin Stok Awal

Preparasi vaksin dilakukan dengan cara sebagai berikut: bakteri *Aeromonas hydrophila* hasil Postulat

Koch yang ditumbuhkan dalam media TSA agar miring, dan disimpan dalam inkubator suhu 28°C, dikultur kembali pada media TSA cawan petri ditanam sampai merata pada permukaan agar menggunakan ose, selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 28°C selama 24 jam. Sedangkan untuk bakteri *Streptococcus agalactiae* diambil dari sediaan media BHIA agar miring, dikultur kembali pada media BHIA cawan petri ditanam sampai merata pada permukaan agar menggunakan ose, selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 30°C selama 72 jam. Setelah diinkubasi selama 24 jam untuk bakteri *Aeromonas hydrophila* dan 72 jam bakteri *Streptococcus agalactiae*, bakteri tersebut diperbanyak dengan cara dikultur massal pada media TSA cawan petri dan BHIA cawan petri (Gambar 11).

Selesai dilakukan penanaman dan inkubasi, biakan bakteri yang telah tumbuh merata selanjutnya dilakukan pemanenan dengan menggunakan ose sampai tidak ada yang tersisa pada permukaan media agar dan dilarutkan dalam PBS (Gambar 12). Setelah dilakukan pemanenan, bakteri tersebut dimatikan (*killed*) atau diinaktifasi dengan cara menambahkan formalin, untuk bakteri *Aeromonas hydrophila* ditambahkan 0,3% v/v. Sedangkan untuk bakteri *Streptococcus agalactiae* ditambahkan formalin 1% v/v, supaya tercampur merata dilakukan pengadukan menggunakan *stirrer* selama 3 jam (Gambar 13).

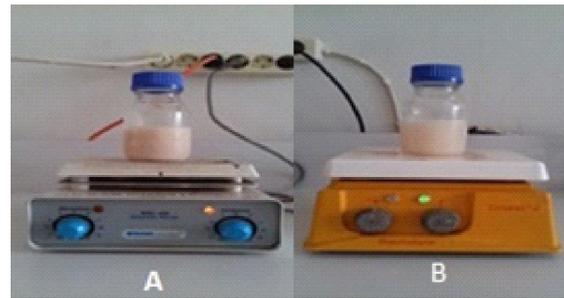
Bakteri hasil inaktifasi kemudian dilakukan uji viabilitas, untuk membuktikan bahwa bakteri tersebut sudah benar-benar inaktif, yaitu dengan cara ditanam



Gambar 11. Proses penanaman bakteri.

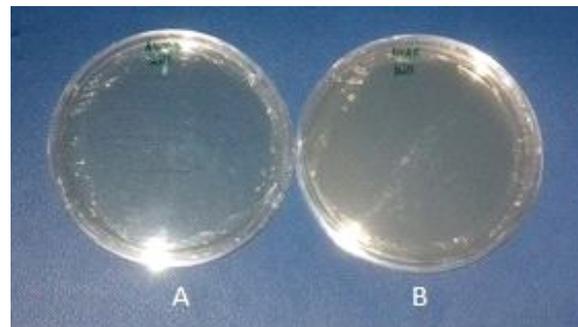


Gambar 12. Proses pemanenan bakteri.

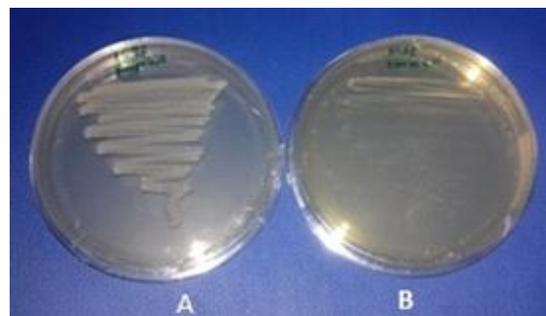


Gambar 13. Proses *killed* bakteri *Aeromonas hydrophila* (A); Proses *killed* bakteri *Streptococcus agalactiae* (B).

kembali bakteri yang telah diinaktifasi pada media kulturnya, yaitu media TSA untuk bakteri *Aeromonas hydrophila*, BHIA untuk bakteri *Streptococcus agalactiae* (Gambar 14). Untuk kontrol dilakukan penanaman bakteri tanpa inaktifasi (Gambar 15), diinkubasi dalam inkubator selama 72 jam dan diamati setiap 24 jam. Setelah lolos uji viabilitas, dan vaksin sudah benar-benar tidak ada bakteri yang tumbuh, vaksin tersebut dimasukkan ke botol masing masing sebanyak 5 mL untuk kemasan 100 mL, selanjutnya vaksin tersebut disimpan pada refrigerator -70°C guna proses *freeze dry*.



Gambar 14. Bakteri *Aeromonas* dengan inaktivasi tidak tumbuh pada media TSA (A); Bakteri *S. agalactiae* dengan inaktivasi tidak tumbuh pada media BHIA (B).



Gambar 15. Bakteri *Aeromonas* tanpa inaktivasi tumbuh pada media TSA (A); Bakteri *S. agalactiae* tanpa inaktivasi tumbuh pada media BHIA (B).

Proses Freeze Dry (Vaksin Beku Kering)

Stok vaksin yang sudah dibekukan dalam refrigerator -70°C (Gambar 16), selanjutnya dilakukan *freeze dry*. Proses *freeze dry* dilakukan sebagai berikut; a) sebelum vaksin dimasukkan dinyalakan terlebih dahulu mesin *cool save*, ditunggu 30-60 menit sampai layar indikator suhu menunjukkan angka $\geq 100^\circ\text{C}$; b) lalu dimasukkan botol yang berisi vaksin pada wadah *vacuum valve* dan ditutup sampai rapat sempurna (Gambar 17). Selanjutnya *vacuum* dinyalakan dan ditunggu sampai diperoleh vaksin kering sempurna yang dibutuhkan waktu sampai 48 jam (Gambar 18). Setelah vaksin kering sempurna, mesin *vacuum* dimatikan dan tutup *vacuum valve* dibuka secara perlahan-lahan. Vaksin yang sudah kering disimpan di refrigerator -20°C hingga digunakan selanjutnya.



Gambar 16. Alat refrigerator -70°C.



Gambar 17. Proses *freeze dry*.



A B

Gambar 18. Sediaan vaksin kering *A. hydrophila* (A); *S. agalactiae* (B).

HASIL DAN BAHASAN

Hasil reisolasi dan rekarakterisasi bakteri setelah uji *postulat Koch* dari bibit vaksin menunjukkan bahwa

seed bakteri target sudah homogen. Hal ini berdasarkan pada pengamatan morfologi dari koloni dan hasil uji pewarnaan Gram. Berdasarkan pewarnaan Gram, isolat AHL 0905-2 adalah bakteri *A. hydrophila* yang merupakan bakteri dari golongan Gram negatif. Sedangkan bakteri isolate *S. agalactiae* N₁₄G merupakan bakteri dari golongan Gram positif. Bakteri *A. hydrophila* yang dibiakkan pada media *Rimler Shotts* terlihat tumbuh dengan koloni berwarna kuning, hasil pengujian disajikan pada Tabel 1 dan 2.

Bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Streptococcus agalactiae* setelah melalui penanaman dan pemanenan bakteri tersebut diinaktivasi dengan cara ditambahkan formalin dan dilakukan uji viabilitas, setelah uji viabilitas, vaksin dibekukan di dalam refrigerator -70°C. Selanjutnya dilakukan *freeze dry* sampai benar-benar kering sempurna, hasil uji viabilitas disajikan pada Tabel 3.

Tabel 1. Hasil karakterisasi uji-biokimia isolat bakteri *Aeromonas hydrophila*

Uji	Karakter
Pewarnaan gram	Negatif
Oksidase	Positif
Katalase	Positif
RS	Kuning
SIM	Motil
O/F	Fermentatif

Tabel 2. Hasil karakterisasi uji-biokimia isolat bakteri *Streptococcus agalactiae*

Uji	Karakter
Pewarnaan gram	Positif
Oksidase	Negatif
Katalase	Negatif
BHIA+ NaCl 6,5%	Positif
Motilitas	Negatif
O/F	Fermentatif

Sediaan kering beku vaksin *A. hydrophila* memiliki berwarna putih kemerahan dengan berat kering 4,2 g. Sedangkan sediaan kering beku vaksin *S. agalactiae* berwarna kekuningan dengan berat kering 2,5 g.

KESIMPULAN

Vaksin *Aeromonas hydrophila* dan *Streptococcus agalactiae* setelah dilakukan *freeze dry* didapatkan hasil *powder* yang berbeda. Untuk vaksin *Aeromonas hydrophila* didapatkan *powder* lebih banyak dan

Tabel 3. Hasil pengamatan vaksin *A. hydrophila* dan *S. agalactiae* setelah viabilitas

Media tumbuh	Inaktivasi (<i>Killed</i>)			Tanpa inaktivasi (<i>Non killed</i>)		
	24 jam	48 jam	72 jam	24 jam	48 jam	72 jam
TSA	-	-	-	+	+	+
BHIA	-	-	-	+	+	+

Keterangan -: negatif; + : positif

berwarna putih kemerahan. Vaksin *Streptococcus agalactiae* memiliki jumlah *powder* yang sedikit dan berwarna kekuningan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Dr. Desi Sugiani, M.Si., selaku kepala Instalasi Penelitian dan Pengembangan Pengendalian Penyakit Ikan Depok dan sebagai ketua peneliti kegiatan vaksin *freeze dry* serta teman-teman teknisi yang telah memberikan dukungan dalam penulisan ini.

DAFTAR ACUAN

Gardenia, L. & Koesharyani, I. (2011). Metode isolasi *deoxyribo nucleic acid* bakteri dari organ ikan nila (*Oreochromis niloticus*) untuk diagnosa *Streptococciosis* dengan teknik *polymerase chain reaction*. *Jurnal Riset Akuakultur*, 6(3), 469-477.

Kamelia, M.O. & Laila, A.M. (2009). Trials for vaccination of tilapia fish against *Aeromonas* and *Pseudomonas* infections using monovalent, bivalent and polyvalent vaccines. *World Journal of fish and marine Sciences*, 1(4), 297-304.

Tauhid, Purwaningsih, U., Sugiani, D., Sumiati, T., & Lusiastuti, A.M. (2015). Efikasi vaksin in-aktif bakteri *Aeromonas hydrophila*-AHL0905-2 (Hydrovac) dan *Streptococcus agalactiae*-N14G (Streptovac) untuk pencegahan penyakit bakterial pada ikan budidaya air tawar. *Jurnal Riset Akuakultur*, 10(4), 541-551.

Wahyudi, A., Priadi, B., Mikdarullah, & Farid, E. (2012). Teknik isolasi karakterisasi, dan identifikasi bakteri *Mycobacterium* spp. Penyebab *fish-tbc* pada ikan gurame (*Osphronemus gourami lac*). *Bulletin Teknik Litkayasa Akuakultur*, 10(1), 49-53.