

PERFORMA VAKSIN IKAN 'TRIVALEN-SA' PASCAPENYIMPANAN SELAMA 12 BULAN UNTUK PENCEGAHAN KO-INFEKSI STREPTOCOCCOSIS DAN MOTILE AEROMONAS SEPTICEMIA PADA IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)

Edy Barkat Kholidin, Edy Farid W., Sudarmaji, Sirodiana, Moh. Abduh, Adang Saputra, Siti Murniasih*, dan Taukhid

Pusat Riset Perikanan, Badan Riset dan Inovasi Nasional

(Naskah diterima: 28 Juni 2024; Revisi final: 04 Oktober 2024; Disetujui publikasi: 04 Oktober 2024)

ABSTRAK

Riset ini bertujuan untuk mengevaluasi efikasi dan keamanan vaksin ikan 'Trivalen-SA' pascapenyimpanan selama 12 bulan untuk pencegahan ko-infeksi streptococcosis dan motile *Aeromonas septicemia* (MAS) pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Ikan uji yang digunakan adalah ikan nila yang sudah *specific pathogen free* dengan bobot $8 \pm 1,2$ g. Perlakuan yang diberikan adalah aplikasi vaksin melalui: (1) Injeksi satu dosis (0,1 mL per ekor), (2) Injeksi dua dosis (0,2 mL per ekor), (3) Perendaman dalam larutan vaksin pada konsentrasi 10^7 CFU mL⁻¹, (4) Injeksi 0,1 mL *phosphate buffered saline* (PBS) sebagai kontrol positif, dan (5) Perendaman dalam air segar selama 30 menit sebagai kontrol negatif. Efikasi vaksin dievaluasi dengan nilai *relative percent survival* (RPS) melalui ujiantang terhadap kedua jenis bakteri infeksi penyusun formula vaksin. Uji keamanan vaksin dilakukan sesuai metode standar pengujian vaksin ikan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa vaksin ikan 'Trivalen-SA' pada pengujian ini masih aman dan protektif dengan hasil secara kuantitatif lebih baik karena nilai RPS terhadap infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* berkisar antara 15,79-29,82%; bakteri *Streptococcus agalactiae* (non-hemolitik) antara 25,92-48,15%, dan bakteri *S. agalactiae* (β -hemolitik) antara 18,52-40,75%. Proteksi sinergis terhadap ko-infeksi ketiga jenis atau biotipe bakteri adalah 27,37% untuk injeksi satu dosis; 39,57% untuk injeksi dua dosis, dan 22,54% untuk perendaman. Hasil terbaik berdasarkan kinerja sintasan dan pertambahan bobot tubuh ikan nila dengan nilai RPS mencapai 39,57% apabila diberikan vaksin melalui injeksi dua dosis (0,2 mL per ekor).

KATA KUNCI: ikan nila; pencegahan ko-infeksi; penyimpanan; vaksin ikan

ABSTRACT: *Performance of the 'Trivalent-SA' Fish Vaccine Following a 12-Month Storage Period for the Prevention of Streptococcosis and Motile Aeromonas Septicemia Co-Infection in Tilapia (*Oreochromis niloticus*)*

A study was conducted to determine the efficacy and safety of the 'Trivalen-SA' fish vaccine after 12 months of storage in preventing co-infection by streptococcosis and motile *Aeromonas septicemia* (MAS) in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Specific pathogen-free tilapia with a weight of $8 \pm 1,2$ g were used as the test fish. The treatments included: (1) Injection with a single dose (0.1 mL per fish), (2) Injection with a double dose (0.2 mL per fish), (3) Immersion with the vaccine solution in 10^7 CFU mL⁻¹, (4) Injection with 0.1 mL phosphate buffered

*Korespondensi: Pusat Riset Perikanan, Badan Riset dan Inovasi Nasional
Email: siti098@brin.go.id

saline (PBS) as a positive control, and (5) Immersion with freshwater for 30 minutes as a negative control. Vaccine efficacy was assessed using relative percent survival (RPS) values obtained from the challenge tests against each bacterial species in the vaccine. Vaccine safety was evaluated according to standard fish vaccine testing protocols. The results showed that the 'Trivalen-SA' vaccine in this study remained safe and effective indicated by RPS value against *Aeromonas hydrophila* ranged from 15.79 to 29.82%, non-hemolytic *Streptococcus agalactiae* ranged from 25.92 to 48.15%, and β -hemolytic *S. agalactiae* ranged from 18.52 to 40.75%. The synergistic protection against co-infection by all three bacterial species or biotypes was 27.37% for the single-dose injection, 39.57% for the double-dose injection, and 22.54% for the immersion method. The best results based on the survival performance and body weight gain of tilapia with an RPS value reached 39.57% when given the vaccine through double-dose injection (0.2 mL per fish).

KEYWORDS: fish vaccine; prevention of co-infection; storage; tilapia

PENDAHULUAN

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dikenal sebagai jenis ikan budidaya yang cepat tumbuh, teknik budidaya yang relatif mudah, serta mampu beradaptasi pada rentang zona-ekologi yang luas. Jenis ikan tersebut juga merupakan salah satu primadona budidaya air tawar, berkontribusi terhadap penyediaan gizi bagi penurunan *stunting*, serta pemasok protein hewani bagi sebagian besar lapisan masyarakat (Suhermanto *et al.*, 2019; Taukhid *et al.*, 2023). Food and Agriculture Organization (2017) mencatat bahwa ikan nila merupakan komoditas akuakultur terbesar kedua setelah *Cyprinidae*, menyumbang sekitar 5% dari total produksi akuakultur global. Indonesia merupakan produsen ikan nila terbesar kedua setelah Cina, dengan produksi nasional pada tahun 2019 mencapai 1.506.156 ton dengan nilai sebesar 34,7 triliun Rupiah (Kementerian Kelautan dan Perikanan, 2021).

Budidaya ikan nila umumnya dilakukan tanpa sentuhan khusus yang bertujuan untuk mencegah penyakit dan/atau meningkatkan ketahanan tubuh ikan terhadap infeksi organisme patogenik. Terlebih lagi, pembudidayaan ikan nila banyak dilakukan pada lingkungan perairan yang sulit dikontrol seperti sungai, danau, waduk, dan perairan terbuka lainnya; sehingga proses penularan penyakit lebih sulit dikendalikan. Penyakit

utama selama siklus produksi ikan nila adalah akibat infeksi bakteri *Streptococcus* spp. (streptococcosis) (Taukhid *et al.*, 2023) dan *Aeromonas* spp. (motile *Aeromonas* septicemia: MAS) (Amal *et al.*, 2018; Dong *et al.*, 2017; Stratev & Odeyemi, 2017), atau ko-infeksi oleh kedua jenis bakteri tersebut (Pradeep *et al.*, 2017; Taukhid *et al.*, 2023).

Streptococcosis merupakan penyakit dengan prevalensi tinggi pada komoditas ikan nila dibanding komoditas budidaya ikan air tawar lainnya, sedangkan MAS merupakan penyakit lintas species ikan air tawar yang selalu terlibat dan memperparah kasus penyakit infeksius yang diinisiasi oleh jenis patogen lainnya (Taukhid, 2018). Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP) telah menetapkan kedua jenis penyakit tersebut sebagai penyakit utama di Indonesia (Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya, 2014), dengan kerugian ekonomi akibat penyakit MAS sebesar 150 miliar Rupiah per tahun, dan streptococcosis pada ikan nila mencapai 15 miliar Rupiah per tahun (Lusiastuti *et al.*, 2020).

Streptococcosis pada budidaya ikan air tawar lebih banyak dilaporkan pada ikan nila; bahkan dianggap sebagai penyakit utama pada jenis ikan tersebut. Berdasarkan hasil surveilan dan *monitoring* periode 2008–2019, streptococcosis pada ikan nila di Indonesia hanya ditemukan satu jenis bakteri yaitu *Streptococcus agalactiae* (Suhermanto *et al.*,

2019; Taukhid *et al.*, 2014). *Biotyping* terhadap isolat bakteri *S. agalactiae* dari sentra-sentra budidaya ikan nila (Sumatera, Jawa, Kalimantan, dan Sulawesi), ditemukan dua biotipe, yaitu *S. agalactiae* β -hemolitik (biotipe-1) yang banyak ditemukan pada ikan nila di luar Pulau Jawa, sedangkan biotipe-2 merupakan varian yang dominan di wilayah Pulau Jawa (Suhermanto *et al.*, 2019; Taukhid *et al.*, 2021). *Aeromonas hydrophila* merupakan bakteri penyebab utama penyakit MAS atau sering disebut “Penyakit Merah” pada ikan air tawar. Infeksi buatan terhadap beberapa jenis ikan air tawar menunjukkan patogenisitas tinggi dengan pola kematian bersifat akut - per akut (1–5 hari) dan sporadis dengan tingkat mortalitas 50-100% (Taukhid *et al.*, 2015).

Pada budidaya ikan yang dilakukan secara intensif, penggunaan bahan pengendali penyakit merupakan salah satu komponen yang masih sulit untuk dihindari, terutama berkenaan dengan penggunaan obat atau antibiotik. Paradigma strategi pengelolaan kesehatan ikan harus diarahkan pada upaya pencegahan dan pengendalian yang efektif, efisien, dan ramah lingkungan, kemudian tidak lagi mengandalkan pada penggunaan obat atau antibiotik dalam pencegahan maupun pengobatan yang sejatinya memiliki dampak negatif baik terhadap ikan, lingkungan perairan maupun konsumen.

Pencegahan penyakit ikan melalui vaksinasi dianggap sebagai pendekatan yang efektif dan aman, baik terhadap lingkungan maupun konsumen. Vaksinasi ikan di beberapa negara telah terbukti memberikan kontribusi yang signifikan dalam meningkatkan produksi akuakultur, mengurangi penggunaan bahan kimia atau antibiotik, dan resistensi patogen terhadap antibiotik (Chideroli *et al.*, 2017). Penelitian dan pengembangan vaksin ikan di Indonesia untuk pencegahan penyakit MAS telah dimulai sejak tahun 1980-an, sedangkan vaksin untuk penyakit streptococcosis pada ikan nila dimulai sejak tahun 2000-an (Dwinanti *et al.*, 2014; Firdausi *et al.*, 2018; Nisaa *et al.*, 2016; Rahmi *et al.*, 2021; Reynalta *et al.*, 2019; Sukenda *et al.*, 2018; Taukhid & Purwaningsih,

2011; Taukhid *et al.*, 2014; Taukhid *et al.*, 2021).

Vaksin ikan ‘Trivalen-SA’ merupakan produk biologi yang dibuat dan diformulasikan dari kombinasi tiga antigen bakteri (*S. agalactiae* biotipe-1 dan 2 serta *A. hydrophila*). Produk tersebut merupakan pengembangan dari produk vaksin monovalen dan bivalen, dan saat ini dalam proses perolehan paten dengan Nomor Permohonan P00202312452. Sediaan vaksin ikan tersebut memiliki beberapa keunggulan, di antaranya mampu mencegah ko-infeksi penyakit streptococcosis dan MAS pada ikan nila di wilayah yang lebih luas, karena diformulasikan dari varian atau biotipe bakteri yang merepresentasikan keberadaannya di Indonesia.

Stabilitas vaksin merupakan jaminan mutu yang harus dipenuhi oleh suatu produk vaksin, salah satunya ditentukan oleh protokol standar penyimpanan, penanganan dan durasi penyimpanan agar potensi vaksin tetap optimal (World Health Organization, 1979). Penentuan masa berlaku vaksin dengan memperkirakan kehilangan potensi selama periode penyimpanan, harus melalui prosedur pengujian terkait efikasi dan keamanannya. Permen KP No. 1 Tahun 2019 tentang obat ikan, dan peraturan turunannya yaitu Peraturan Direktur Jenderal Perikanan Budidaya No. 25/PER-DJPB/2016 tentang pedoman pengujian obat ikan, mempersyaratkan penentuan masa kadaluarsa materi pengendali penyakit ikan dalam bentuk sediaan biologi (c.q. vaksin ikan adalah $\approx$ 12 bulan). Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efikasi dan keamanan vaksin ‘Trivalen-SA’ yang telah disimpan selama 12 bulan pada suhu 4-8°C untuk pencegahan ko-infeksi streptococcosis dan MAS pada ikan nila.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan September-Desember 2023, bertempat di Laboratorium basah Kawasan Sain dan Teknologi (KST) Ir. Soekarno, Badan Riset dan

Inovasi Nasional (BRIN) - Cibinong. Analisis mikrobiologi dan histopatologi dilakukan di Laboratorium Genomik di Kawasan Sain dan Teknologi (KST) Ir. Soekarno, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) - Cibinong.

Ikan Uji

Ikan uji yang digunakan berasal dari populasi ikan nila galur nirwana yang bersifat *specific pathogen free* (SPF) dari penyakit streptococcosis dan MAS, sebanyak ≈ 2.000 ekor dengan rata-rata bobot tubuh $8 \pm 1,2$ g per ekor. Populasi ikan tersebut diperoleh dari Instalasi Riset Plasma Nutfah Perikanan Air Tawar (IRPNPAT), Cijeruk - Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan (BRPBATPP). Sebelum digunakan sebagai ikan uji, dilakukan sampling acak sebanyak 30 ekor (Amos, 1985) untuk pemeriksaan keberadaan bakteri target dengan asumsi nilai hipotetik prevalensi 10%. Penerapan sistem biosekuriti akuakultur pada budidaya ikan nila di IRPNPAT masih parsial, sehingga status populasi SPF yang ditetapkan pada pengujian ini adalah: apabila nilai prevalensi $\leq 10\%$, diasumsikan populasi SPF, dan sebaliknya apabila nilai prevalensi $> 10\%$ diasumsikan populasi non-SPF.

Isolasi bakteri dilakukan secara aseptik dari organ ginjal, limpa, dan hati. Bakteri yang diisolasi dari masing-masing organ dibiakkan secara terpisah pada media *tryptic soy agar* (Difco™) dan/atau *brain heart infusion agar* (Difco™). Analisis karakteristik bakteri meliputi pewarnaan Gram, motilitas, oksidase, *Rimmler-Shott*, katalase, uji O/F, *triple sugar iron agar* (TSIA), dan reaksi biokimia lainnya dengan menggunakan API 20 E dan API 20 Strep (Biomereux). Selanjutnya, proses identifikasi dilakukan sesuai dengan SNI 7545.3-2009 (Badan Standardisasi Nasional, 2009); SNI 7303.1-2015 (Badan Standardisasi Nasional, 2015) serta Austin & Austin (2016).

Proses aklimatisasi dilakukan selama 1 minggu pada dua bak fiber glass volume 1.000 L, dan sumber air berasal dari air tanah (sumur bor). Penambahan oksigen terlarut dilakukan melalui penggunaan aerasi, dan penggantian air baru sebanyak 10% dari total volume per hari yang

dilakukan pada pagi hari sebelum pemberian pakan. Pakan yang digunakan berupa pelet komersial dengan kadar protein kasar sebesar $\approx 28\%$, dan diberikan dua kali secara *ad libitum* sebanyak 3% per hari dari bobot biomassa ikan.

Vaksinasi

Vaksin yang digunakan adalah produk vaksin ikan 'Trivalen-SA' yang telah disimpan selama 12 bulan (November 2022-Oktober 2023) pada suhu 4-8 °C. Proses pembuatan, komposisi, dan formulasi vaksin selengkapnya mengikuti prosedur pada deskripsi dokumen Permohonan Paten Nomor P00202312452. Perlakuan yang diterapkan pada pengujian ini terdiri dari lima faktor utama, yaitu: (A). Vaksinasi melalui penyuntikan sebanyak satu dosis (0,1 mL per ekor), (B). Penyuntikan dua dosis (0,2 mL per ekor), (C). Perendaman dalam larutan vaksin (1 mL 10 L^{-1} atau konsentrasi bakterin 10^7 CFU mL^{-1}) selama 30 menit, (D). Penyuntikan *phosphate buffered saline* (PBS) dosis 0,1 mL ekor⁻¹ sebagai kontrol positif, dan (E) Perendaman dalam air segar sebagai kontrol negatif. Semua perlakuan termasuk kontrol diulang sebanyak tiga kali.

Wadah Pemeliharaan dan Aplikasi Vaksinasi

Wadah ikan uji berupa bak plastik volume 70 L yang diisi air sebanyak 50 L dengan kepadatan ikan 25 ekor per wadah. Masing-masing kelompok perlakuan dilakukan pengulangan tiga kali. Sumber air berasal dari air tanah (sumur bor), dan seluruh kelompok perlakuan terhubung dalam satu unit sistem resirkulasi; sedangkan kelompok lainnya (kontrol) menggunakan unit resirkulasi terpisah.

Aplikasi vaksinasi melalui penyuntikan dilakukan secara *intra peritoneal* (IP) pada dosis yang telah ditetapkan, sementara vaksinasi melalui perendaman dilakukan dengan cara memasukkan ikan uji dalam larutan vaksin pada dosis 10^7 CFU mL^{-1} (1 mL 10 L^{-1}) selama 30 menit (Gambar1). Sebagai kontrol, dibuat dua *batch* atau kelompok yaitu perendaman tanpa

larutan vaksin dan penyuntikan dengan larutan PBS, masing-masing sebagai pembanding dari kelompok perlakuan yang telah disebutkan di atas. Selanjutnya ikan uji dipelihara selama $\approx$ 5 minggu, yang mengacu pada periode induksi kekebalan spesifik.

Efikasi Vaksin

Efikasi vaksin dievaluasi berdasarkan level proteksi relatif melalui ujiantang, selanjutnya diukur dengan parameter *relative percent survival* (RPS), dihitung menurut formula yang dikembangkan Amend (1981). *Relative percent survival* dihitung berdasarkan rumus: $RPS (\%) = (1 - \{\% \text{ mortalitas ikan yang divaksin} / \% \text{ mortalitas ikan kontrol}\}) \times 100$.

Proses ujiantang terhadap patogen target (desain secara terpisah untuk masing-masing jenis patogen) melalui infeksi buatan. Nilai LD_{50} untuk masing-masing isolat bakteri ditetapkan sesuai dengan nilai yang diterapkan pada pengujian serupa pada deskripsi dokumen paten Nomor Permohonan P00202312452 (*S. agalactiae* (SG01-16) adalah $\approx 10^4$ CFU mL⁻¹ (β -hemolitik), *S. agalactiae* (N14G) (α -hemolitik) $\approx 10^5$ CFU mL⁻¹, dan *A. hydrophila* (AHL0905-2) $\approx 10^6$ CFU mL⁻¹). Pada invensi ini, nilai 25 LD_{50} untuk bakteri *S. agalactiae* (SG01-16) adalah $\approx 10^4$ CFU mL⁻¹, *S. agalactiae* (N14G) $\approx 10^5$ CFU mL⁻¹, dan *A. hydrophila* (AHL0905-2) $\approx 10^6$ CFU mL⁻¹.

Ujiantang terhadap bakteri *A. hydrophila* AHL0905-2 dilakukan melalui penyuntikan secara IP dengan isolat bakteri *A. hydrophila* AHL0905-2 pada dosis letal 50% (10^6 CFU mL⁻¹). Wadah uji berupa bak plastik volume 70 L diisi ikan sebanyak 6 ekor per wadah. Setiap kelompok perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Pengamatan terhadap tingkah laku, gejala klinis, dan mortalitas ikan uji dilakukan setiap hari selama 10 hari.

Ujiantang terhadap bakteri *S. agalactiae* dilakukan terhadap masing-masing biotipe (*batch* pengujian yang berbeda). Seperti halnya terhadap bakteri *A. hydrophila*, proses infeksi buatan dilakukan dengan cara penyuntikan IP dengan bakteri *S. agalactiae* N14G dan *S. agalactiae* SG01-16 pada dosis letal 50%

(10^4 CFU mL⁻¹). Wadah uji berupa bak plastik kapasitas 70 L diisi air sebanyak 50 L. Wadah ikan uji untuk kontrol menggunakan bak plastik dengan ukuran yang sama dengan bak ujiantang, namun diletakkan terpisah. Masing-masing wadah diisi ikan sebanyak 6 ekor. Setiap kelompok perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali.

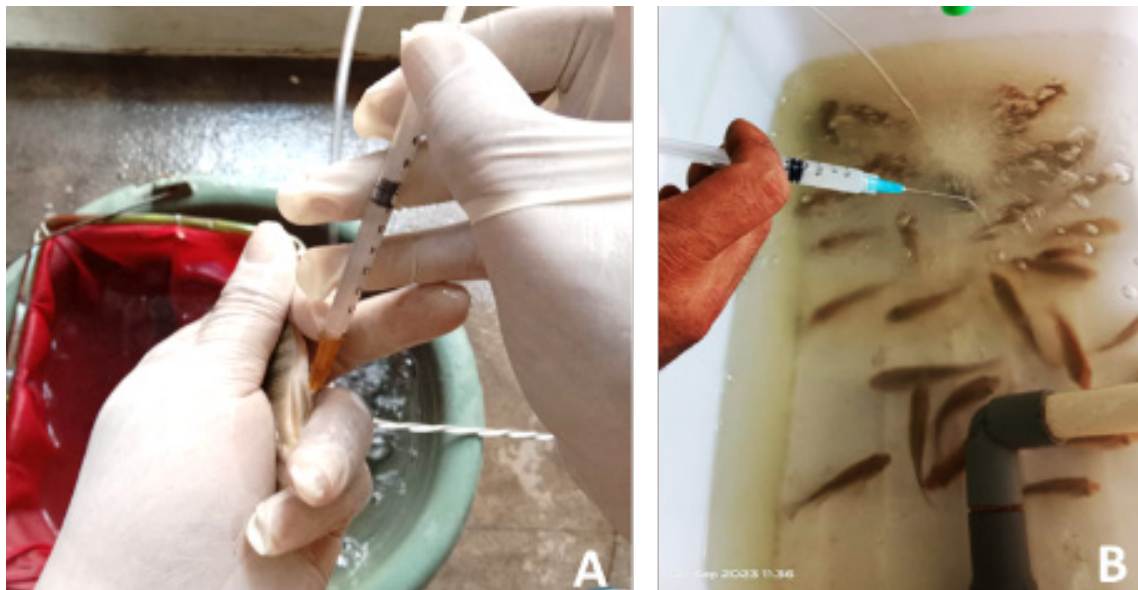
Untuk kontrol negatif tidak dilakukan ujiantang. Pengamatan terhadap tingkah laku, gejala klinis dan mortalitas ikan uji dilakukan setiap hari selama 28 hari. Perbedaan periode pengamatan didasarkan pada karakteristik serangan dari masing-masing jenis patogen yang digunakan pada pengujian ini (akut vs kronis).

Keamanan Vaksin

Keamanan vaksin dievaluasi dengan metode standar menurut *Council Directive 81/852/EEC for the production and control of live and inactivated vaccines intended for fish* (Committee for Medicinal Products for Veterinary Use, 2013); yaitu dengan cara memberikan vaksin dua kali dosis efektif melalui penyuntikan secara IP, dan kelompok kontrol dengan larutan PBS. Wadah uji berupa bak plastik volume 70 L, dan diisi ikan sebanyak 25 ekor per wadah. Setiap kelompok perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Pengamatan dilakukan selama 14 hari pascapemberian vaksin terhadap kelainan perilaku, patologis-anatomis, gejala klinis, toksisitas umum serta mortalitas ikan uji. Apabila selama periode pengamatan terdapat individu yang menunjukkan indikator tersebut sebagai akibat dari pemberian vaksin, maka spesimen ikan tersebut harus dilanjutkan dengan analisis secara laboratoris.

Pengamatan dan Analisis

Pengamatan terhadap tingkah laku, gejala klinis, mortalitas ikan uji dilakukan setiap hari hingga akhir berlangsungnya proses penelitian. Selama periode ujiantang, dilakukan pengambilan sampel secara acak sebanyak tiga ekor dari masing-masing kelompok perlakuan untuk diagnosis atau identifikasi



Gambar 1. Teknik vaksinasi. A. Injeksi secara *intra peritoneal* dan B. Perendaman dalam larutan vaksin

Figure 1. Vaccination methods. A. Intra-peritoneal injection and B. Immersion in vaccine solution

patogen target. Diagnosis serupa juga dilakukan terhadap sampel sekarat (*moribund*) dari masing-masing kelompok perlakuan. Pemeriksaan histopatologi dilakukan terhadap spesimen dari setiap kelompok, baik yang terpapar streptococcosis maupun MAS, dan ditujukan sebagai konfirmasi diagnosis.

Data sintasan dan/atau mortalitas dianalisis sidik ragam atau *analysis of variance* (ANOVA) untuk mengetahui pengaruh perlakuan yang diterapkan. Data terlebih dahulu diuji homogenitas, normalitas dan/atau 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 perlakuan.

Pernyataan Ethical Clearance

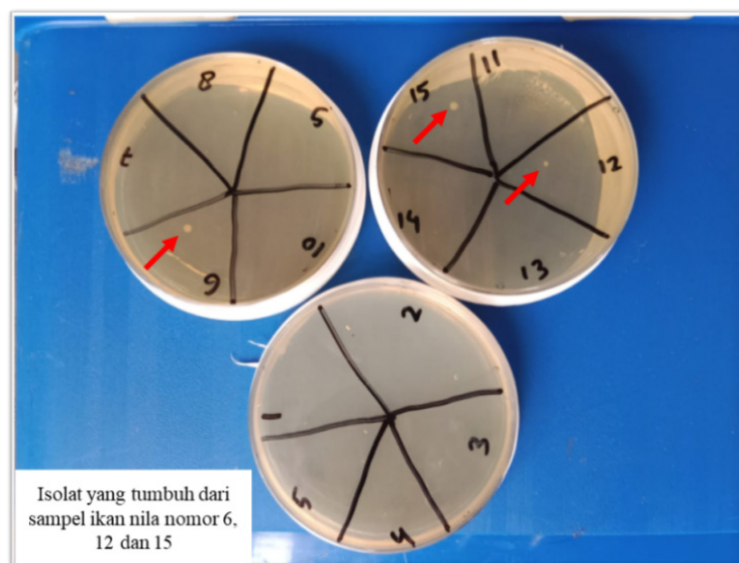
Proses pemeliharaan ikan dalam penelitian ini mengacu pada SNI 01-6141-1999 (Produksi Benih Ikan Nila Hitam *Oreochromis niloticus* Bleeker Kelas Benih Sebar) yang dikeluarkan oleh Badan Standardisasi Nasional (1999)

untuk menjamin ikan yang dipelihara dalam kondisi tidak mengalami tekanan yang berakibat ketidaknyamanan ikan nila sebagai obyek penelitian.

HASIL DAN BAHASAN

Screening awal terhadap populasi ikan nila sebelum digunakan sebagai ikan uji terhadap keberadaan *A. hydrophila* dan *S. agalactiae* dengan hipotetik prevalensi sebesar 10%, tidak ditemukan adanya infeksi bakteri target. Hasil isolasi ditemukan adanya pertumbuhan koloni bakteri yang diduga sebagai bakteri *A. hydrophila* dan/atau *S. agalactiae* pada sampel nomor 6, 12, dan 15 (Gambar 2), namun setelah dilakukan karakterisasi terhadap karakter utama (Tabel 1 dan 2), koloni tersebut bukan merupakan bakteri *A. hydrophila* dan *S. agalactiae* (Tabel 3). Berdasarkan kriteria status SPF yang dibangun, maka dapat disimpulkan bahwa populasi ikan nila yang digunakan pada pengujian ini adalah SPF terhadap patogen target, dan memenuhi persyaratan teknis sebagai ikan uji pada proses selanjutnya.

Selama periode aklimatisasi hingga sesaat sebelum perlakuan, tidak ditemukan adanya



Gambar 2. Koloni bakteri (tanda panah) yang diisolasi dari target organ ikan nila (*Oreochromis niloticus*) pada media *brain heart infusion agar*

Figure 2. Bacterial colonies (arrow) on *brain heart infusion agar* medium isolated from the target organs of *tilapia (Oreochromis niloticus)*

abnormalitas tingkah laku dan kematian ikan uji; namun selama periode induksi kekebalan pascapemberian vaksin hingga sesaat sebelum proses ujiantang, sebanyak tiga ekor ikan mengalami kematian (Tabel 4). Analisis mikrobiologis terhadap spesimen yang mengalami kematian, tidak ditemukan adanya infeksi bakteri patogen, baik *A. hydrophila* maupun *S. agalactiae* pada organ target; namun menunjukkan gejala abrasi dan luka pada ujung mulut yang serius sehingga mengakibatkan kematian. Hasil analisis ini memperkuat hasil *screening* sebelum penetapan ikan uji sebagai populasi ikan nila SPF.

Sesaat sebelum proses ujiantang, secara acak sebanyak 20 ekor dari masing-masing kelompok perlakuan diambil dan dilakukan pengukuran panjang-bobot tubuh ikan untuk mengetahui pola pertumbuhan selama periode induksi kekebalan yang berlangsung 35 hari. Rataan pola pertumbuhan selama periode tersebut dapat dilihat pada Gambar 3. Gambar 4 mengisyaratkan bahwa pemberian vaksin 'Trivalen-SA' yang telah disimpan selama 12 bulan, tetap berdampak positif terhadap rata-rata pola pertumbuhan ikan, bahkan pada kelompok perlakuan injeksi dua dosis memperlihatkan rata-rata pola pertumbuhan yang relatif lebih

baik dibanding dengan kelompok lainnya.

Isolasi bakteri dari ikan uji yang diambil secara acak dari setiap kelompok perlakuan selama periode ujiantang, menunjukkan bahwa pada kelompok yang diinfeksi oleh masing-masing jenis bakteri, pada organ target ditemukan jenis bakteri yang sama dengan yang diinfeksi. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa bakteri patogen yang diinfeksi berkemampuan infeksi, patogenik, dan sistemik. Gejala klinis yang teramati pada individu ikan yang sakit dan sekarat (*moribund*), menunjukkan konsistensi pada seluruh kelompok perlakuan. Pada ikan uji yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila*, gejala klinis yang teramati dan konsisten adalah kulit melepuh (*blister* dan pendarahan (*hemorrhage*) yang berkembang menjadi ulser (Gambar 4A). Gejala klinis umum penyakit MAS yang terjadi secara alamiah pada ikan budidaya air tawar, antara lain: warna tubuh kusam atau gelap, kulit kasar, eksesi mukus, pendarahan pada pangkal sirip, sisik lepas, luka, dan perut bengkak (*dropsy*) (Dong *et al.*, 2017; Hoai *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2018; Tauhid *et al.*, 2015).

Pada ikan uji yang diinfeksi bakteri *S. agalactiae*, gejala klinis yang teramati adalah kornea mata keruh (*corneal opacity* atau

Tabel 1. Morfologi dan karakter bio-kimia isolat bakteri *Streptococcus agalactiae* (SG01-16, biotipe-1, β - hemolitik) dan *Streptococcus agalactiae* (N14G, biotipe-2, non-hemolitik)
 Table 1. Morphology and bio-chemical character of bacterial isolates of *Streptococcus agalactiae* (SG01-16, biotype-1, β - hemolytic) and *Streptococcus agalactiae* (N14G, biotype-2, non-hemolytic)

Karakter morfologi dan bio-kimia Morphological and bio-chemical characters	<i>Streptococcus agalactiae</i> (SG01-16)	<i>Streptococcus agalactiae</i> (N14G)
Bentuk Shape	Coccus	Coccus
Motilitas Motility	-	-
Gram	+	+
Oksidase Oxidase	-	-
O/F	F	F
Tumbuh pada 37°C Grown at 37°C	+	+
Catalase	-	-
Bile salt 40%	-	+ (setelah 48 jam) + (after 48 hours)
NaCl 6.5%	+	+ (setelah 24 jam) + (after 24 hours)
Esculin hydrolase	-	-
D-Mannitol acid	-	-
Produksi acetonin Production of acetoin	+	+
Hipuric acid	+	+
Escullin fer. Citrate	-	-
Pyrrolidonyl arylamidase	-	-
α -Galactosidase	-	-
β -Glucuronidase	-	-
β -Galactosidase	-	-
Sodium piruvate	+	+
Leucine aminopeptidase	-	-
L-Arginin	+	+
L-arabinose	-	+
Alkaline Phosphatase	-	-
Glycogen	-	-
Hemolysis (BHIA + 5% sheep erythrocyte)	Beta hemolitik Beta hemolytic	Non-hemolitik Non-hemolytic

Keterangan: (+): positive, (-): negative, F: fermentatif. Beberapa uji bio-kimia dilakukan dengan menggunakan kit API 20 Strep
 Description: (+): positive, (-): negative, F: fermentative. Several biochemical tests were performed using API 20 Strep kit

Tabel 2. Morfologi dan karakter bio-kimia isolat bakteri *Aeromonas hydrophila* (AHL0905-2)
 Table 2. Morphology and bio-chemical character of *Aeromonas hydrophila* (AHL0905-2) isolate

Karakter bio-kimia Bio-chemical characters	<i>Aeromonas hydrophila</i> (AHL0905-2)
Bentuk Shape	Batang pendek Short rod
Motilitas Motility	+
Gram	-
Oxidase	-
O/F	F
Tumbuh pada 37°C Grown at 37°C	+
Catalase	-
Bile salt agar 40%	-
Esculin hydrolysis	+
Voges-Proskauer	+
Diffusible brown pigment	-
B-galactosidase	+
Arginine dihydrolase	+
Arabinosa	+
Glucose	+
Lysine decarboxylase	V
Ornithine decarboxylase	-
Simmons citrate	V
H ₂ S production	+
Urease	-
Indole	+
Gelatine hydrolysis	+
Aesculin hydrolysis	+
Tumbuh pada media KCN Grown in KCN medium	+
D-melibiose	-
Amygdalin	+
L-arabinose	-
Hemolysis (TSA + 5% sheep erythrocyte)	+

Keterangan: (+): positive, (-): negative, V: bereaksi variabel. Beberapa uji bio-kimia dilakukan dengan menggunakan kit API 20 E

Description: (+): positive, (-): negative, V: variable reaction. Several biochemical tests were performed using API 20 E kit

Tabel 3. Hasil analisis karakter utama isolat bakteri pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) sebelum digunakan sebagai ikan uji.

Table 3. Analysis of the main characteristics of bacterial isolates from tilapia (*Oreochromis niloticus*) before being used as the test fish.

Nomor sampel Number of samples	Uji biokimia Bio-chemical tests			Keterangan Description
	Warna koloni Colony color	Katalase Catalase	Oksidase Oxidase	
1	Tidak tumbuh Not grow	-	-	-
2	Tidak tumbuh Not grow	-	-	-
3	Tidak tumbuh Not grow	-	-	-
4	Tidak tumbuh Not grow	-	-	-
5	Tidak tumbuh Not grow	-	-	-
6	Putih White	+	+	Non-Streptococcus & Aeromonas
7	Tidak tumbuh Not grow	-	-	-
8	Tidak tumbuh Not grow	-	-	-
9	Tidak tumbuh Not grow	-	-	-
10	Tidak tumbuh Not grow	-	-	-
11	Tidak tumbuh Not grow	-	-	-
12	Putih White	+	+	Non-Streptococcus & Aeromonas
13	Tidak tumbuh Not grow	-	-	-
14	Tidak tumbuh Not grow	-	-	-
15	Putih White	+	+	Non-Streptococcus & Aeromonas

Keterangan: (+) positive, (-) negative

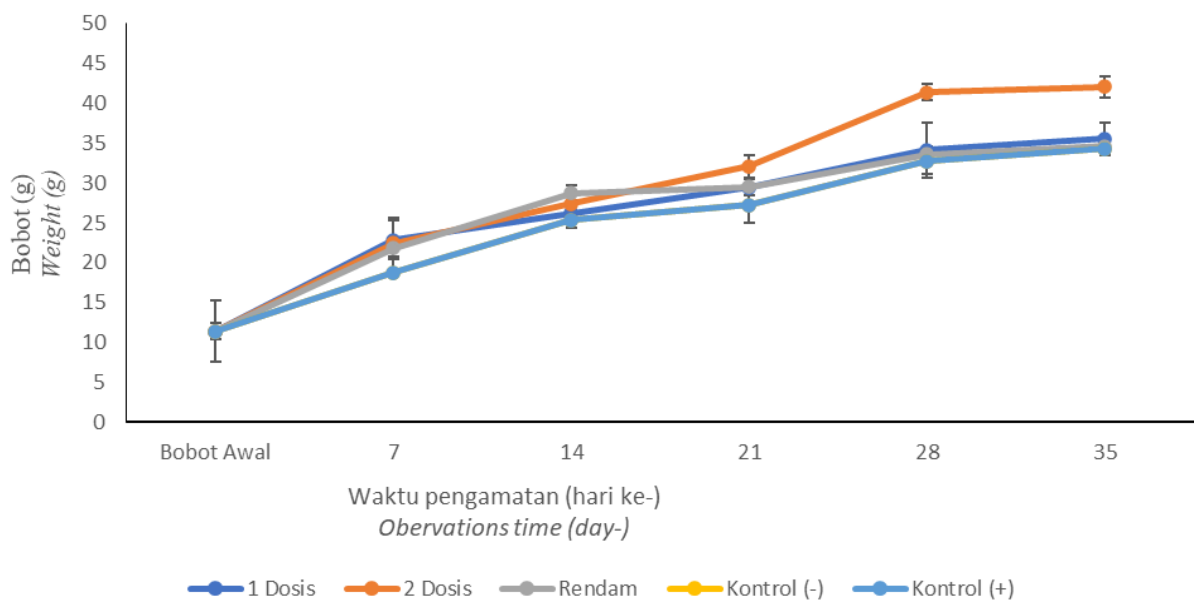
Description: (+) positive, (-) negative

cataract), dan pendarahan pada pangkal sirip (Gambar 4B). Secara umum, gejala klinis streptococcosis yang terjadi secara alamiah pada ikan nila, antara lain: perubahan warna tubuh menjadi lebih gelap atau lebih pucat, mata menonjol (*exophthalmos*), kornea mata keruh, perut bengkak (*dropsy* atau *ascites*), pendarahan (*hemorrhage*) di pangkal sirip,

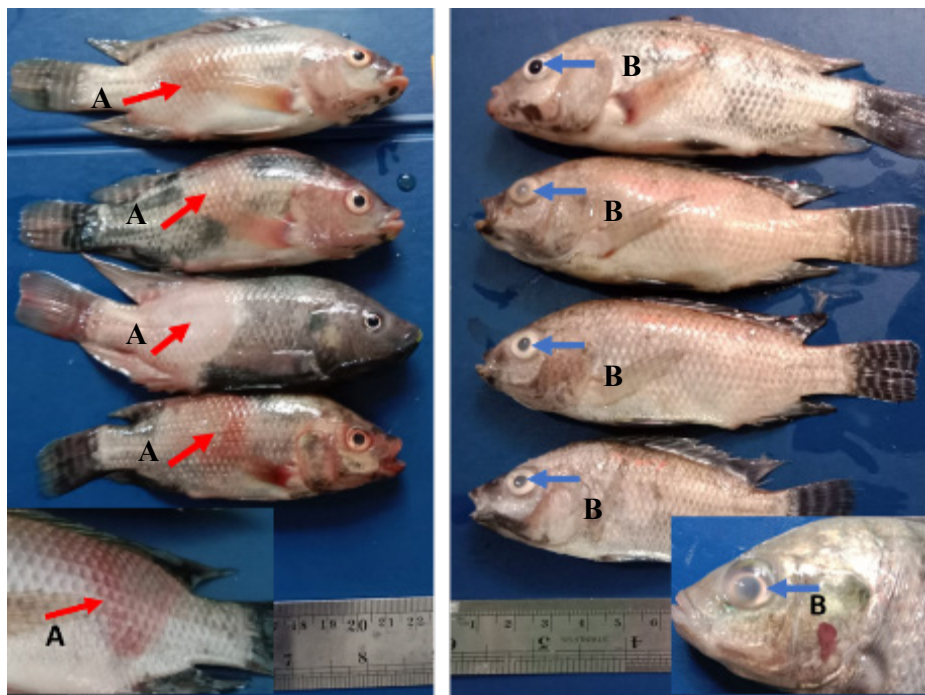
mata, insang, deformasi tulang belakang, pembengkakan hati, limpa, dan ginjal (Gambar 4A). Gejala yang paling khas dari penyakit ini adalah gangguan pada otak dan mata, sehingga sering disebut sebagai "*meningoencephalitis and panophthalmitis syndrome*" (Hardi *et al.*, 2011; Iregui *et al.*, 2014; Kayansamruaj *et al.*, 2014; Sarjito *et al.*, 2021; Suhermanto *et al.*, 2019;

Tabel 4. Gejala klinis dan mortalitas ikan selama periode aklimatisasi serta induksi kekebalan pascapemberian vaksin
Table 4. Clinical symptoms and mortality rates of fish during the acclimatization period and the immune response induced post-vaccination

	Perlakuan Treatment	Gejala klinis Clinical signs	Mortalitas Mortality (%)	Sintasan Survival rate (%)
A	Injeksi satu dosis Single dose injection	Tidak ada None	Tidak ada None	100,00
B	Injeksi dua dosis Double dose injection	Abrasi dan luka pada mulut Abrasion and lesions on the mouth	1/75	98,67
C	Perendaman Immersion	Tidak ada/none	Tidak ada None	100,00
D	Kontrol positif Positive control	Abrasi dan luka pada mulut Abrasion and lesions on the mouth	2/75	97,33
E	Kontrol negatif Negative control	Tidak ada None	Tidak ada None	100,00



Gambar 3. Pola pertumbuhan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang diberi vaksin ikan ‘Trivalen-SA’ pascapenyimpanan selama 12 bulan, pemeliharaan ikan berlangsung selama 35 hari
Figure 3. The growth pattern of tilapia (*Oreochromis niloticus*) vaccinated with ‘Trivalen-SA’ fish vaccine after 12 months of storage, the rearing of the fish was carried out for 35 days



Gambar 4. Gejala klinis ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. A. Lepuh dan pendarahan serius yang berkembang menjadi ulser, B. katarak dan mata menonjol (*exophthalmos*) akibat infeksi bakteri *Streptococcus agalactiae*

Figure 4. Clinical symptoms of tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected with *Aeromonas hydrophila*. A. Blisters and severe hemorrhage developing into ulcers, B. corneal opacity or cataracts and protruding eyes (*exophthalmos*) due to *Streptococcus agalactiae* infection

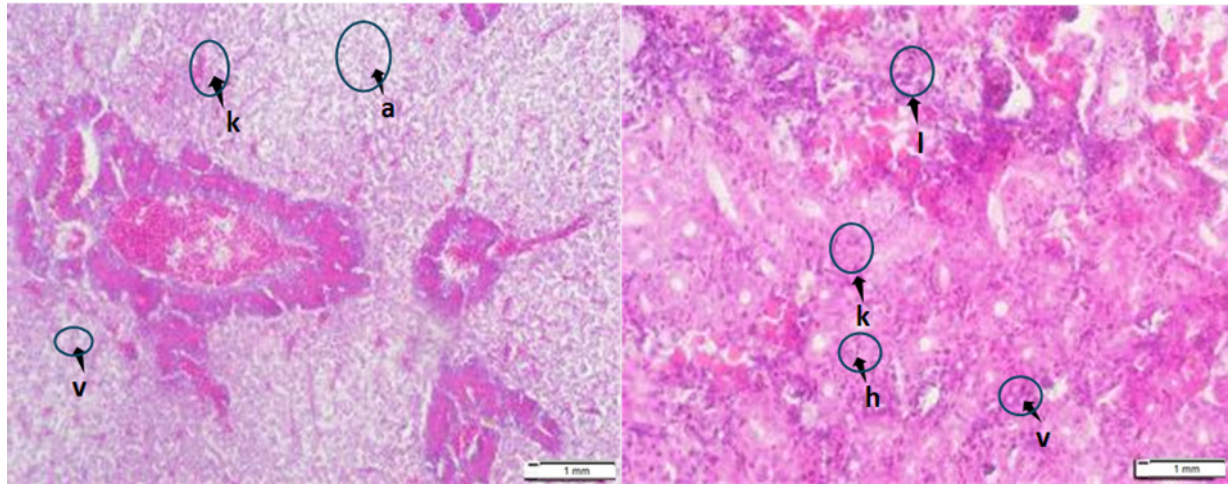
Taukhid & Purwaningsih, 2011; Taukhid *et al.*, 2014; Taukhid *et al.*, 2021; Yanong & Francis-Floyd, 2013).

Spesimen ikan yang mengalami kematian selama periode ujiantang diambil secara acak untuk mengetahui ketidaknormalan pada jaringan atau organ target akibat infeksi bakteri secara histopatologi. Pada ikan nila yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila*, organ hati mengalami kongesti darah yang signifikan, degenerasi jaringan dengan akumulasi hemosiderin, hemoragi, vakuolisasi, dan lesi nekrotik (Gambar 5A). Pada organ ginjal, juga terlihat adanya kongesti, degenerasi jaringan, hemoragi, dan vakuolisasi (Gambar 5B). Liu *et al.* (2018) dan Ren *et al.* (2019) mendeskripsikan abnormalitas yang serupa pada ikan nila yang terpapar MAS.

Pada ikan nila yang diinfeksi *S. agalactiae*, secara visual pada organ internal menunjukkan

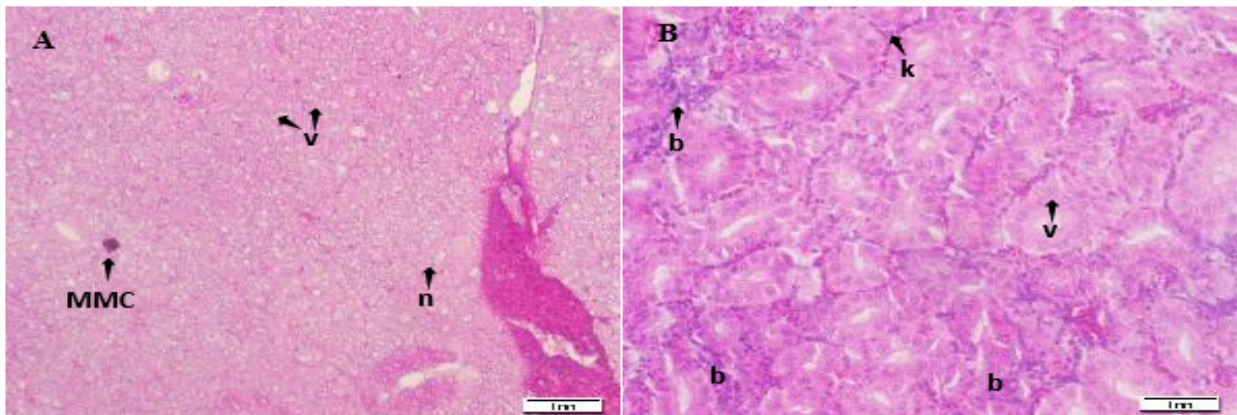
adanya *petechiae* dan pendarahan pada saluran usus, hati, limpa, dan ginjal. Secara histopatologis, pada organ hati terjadi kematian sel yang masif (*pyknotic nuclei*, *karyorrhexis*, dan *karyolysis*), infiltrasi sel-sel inflamasi, peningkatan *melanomacrophage center* (MMC), dan hiperplasia sel (Gambar 6A). Pada ginjal, terlihat adanya kongesti, hemoragi, vakuolisasi, dan infeksi sistemik terkonfirmasi dengan sebaran bakteri di organ tersebut (Gambar 6B). Buller (2004) dan Rodkhun *et al.* (2011) menemukan kerusakan pada kedua jaringan tersebut dengan kondisi yang hampir serupa pada ikan nila yang terpapar streptococcosis.

Rataan persen sintasan pascaujiantang terhadap infeksi bakteri *A. hydrophila*, *S. agalactiae* (non-hemolitik), dan *S. agalactiae* (β -hemolitik) ditampilkan pada Gambar 7. Pada gambar tersebut terlihat bahwa perlakuan



Gambar 5. Histopatologi organ ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang terpapar bakteri *Aeromonas hydrophila*. A. Histopatologi organ hati: tampak kongesti (k) yang masif, degenerasi sel hati sehingga atropi (a), dan vakuolisasi (v); B. Histopatologi organ ginjal: kongesti (k), degenerasi sel hematopoietic (h), infiltrasi leukosit (l), dan vakuolisasi (v). Pewarnaan HE, 200X perbesaran

Figure 5. The histopathology of tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to *Aeromonas hydrophila*. A. The histopathology of liver: showed massive congestion (k), hepatocytes are atrophied with cloudy appearance (a), and vacuolization (v); B. The histopathology of the kidney: congestion (k), degeneration sel hematopoietic (h), leukocyte infiltration (l), and vacuolization (v). HE staining, 200X magnification



Gambar 6. Histopatologi organ hati ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang terpapar bakteri *Streptococcus agalactiae*. A. Organ hati: terjadi nekrotik sel yang masif (n) (pyknotic nuclei, karyorrhexis, dan karyolysis), sejumlah besar sel hati terjadi vakuolalisasi (v), dan adanya peningkatan melanomacrophage center (MMC); B. Ginjal: terlihat adanya kongesti (k), vakuolisasi (v), dan infeksi sistemik terkonfirmasi dengan sebaran bakteri (b) di organ ginjal. Pewarnaan HE, 200X perbesaran

Figure 6. The histopathology of tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to *Streptococcus agalactiae*. A. Liver: there was extensive necrotic cell (n) (pyknotic nuclei, karyorrhexis, and karyolysis), a large number hepatocytes are vacuolated or atrophy (v), and increased melanomacrophage centers (MMC), and cell hyperplasia (A); B. Kidney: there was congestion (k), vacuolization (v), and systemic infection was confirmed by the presence of bacteria in the organ (b). HE staining, 200X magnification

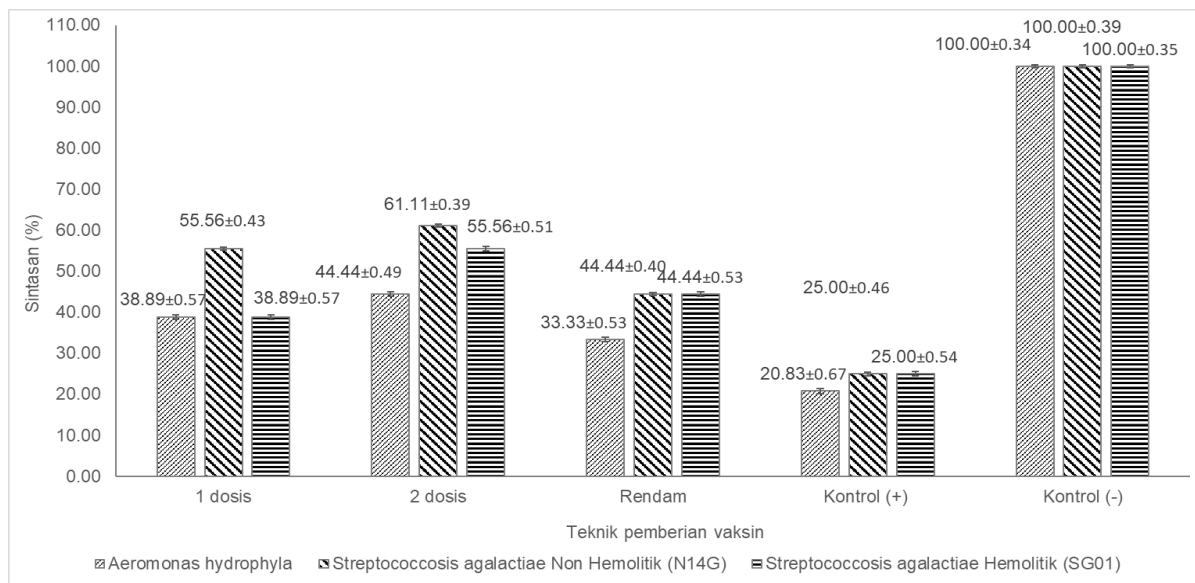
atau aplikasi vaksin 'Trivalen-SA' dua dosis memberikan tingkat proteksi terhadap infeksi patogen target yang lebih tinggi dibanding dengan dua kelompok perlakuan lainnya, yaitu injeksi satu dosis dan perendaman. Nilai proteksi tertinggi secara konsisten dicapai pada perlakuan injeksi dua dosis, diikuti oleh injeksi satu dosis dan perendaman. Pengecualian terjadi pada infeksi bakteri *S. agalactiae* (β -hemolitik), di mana perlakuan perendaman memberikan nilai proteksi yang lebih tinggi dibanding dengan injeksi satu dosis. Secara keseluruhan, hasil ini mengindikasikan bahwa vaksin 'Trivalen-SA' pada pengujian ini masih memiliki potensi proteksi yang baik meskipun telah disimpan selama 12 bulan.

Efikasi vaksin 'Trivalen-SA' pada pengujian ini dievaluasi dengan menghitung nilai RPS melalui ujiantang terhadap masing-masing jenis patogen (*A. hydrophila* AHL0905-2, *S. agalactiae* N14G, dan *S. agalactiae* SG01-16) pada dosis letal 50% (LD_{50}). Rataan persen mortalitas dan nilai RPS pada ujiantang terhadap masing-

masing jenis patogen serta sinergitas proteksi terhadap ketiganya disajikan pada Tabel 5.

Pada Tabel 5 terlihat bahwa setelah penyimpanan 12 bulan, vaksin 'Trivalen-SA' dengan perlakuan atau aplikasi yang berbeda, diperoleh nilai protektif yang diukur dengan indikator RPS terhadap infeksi bakteri *A. hydrophila* berkisar antara 15,79-29,82%. Proteksi terhadap infeksi bakteri *S. agalactiae* (non-hemolitik) antara 25,92-48,15%, dan terhadap infeksi bakteri *S. agalactiae* (β -hemolitik) antara 18,52-40,75%. Proteksi sinergis terhadap ko-infeksi ketiga jenis atau biotipe bakteri yang diinfeksi adalah sebesar 27,37% untuk perlakuan injeksi satu dosis; 39,57% untuk injeksi dua dosis, dan 22,54% untuk perendaman.

Hasil tersebut mengisyaratkan bahwa vaksin 'Trivalen-SA' pada pengujian ini masih memberikan perlindungan yang baik terhadap ko-infeksi streptococcosis dan MAS pada ikan nila. Level proteksi terbaik diperoleh pada perlakuan injeksi dua dosis (0,2 mL



Gambar 7. Rataan nilai persen sintasan pascaujiantang terhadap infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* (Ah AHL0905-2), *Streptococcus agalactiae* (non-hemolitik/Sa N14G), dan *Streptococcus agalactiae* (β -hemolitik/Sa SG01-16) melalui teknik aplikasi pemberian vaksin yang berbeda

Figure 7. The average survival rates following the challenge tests against bacterial infections of *Aeromonas hydrophila* (Ah AHL0905-2), non-hemolytic *Streptococcus agalactiae* (Sa N14G), and β -hemolytic *Streptococcus agalactiae* (Sa SG01-16) with different vaccine applications

Tabel 5. Rataan persen mortalitas ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dan *relative percent survival* pada ujiantang terhadap *Aeromonas hydrophila* AHL0905-2, *Streptococcus agalactiae* N14G, dan *Streptococcus agalactiae* SG01-16

Table 5. Average percentages of mortality of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and relative percentages of survival assessed in the challenge test against *Aeromonas hydrophila* AHL0905-2, *Streptococcus agalactiae* N14G, and *Streptococcus agalactiae* SG01-16

Jenis patogen <i>Pathogenic agents</i>	Perlakuan <i>Treatment</i>	Mortalitas (%) <i>Mortality (%)</i>	<i>Relative percent survival [infeksi tunggal] (%)</i> <i>Relative percent survival [single infection] (%)</i>	<i>Relative percent survival [ko-infeksi] (%)</i> <i>Relative percent survival [co-infections] (%)</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i> AHL0905-2	A. Injeksi 1 dosis <i>Single dose injection</i>	61,11	22,81	
	B. Injeksi 2 dosis <i>Double dose injection</i>	55,56	29,82	
	C. Rendam <i>Immersion</i>	66,67	15,79	
	D. Kontrol positif <i>Positive control</i>	79,17	-	
	E. Kontrol negatif <i>Negative control</i>	0	-	
<i>Streptococcus agalactiae</i> N14G	A. Injeksi satu dosis <i>Single dose injection</i>	44,44	40,75	*). Injeksi satu dosis = 27,37 <i>Single dose injection</i> = 27.37 *). Injeksi dua dosis = 39,57 <i>Double dose injection</i> = 39.57 *). Perendaman = 22,54 <i>Immersion</i> = 22.54
	B. Injeksi dua dosis <i>Double dose injection</i>	38,89	48,15	
	C. Rendam <i>Immersion</i>	55,56	25,92	
	D. Kontrol positif <i>Positive control</i>	75	-	
	E. Kontrol negatif <i>Negative control</i>	0	-	
<i>Streptococcus agalactiae</i> SG01-16	A. Injeksi satu dosis <i>Single dose injection</i>	61,11	18,52	
	B. Injeksi 2 dosis <i>Double dose injection</i>	44,44	40,75	
	C. Rendam <i>Immersion</i>	55,56	25,92	
	D. Kontrol positif <i>Positive control</i>	75	-	
	E. Kontrol negatif <i>Negative control</i>	0	-	

ekor⁻¹). Nilai RPS yang diperoleh berdasarkan hasil ujiantang terhadap masing-masing jenis bakteri mengindikasikan bahwa vaksin 'Trivalen-SA' pada pengujian ini, tidak hanya mampu bekerja secara "monovalen", tetapi juga mampu bekerja sinergis secara "polivalen atau multi-valen". Sinergisitas proteksi vaksin ikan yang dibuat lebih dari satu jenis antigen,

sebelumnya telah diungkap oleh beberapa peneliti (Abu-Elala *et al.*, 2019; El-daim *et al.*, 2023; Kong *et al.*, 2022; Mohammadi *et al.*, 2021; Monir *et al.*, 2020; Tauhid *et al.*, 2021).

El-daim *et al.* (2023) mengembangkan vaksin polivalen dengan menggabungkan tiga jenis bakteri, yaitu *S. agalactiae*, *Streptococcus iniae*, dan *Lactococcus garvieae* untuk

pencegahan ko-infeksi streptococcosis pada ikan nila; dan vaksin tersebut mampu bekerja sinergis dengan nilai RPS di atas 50%. Abu-Elala *et al.* (2019) menguji efikasi vaksin polivalen yang diberikan melalui injeksi dan perendaman untuk mencegah streptococcosis pada ikan nila. Kong *et al.* (2022) melakukan pengujian respons kekebalan mukosal dan level proteksi pemberian vaksin polivalen (*Aeromonas veronii* dan *Edwardsiella ictaluri*) pada ikan *Pangasius*. Tauhid *et al.* (2021) melakukan pengujian efektivitas vaksin bivalen dan trivalen yang mengandung bakteri *S. agalactiae* pada ikan nila, dengan formulasi yang berbeda antara isolat S01-196-16 dan isolat N14G (bivalen) serta isolat N14G, NP1050, dan SG01-16 (trivalen).

Mohammadi *et al.* (2021) menguji performa vaksin monovalen dan bivalen untuk mencegah Streptococcosis dan vibriosis pada ikan kakap; sedangkan Monir *et al.* (2020) mengembangkan vaksin bivalen (*S. iniae* dan *A. hydrophila*) untuk mencegah ko-infeksi kedua jenis bakteri tersebut pada ikan nila. Bahkan Sohn *et al.* (2023) mengembangkan vaksin trivalen yang dibuat dengan menggabungkan dua serotipe parasit *Miamiensis avidus* bersama bakteri *Tenacibaculum maritimum* untuk mencegah ko-infeksi kedua jenis patogen tersebut pada budidaya ikan *olive flounder* (*Paralichthys olivaceus*), dan ketiga antigen tersebut mampu bekerja sinergis mencegah ko-infeksi dengan nilai RPS > 50%.

Metode pemberian atau aplikasi vaksin pada pengujian ini ditetapkan sebagai perlakuan utama, yaitu melalui injeksi dan perendaman. Penerapan kedua teknik aplikasi tersebut memberikan hasil yang berbeda, di mana aplikasi melalui injeksi secara konsisten diperoleh hasil yang lebih baik dibandingkan dengan melalui perendaman sesuai dengan Abu-Elala *et al.* (2019). Aplikasi vaksin pada ikan yang paling efektif adalah melalui injeksi ke dalam rongga tubuh (intramuskular atau intraperitoneal) (Plant & LaPatra, 2011); selanjutnya Sommerset *et al.* (2014) menambahkan bahwa vaksinasi melalui injeksi memiliki beberapa keunggulan, antara

lain: dosis antigen yang rendah, memastikan setiap ikan mendapatkan vaksin pada dosis yang tepat, dan pada vaksin beradjuvan akan meningkatkan imunogenisitas (Abu-Elala *et al.* 2019).

Meskipun demikian, vaksinasi melalui injeksi juga memiliki keterbatasan, antara lain: menyebabkan stres akibat penanganan, anestesi, dan penyuntikan (Midtlyng *et al.*, 1996), memerlukan lebih banyak tenaga kerja dan biaya (Sharpe, 2007); hanya dapat dilakukan pada ikan dengan ukuran tertentu, sehingga sulit untuk dilakukan pada benih yang sering kali merupakan stadia paling rentan terhadap penyakit (Home, 1997); injeksi vaksin polivalen atau multivalen harus dievaluasi secara cermat, karena kombinasi beberapa antigen dapat menyebabkan kesulitan dalam penyajian antigen pada sistem kekebalan tubuh ikan (respons non-sinergetik) akibat kompetisi antigenik, interferensi antarantigen, dan imunosupresi non-spesifik (Busch, 1997).

Metode pemberian vaksin melalui perendaman dianggap sebagai alternatif yang umum dilakukan; baik perendaman secara langsung, infiltrasi hiperosmotik (HI), atau melalui penyemprotan. Namun kedua metode terakhir sudah ditinggalkan karena menyebabkan stres yang berlebihan (Plant & LaPatra, 2011). Kelemahan vaksinasi melalui perendaman adalah penggunaan antigen yang lebih banyak, serta level dan durasi proteksi yang lebih rendah dibandingkan melalui injeksi (Nakanishi & Ototake, 1997). Oleh karena itu, Ototake *et al.* (1999) merekomendasikan penambahan waktu perendaman untuk meningkatkan konsentrasi antigen yang masuk ke dalam tubuh ikan.

Uji tantang terhadap ketiga bakteri patogen pada pengujian ini, menunjukkan bahwa pada kelompok ikan yang divaksin diperoleh tingkat mortalitas yang lebih rendah (38,89-66,67%) dibandingkan dengan kelompok kontrol (75,00-79,17%). Hasil analisis statistik, terdapat perbedaan tingkat mortalitas yang nyata pada selang kepercayaan 95% ($P < 0,05$) antara kelompok perlakuan dibanding dengan kelompok kontrol.

Hasil uji beda jarak berganda, pada uji tantang terhadap bakteri *A. hydrophila*; tidak ada perbedaan antarkelompok perlakuan. Pada uji tantang terhadap bakteri *S. agalactiae* N14G terdapat perbedaan antara perlakuan injeksi dua dosis dengan perendaman, namun tidak ada perbedaan dengan perlakuan injeksi satu dosis. Pada uji tantang terhadap bakteri *S. agalactiae* SG01-16 terdapat perbedaan untuk semua kelompok perlakuan.

Keamanan vaksin merupakan salah satu persyaratan yang harus dipenuhi oleh suatu produk vaksin. Vaksin dinyatakan aman apabila selama periode pengamatan yang telah ditentukan, tidak terjadi kelainan klinis-patologis, dan tidak terjadi kematian pada kelompok ikan yang divaksin. Hasil uji keamanan vaksin disajikan pada Tabel 6. Pada tabel tersebut mengindikasikan bahwa vaksin ‘Trivalen-SA’ telah memenuhi standar keamanan, dan tidak mengakibatkan dampak negatif terhadap ikan yang divaksin.

Pencegahan penyakit ikan akibat infeksi patogen endemik melalui penggunaan vaksin dianggap sebagai pendekatan yang efektif dan aman, baik terhadap ikan, lingkungan maupun konsumen (Chideroli *et al.*, 2017). Pada budidaya ikan nila, vaksinasi dianggap sebagai metode yang efektif untuk mengendalikan infeksi *S. agalactiae* serta mencegah kematian

massal (Liu *et al.*, 2016). Selanjutnya Taukhid *et al.* (2014) menekankan bahwa vaksinasi ikan akan berhasil guna apabila diikuti dengan upaya pengendalian penyakit yang dilakukan secara integratif, seperti penggunaan benih berkualitas, menghindari cekaman (stres), pengelolaan lingkungan budidaya, pemberian pakan yang sesuai, serta penerapan sistem biosekuriti yang ketat.

Vaksin ikan ‘Trivalen-SA’ yang telah disimpan selama 12 bulan, masih memenuhi standar keamanan produk vaksin. Performa efikasi mengalami penurunan selama periode penyimpanan apabila dibanding dengan vaksin serupa yang baru dibuat (RPS = 68,05%); sesuai dengan pendapat El-daim *et al.* (2023) yang mengembangkan vaksin polivalen dengan menggabungkan tiga jenis bakteri, yaitu *S. agalactiae*, *S. iniae*, dan *L. garvieae* untuk pencegahan ko-infeksi streptococcosis pada ikan nila; dan vaksin tersebut mampu bekerja sinergis dengan nilai RPS di atas 50%, namun masih memiliki potensi protektif yang baik, dengan nilai RPS 39,57% apabila diberikan melalui injeksi dua dosis (0,2 mL per ekor). Berdasarkan hasil pengujian tersebut, maka secara teknis, produk vaksin ikan ‘Trivalen-SA’ memenuhi kriteria produk biologi sesuai Permen KP No. 1 Tahun 2019 tentang Obat Ikan, dengan masa kadaluarsa ≈ 12 bulan.

Tabel 6. Hasil uji keamanan vaksin ‘Trivalen-SA’ pada ikan nila *specific pathogen free* (SPF)
Table 6. Results of the safety test for the ‘Trivalen-SA’ vaccine on *specific pathogen-free* (SPF) tilapia

Hari Day	1 × dosis (0.1 mL ekor ⁻¹) 1 × dose (0.1 mL fish ⁻¹)		2 × dosis (0.1 mL ekor ⁻¹) 2 × dose (0.1 mL fish ⁻¹)		Perendaman (10 ⁷ CFU mL ⁻¹) Immersion (10 ⁷ CFU mL ⁻¹)		Kontrol PBS (0.1 mL ekor ⁻¹) Control PBS (0.1 mL fish ⁻¹)	
	Gejala klinis Clinical signs	Kematian Mortality	Gejala klinis Clinical signs	Kematian Mortality	Gejala klinis Clinical signs	Kematian Mortality	Gejala klinis Clinical signs	Kematian Mortality
1.	X	0	X	0	X	0	X	0
2.	X	0	X	0	X	0	X	0
3.	X	0	X	0	X	0	X	0
4.	X	0	X	0	X	0	X	0
5.	X	0	X	0	X	0	X	0
6.	X	0	X	0	X	0	X	0
7.	X	0	X	0	X	0	X	0

Keterangan: PBS = Phosphate buffered saline, X = tidak ada
Description: PBS = Phosphate buffered saline, X = none

KESIMPULAN

Efikasi dan keamanan vaksin ikan 'Trivalen-SA' yang sudah disimpan selama 12 bulan masih efisien untuk pencegahan penyakit streptococcosis dan MAS. Hal ini terlihat dari kinerja sintasan dan pertambahan bobot tubuh ikan nila terbaik, dengan nilai RPS mencapai 39,57% apabila diberikan melalui injeksi dua dosis (0,2 mL per ekor).

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada Balai Riset Perikanan Budidaya dan Penyuluhan Perikanan (BRPBATPP) yang telah membantu dan mendukung penelitian ini.

PENDANAAN

Kegiatan penelitian yang dipublikasikan ini merupakan kegiatan mandiri dan tidak mendapatkan pendanaan dari program atau lembaga pendanaan manapun.

AUTHOR CONTRIBUTION

SM: Berperan dalam konseptualisasi, analisis formal, penulisan draf awal, visualisasi, penulisan tinjauan, dan pengeditan. EBK: Berperan dalam konseptualisasi, analisis formal, metodologi, validasi, penulisan tinjauan, dan pengeditan. EFW: Berperan dalam investigasi, metodologi, dan analisis formal. SU: Berperan dalam investigasi dan metodologi. SI: Berperan dalam investigasi dan metodologi. MA: Berperan dalam investigasi dan metodologi. AS: Berperan dalam konseptualisasi, supervisi, visualisasi, penulisan draf awal, visualisasi, penulisan tinjauan, dan pengeditan. TA: Berperan dalam konseptualisasi, supervisi, visualisasi, analisis formal, dan validasi.

PERNYATAAN COMPETING INTEREST

Penulis menyatakan bahwa tidak ada konflik kepentingan baik finansial maupun pribadi yang berpengaruh terhadap hasil penelitian pada artikel ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abu-Elala, N. M., Samir, A., Wasfy, M., & Elsayed, M. (2019). Efficacy of injectable and immersion polyvalent vaccine against streptococcal infections in broodstock and offspring of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 88, 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.042>
- Amal, M. N. A., Saad, M. Z., Zahrah, A. S., & Zulkafli, A. R. (2018). Water quality influences the presence of *Streptococcus agalactiae* in cage cultured red hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture Research*, 46(2), 313–323. <https://doi.org/10.1111/are.12180>
- Amend, D. F. (1981). Potency testing of fish vaccine. *Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines*, 49, 447-454.
- Amos, K. H. (1985). *Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens, Third edition*. Fish Health Section, American Fisheries Society.
- Austin, B., & Austin, D. A. (2016). *Bacterial fish pathogens: Disease of farmed and wild fish. Sixth Edition*. Springer International Publishing Switzerland.
- Badan Standardisasi Nasional. (1999). SNI 01-6141. *Produksi benih ikan nila hitam (Oreochromis niloticus Bleeker) kelas benih sebar*. Badan Standardisasi Nasional.
- Badan Standardisasi Nasional. (2009). SNI 7545.3. *Metode identifikasi bakteri pada ikan secara konvensional – Bagian 3: Streptococcus iniae dan Streptococcus agalactiae*. Badan Standardisasi Nasional.
- Badan Standardisasi Nasional. (2015). SNI 7303.1. *Identifikasi bakteri Aeromonas hydrophila pada ikan - Bagian 1: Metode konvensional*. Badan Standardisasi Nasional.
- Buller, N. B. (2004). *Bacteria from Fish and other aquatic animals: A practical identification manual*. CABI Publishing.

- Busch, R. A. (1997). Polyvalent vaccines in fish: the interactive effects of multiple antigens. *Developments in Biological Standardization*, 90, 245–256.
- Chideroli, R. T., Amoroso, N., Mainardi, R. M., Suphoronski, S. A., de Padua, S. B., Alfieri, A. F., Alfieri, A. A., Mosela, M., Moralez, A. T. P., de Oliveira, A. G., Zanola, R., Di Santis, G. W., & Pereira, U. P. (2017). Emergence of a new multidrug-resistant and highly virulent serotype of *Streptococcus agalactiae* in fish farms from Brazil. *Aquaculture*, 479, 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.013>
- Committee for Medicinal Products for Veterinary Use. (2013). *Guideline on the design of studies to evaluate the safety and efficacy of fish vaccines*. European Medicines Agency.
- Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya. (2014). Keputusan Direktur Jenderal Perikanan Budidaya No. 163/Kep-DJPB/2014 tentang daftar jenis-jenis penyakit utama pada perikanan budidaya yang perlu dilakukan *monitoring* secara berkala. Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya.
- Dong, H. T., Techatanakitarnan, C., Jindakittikul, P., Thaiprayoon, A., & Taengphu, S. (2017). *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 40(10), 1395–1403. <https://doi.org/10.1111/jfd.12617>
- Dwinanti, S. H., Sukenda, Yuhana, M., & Lusiastuti, A. M. (2014). Toksisitas dan imunogenisitas produk ekstraseluler *Streptococcus agalactiae* tipe non-hemolitik pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia*, 2(1), 105–116. <https://doi.org/10.36706/jari.v2i1.2058>
- El-daim, A., Eman, A., Gawad, A., Amel, M., El Asely, Elabd, H., Matter, A. F., Youssuf, H., Shaheen, A.A., & Abbass., A. A. (2023). Impacts of *Streptococcal* infection on nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Egyptian farms with special reference to diagnosis and prevention. *Benha Veterinary Medical Journal*, 44(1), 71-78. <https://doi.org/10.21608/bvmj.2023.175940.1612>
- Firdausi, A. P., Sukenda, & Nuryati, S. (2018). Efikasi vaksinasi pada benih ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dengan metode infiltrasi hiperosmotik untuk mencegah infeksi *Streptococcus agalactiae*. *Jurnal Veteriner*, 18(4), 634-641. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2017.18.4.634>
- Food and Agriculture Organization. (2017). *Global aquaculture production*. Food and Agriculture Organization. <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-production/en>
- Hardi, E. H., Sukenda, Enang, H., & Lusiastuti, A. M. (2011). Karakteristik dan patogenisitas *Streptococcus agalactiae* tipe β -hemolitik dan non-hemolitik pada ikan nila. *Jurnal Veteriner*, 12(2), 152-164.
- Hoai, T. D., Trang, T. T., van Tuyen, N., Giang, N. T. H., & Van, K. V. (2019). *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in channel catfish in Vietnam. *Aquaculture*, 513, 734425. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734425>
- Iregui, C., Barato, P., Rey, A., Vasquez, G., & Verjan, N. (2014). *Epidemiology of Streptococcus agalactiae and streptococcosis in tilapia fish*. iConcept Press Ltd.
- Kayansamruaj, P., Pirarat, N., Katagiri, T., Hirono, I., & Rodkhum, C. (2014). Molecular characterization and virulence gene profiling of pathogenic *Streptococcus agalactiae* populations from tilapia (*Oreochromis* sp.) farms in Thailand. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26(4), 488–495. <https://doi.org/10.1177/1040638714534237>

- Kementerian Kelautan dan Perikanan. (2021). *Produksi perikanan budidaya, Kementerian Kelautan dan Perikanan. Satu data KKP*. Kementerian Kelautan dan Perikanan.
- Kong, W. G., Qin, D. C., Mu, Q. J., Dong, Z. R., Luo, Y. Z., Ai, T. S., & Xu, Z. (2022). Mucosal immune responses and protective efficacy in yellow catfish after immersion vaccination with bivalent inactivated *Aeromonas veronii* and *Edwardsiella ictaluri* vaccine. *Water Biology and Security*, 1(2), 100032. <https://doi.org/10.1016/j.watbs.2022.100032>
- Liu, C., Chang, O. Q., Zhang, D. F., Li, K. B., & Wang, F. (2018). *Aeromonas shuberti* as a cause of multi-organ necrosis in internal organs of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fish Diseases*, 41(10), 1529–1538. <https://doi.org/10.1111/jfd.12848>
- Liu, G., Zhu, J., Chen, K., Gao, T., Yao, H., Liu, Y., Zhang, W., & Lu, C. (2016). Development of *Streptococcus agalactiae* vaccines for tilapia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 122, 163–170, 2016 <https://doi.org/10.3354/dao03084>
- Liu, L., Lu, D.-Q., Xu, J., Luo, H.-L., & Li, A.-X. (2019). Development of attenuated erythromycin-resistant *Streptococcus agalactiae* vaccine for tilapia (*Oreochromis niloticus*) culture. *Journal of Fish Diseases*, 42(5), 693–701. <https://doi.org/10.1111/jfd.12977>
- Lusiastuti, A. M., Taukhid, Maskur, Murwantoko, Prayitno, S. B., Sugiani, D., & Caruso, D. (2020). Building and improving the capacity of fish and environmental health management strategy in Indonesia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 521, 012016. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/521/1/012016>
- Midtlyng, P. J., Reitan, L. J., & Speilberg, L. (1996). Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish & Shellfish Immunology*, 6(5), 335–350. <https://doi.org/10.1006/fsim.1996.0034>
- Mohammadi, Y., Mesbah, M., Dezfoulnejad, M. C., Mehrgan, M. S., & Islami, H. R. (2021). Growth performance, blood biochemical parameters, immune response, and antioxidant defense of Asian seabass (*Lates calcarifer*) fingerlings exposed to monovalent and bivalent vaccines against *Streptococcus iniae* and *Vibrio harveyi*. *Aquaculture International*, 29, 2751–2767. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00776-5>
- Monir, M. S., Yusoff, S. B. M., Mohamad, A., Ngoo, M. S. B. M. H., & Ina-Salwany, M. Y. (2020). Haemato-immunological responses and effectiveness of feed-based bivalent vaccine against *Streptococcus iniae* and *Aeromonas hydrophila* infections in hybrid red tilapia (*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*). *BMC Veterinary Research*, 16, 226. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02443-y>
- Nakanishi, T., & Ototake, M. (1997). Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination, *Developments in Biological Standardization*, 90, 59–68.
- Nissa, K., Sukenda, Junior, M. Z., Lusiastuti, A. M., & Nuryati, S. (2016). Benih keturunan induk ikan nila yang divaksinasi pada tingkat kematangan gonad-2 lebih tahan terhadap infeksi *Streptococcus agalactiae*. *Jurnal Veteriner*, 17(3), 355–364. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2016.17.3.355>
- Ototake, M., Moore, J. D., & Nakanishi, T. (1999). Prolonged immersion improves the effectiveness of dilute vibrio vaccine for rainbow trout. *Fish Pathology*, 34(3), 151–154. <https://doi.org/10.3147/jsfp.34.151>
- Plant, K. P., & LaPatra, S. E. (2011). Advances in fish vaccine delivery. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1256–1262. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.007>

- Pradeep, P. J., Suebsing, R., Sirithammajak, S., Kampeera, J., Turner, W., Jeffs, A., Kiatpathomchai, W., & Withyachumanarnkul, B. (2017). Vertical transmission and concurrent infection of multiple bacterial pathogens in naturally infected red tilapia (*Oreochromis spp.*). *Aquaculture Research*, 48, 2706–2717. <https://doi.org/10.1111/are.13102>
- Rahmi, Nisaa, K., Akmal, Mardiana, Chadijah, A., & Salam, N. I. (2021). Peningkatan ketahanan benih ikan nila salin (*Oreochromis niloticus*) terhadap penyakit *Streptococcosis* melalui vaksinasi induk. *Jurnal Perikanan Universitas Gadjah Mada*, 23(1), 31-36. <https://doi.org/10.22146/jfs.60280>
- Ren, Z., Cai, Y., Wang, S., Liu, S., & Li, A. (2019). First case of *Aeromonas schubertii* infection in brackish water wild Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in China. *Aquaculture*, 501, 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.036>
- Reynalta, R., Yuhana, M., & Lusiastuti, A. M. (2019). Efektivitas vaksin bacterial *Streptococcus agalactiae* dengan penyalut berbeda terhadap peningkatan kinerja imunitas ikan nila *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Jurnal Iktiologi Indonesia*, 19(2), 205-215. <https://doi.org/10.32491/jii.v19i2.478>
- Rodkhum, C., Kayansamruaj, P., & Pirarat, N. (2011). Effect of water temperature on susceptibility to *Streptococcus agalactiae* serotype Ia infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Thai Journal of Veterinary Medicine*, 41(3), 309–314.
- Sarjito, Nanda, M., Sulisyaningrum, Haditomo, A. H. C., Desrina, & Prayitno, S. B. (2021). Selektif bakteri yang berasosiasi dengan kematian ikan nila (*Oreochromis niloticus*) di Kabupaten Magelang. *Saintek Perikanan: Indonesian Journal of Fisheries Science and Technology*, 17(1), 15–24. <https://doi.org/10.14710/ijfst.17.1.%p>
- Sharpe, C. S. (2007). Physiological stress responses to automated and hand vaccine injection procedures in yearling coho salmon. *North American Journal of Aquaculture*, 69(2), 180–184. <https://doi.org/10.1577/A06-004.1>
- Sohn, H., Kwon, H., Lee, S., Wan, Q., & Lee, J. (2023). Development of a trivalent vaccine for prevention of co-infection by *Miamiensis avidus* and *Tenacibaculum maritimum* in farmed olive flounder. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 26(10), 605-616. <https://doi.org/10.47853/FAS.2023.e52>
- Sommerset, I., Krossøy, B., Biering, E., & Frost, P. (2014). Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Review of Vaccines*, 4(1), 89–101. <https://doi.org/10.1586/14760584.4.1.89>
- Suhermanto, A., Sukenda, Zairin Jr., M., Lusiastuti, A. M., & Nuryati, S. (2019). Characterization of *Streptococcus agalactiae* bacterium isolated from tilapia (*Oreochromis niloticus*) culture in Indonesia. *AACL Bioflux*, 12(3), 756–766.
- Sukenda, Firmansyah, A. L., Rahman, Nuryati, S., & Hidayatullah, D. (2018). Efficacy of *Streptococcus agalactiae* vaccine strains N₃M and N₄M in fry tilapia infected by different strains of *S. agalactiae*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 17(2), 168-180. <https://doi.org/10.19027/jai.17.2.168-180>
- Taukhid, Lusiastuti, A. M., Andriyanto, S., Sugiani, D., Sumiati, T., & Suhermanto, A. (2021). Efficacy of inactive bivalent and trivalent *Streptococcus agalactiae* bacteria (biotype 1 & 2) vaccines on tilapia, *Oreochromis niloticus*. *E3S Web of Conferences*, 322, 02014. <https://doi.org/10.1051/E3SCONF/202132202014>
- Taukhid, & Purwaningsih, U. (2011). Penapisan isolate bakteri *Streptococcus spp.* Sebagai kandidat antigen dalam pembuatan vaksin, serta efikasinya untuk pencegahan penyakit streptococcosis pada ikan nila, *Oreochromis niloticus*. *Jurnal Riset Akuakultur*, 6(1), 103–118. <http://dx.doi.org/10.15578/jra.6.1.2011.103-118>

- Taukhid, Purwaningsih, U., & Lusiastuti, A. M. (2014). Efikasi beberapa sediaan vaksin *Streptococcus agalactiae*-N14G untuk pencegahan penyakit streptococcosis pada ikan nila, *Oreochromis niloticus*. *Jurnal Riset Akuakultur*, 9(2), 295-305. <http://dx.doi.org/10.15578/jra.9.2.2014.295-305>
- Taukhid, Purwaningsih, U., Sugiani, D., Sumiati, T., & Lusiastuti, A. M. (2015). Efikasi vaksin in-aktif bakteri *Aeromonas hydrophila*-AHL0905-2 (hydrovac) and *Streptococcus agalactiae*-N14G (streptovac) untuk pencegahan penyakit bacterial pada ikan budidaya air tawar. *Jurnal Riset Akuakultur*, 10(4), 541-551. <http://dx.doi.org/10.15578/jra.10.4.2015.541-551>
- Taukhid, Sumiati, T., & Andriyanto, S. (2018). Efektivitas metode aplikasi vaksin trivalent untuk pencegahan penyakit bakteri potensial pada budidaya ikan air tawar. *Jurnal Riset Akuakultur*, 13(1), 67. <http://dx.doi.org/10.15578/jra.13.1.2018.67-76>
- Taukhid, Wajdy, E. F., Sugiani, D., Nafiqoh, N. (2023). Streptococcosis on nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Indonesian freshwater aquaculture. *Omni-Akuatika*, 19(1), 1- 14. <http://dx.doi.org/10.20884/1.oa.2023.19.1.1005>
- World Health Organization. (1979). Stability testing of pertussis vaccines prepared from different *B. pertussis* strains. World Health Organization. <https://iris.who.int/handle/10665/70153>
- Yanong, R. P. E., & Francis-floyd, R. (2013). *Streptococcal infections of fish*, Circular 57. University of Florida.