



**VAKSIN POLIVALEN *Edwardsiella ictaluri* UNTUK PENCEGAHAN  
PENYAKIT *ENTERIC SEPTICEMIA OF CATFISH* PADA IKAN  
PATIN (*Pangasianodon hypophthalmus*)**

Hak cipta milik IPB University

**UNI PURWANINGSIH**



**ILMU AKUAKULTUR  
SEKOLAH PASCASARJANA  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR  
2022**



### @Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



## PERNYATAAN MENGENAI DISERTASI DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa disertasi dengan judul “Vaksin Polivalen *Edwardsiella ictaluri* Untuk Pencegahan Penyakit *Enteric Septicemia of Catfish* Pada Ikan Patin (*Pangasianodon hypophthalmus*)” adalah karya saya dengan arahan dari dosen pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir disertasi ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Februari 2022

Uni Purwaningsih  
C161180091

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
    - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
    - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
  2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



## RINGKASAN

UNI PURWANINGSIH. Vaksin Polivalen *Edwardsiella ictaluri* Untuk Pencegahan Penyakit *Enteric Septicemia of Catfish* Pada Ikan Patin (*Pangasianodon hypophthalmus*). Dibimbing oleh SUKENDA, ANGELA MARIANA LUSIASTUTI, ALIMUDDIN, WIDANARNI dan SRI NURYATI.

Kasus kematian akibat penyakit *Enteric Septicemia of Catfish* (ESC) yang disebabkan oleh bakteri *Edwardsiella ictaluri* menjadi kendala utama pada budidaya ikan patin di Indonesia. Perbedaan kondisi geografis antar wilayah diduga menjadi faktor penyebab variasi fenotipe dan genotipe isolat *E. ictaluri*. Karakteristik spesifik isolat dapat menjadi dasar pertimbangan dalam pengembangan riset vaksin polivalen *E. ictaluri* yang mampu memproteksi terhadap variasi antigen heterolog dan meningkatkan nilai *relative percent survival* (RPS). Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan vaksin polivalen *E. ictaluri* untuk pencegahan penyakit ESC pada ikan patin, dengan lima tahap penelitian yaitu 1) karakterisasi fenotipe dan genotipe *E. ictaluri*, 2) identifikasi gen virulen dan evaluasi korelasi terhadap patogenisitas *E. ictaluri*, 3) profil protein dan toksisitas protein bakteri *E. ictaluri* pada ikan patin, 4) efikasi berbagai sediaan vaksin inaktif sel utuh *E. ictaluri* pada ikan patin didukung kajian uji kualitas dan keamanan vaksin, dan 5) efikasi dan proteksi vaksin inaktif polivalen sel utuh *E. ictaluri* dengan dan tanpa *booster* pada ikan patin.

Penelitian tahap pertama bertujuan mengidentifikasi isolat *E. ictaluri* secara fenotipe dan genotipe. Karakteristik terhadap tujuhbelas isolat bakteri yang berasal dari wilayah berbeda yaitu tujuh isolat dari Jawa Barat (PCjG, PJIG), PSb5G, PSb3G, PSb1G, PSmH, P), satu isolat dari Jawa Timur (PTaH), dua isolat dari Riau (PR1G, BRSH), tiga isolat dari Sumatera Selatan (B1, B2, A2), satu isolat dari Jambi (PjBH), satu isolat dari Lampung (S.935G), dan dua isolat dari Kalimantan Selatan (PBm1G, PBm2G) secara biokimia dan API 20E teridentifikasi sebagai *E. ictaluri*. Seluruh isolat termasuk  $\beta$ -hemolitik namun zona paling terang terlihat pada isolat PSb1G, PjBH, A2, P, dan PBm1G. Aktivitas enzim dan profil antibiotik homolog pada semua isolat. Analisis PCR semua isolat dengan primer spesifik *E. ictaluri* terdeteksi pada 129 bp. Isolat *E. ictaluri* asal Indonesia menunjukkan variasi genotipe. Semua isolat memiliki kemiripan 99.56-100% dengan strain *E. ictaluri* 93-146 complete genome.

Penelitian tahap kedua bertujuan mengidentifikasi gen virulen dan menganalisis korelasi gen virulen dan patogenisitas dalam menentukan komposisi penyusun vaksin polivalen *E. ictaluri*. Identifikasi gen virulen menunjukkan hasil variatif dan secara umum pada semua isolat *E. ictaluri* memiliki gen T6SS (evpC) dan urease. Kematian ikan patin akibat infeksi *E. ictaluri* tertinggi sebesar 96.67-100% terjadi pada ikan yang diinfeksi dengan *E. ictaluri* PSb1G, PjBH, A2, P, dan PBm1G dengan rerata waktu kematian 3.73-4.58 hari pascainfeksi. Mortalitas ikan patin akibat infeksi ESC tidak dipengaruhi oleh jumlah gen virulen yang dimiliki bakteri *E. ictaluri*. Infeksi *E. ictaluri* menyebabkan perubahan abnormalitas patologi klinik, gambaran darah, dan kerusakan jaringan.

Penelitian tahap ketiga bertujuan menganalisis profil protein, toksisitas sel utuh, dan *extracellular product* (ECP) serta korelasinya terhadap patogenisitas. Karakterisasi protein sel utuh dan ECP *E. ictaluri* menggunakan SDS-PAGE

ditunjukkan dengan hasil pengukuran berat molekul (BM) pada masing- masing sediaan. Profil protein sel utuh pada isolat PJbH menunjukkan 14 pita protein pada kisaran 11.18-140 kDa, sedangkan pada isolat P dan PBm1G menunjukkan 10 pita protein pada kisaran 11.18-71.06 kDa. Profil protein ECP terdeteksi hanya ditemukan 2 pita, yaitu 11.18 dan 14.30 kDa. Mortalitas tertinggi terjadi pada perlakuan sel utuh P dan PBm1G sebesar 97.78% dan 100% sedangkan pada PJbH menunjukkan kematian rendah sebesar 15.56%. Toksisitas sel utuh menyebabkan gejala klinis, perubahan anatomi dan kerusakan jaringan.

Penelitian tahap keempat bertujuan menganalisis sinergitas dan kompetensi berbagai antigen bakterin *E. ictaluri* dalam menginduksi imunitas pada ikan patin. Hasil dari karakterisasi fenotipe, genotipe, similaritas strain, gen virulen, dan patogenisitas serta potensi sel utuh dijadikan dasar dalam penyusunan formulasi vaksin. Vaksin sebelum digunakan dilakukan uji kualitas dan keamanan terlebih dahulu. Komposisi penyusun vaksin polivalen terdiri dari isolat PJbH, P, dan PBm1G dengan perbandingan 1:1:1. Sediaan vaksin monovalen, bivalen, dan polivalen inaktif sel utuh *E. ictaluri* inaktivasi formalin 0.3% terbukti aman digunakan dan tidak menimbulkan efek samping pada ikan patin. Efikasi vaksin monovalen, bivalen, dan polivalen *E. ictaluri* dengan konsentrasi  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> diinjeksikan secara intraperitoneal. Vaksin inaktif polivalen *E. ictaluri* terbukti mampu memberikan proteksi terbaik dan meningkatkan respons imun spesifik dan non-spesifik hingga pemeliharaan 35 hari.

Penelitian tahap kelima bertujuan mengkaji efektivitas dan proteksi vaksin inaktif polivalen sel utuh bakterin *E. ictaluri* dengan dan tanpa *booster* dalam menghasilkan respons imun dan meningkatkan kelangsungan hidup ikan patin. Ikan patin divaksinasi dengan vaksin inaktif polivalen bakterin *E. ictaluri* konsentrasi  $10^{10}$  dan  $10^9$  CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup>. Vaksin inaktif polivalen sel utuh *E. ictaluri*  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> dengan *booster* terbukti mampu memberikan proteksi nilai RPS terbaik yaitu sebesar 90.47, 55.00, dan 60.00% ketika diuji tantang dengan isolat PJbH, P, dan PBm1G serta menunjukkan peningkatan respons imun spesifik dan non-spesifik dibanding non-*booster* hingga pemeliharaan 77 hari.

Simpulan akhir dari penelitian ini adalah *E. ictaluri* yang berasal dari Jawa, Sumatera, dan Kalimantan berbeda secara fenotipe dan genotipe, memiliki variasi jumlah gen virulen yang berbeda namun secara umum memiliki gen T6SS (*evpC*) dan urease. Infeksi *E. ictaluri* menyebabkan perubahan abnormalitas patologi klinik, gambaran darah dan kerusakan jaringan. Sel utuh *E. ictaluri* mengandung komponen faktor virulen yang berperan dalam mekanisme patogenesis infeksi ESC pada ikan patin. Vaksin inaktif polivalen *E. ictaluri* konsentrasi  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> mampu menginduksi respons imun spesifik dan non-spesifik serta memberikan proteksi terbaik dengan nilai RPS sebesar 61.02% terhadap multi-infeksi *E. ictaluri* dibanding vaksin monovalen, bivalen, dan kontrol hingga pemeliharaan selama 35 hari. Vaksin polivalen *E. ictaluri* konsentrasi  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> dengan *booster* mampu menginduksi respons imun spesifik dan non-spesifik serta memberikan proteksi terbaik dengan nilai RPS tertinggi terhadap infeksi isolat *E. ictaluri* PJbH, P, dan PBm1G hingga pemeliharaan selama 77 hari.

Kata kunci: *E. ictaluri*, fenotipe, genotipe, polivalen, *relative percent survival*





## SUMMARY

UNI PURWANINGSIH. The *Edwardsiella ictaluri* Polyvalent Vaccine for Prevention Enteric Septicemia of Catfish. Supervised by SUKENDA, ANGELA MARIANA LUSIASTUTI, ALIMUDDIN, WIDANARNI and SRI NURYATI.

The cases of death due to Enteric Septicemia of Catfish (ESC) disease caused by the bacterium *Edwardsiella ictaluri* are the main obstacles in catfish farming in Indonesia. The differences in geographical conditions between regions are thought to be a factor causing phenotype and genotype variations of *E. ictaluri* isolates. The specific characteristics of isolates that can be a basis for consideration in the development of research on polyvalent *E. ictaluri* vaccines that can protect against heterologous antigen variations and increase the relative percent survival (RPS) value. The aim of this study was to develop a polyvalent *E. ictaluri* vaccine for the prevention of ESC disease in catfish, with five stages of research, namely 1) phenotype and genotype characteristics of *E. ictaluri*, 2) identification of virulent genes and evaluation of correlation to pathogenicity of *E. ictaluri*, 3) fractionation and bacterial protein toxicity of *E. ictaluri* in catfish, 4) the efficacy of various inactivated whole cell vaccine preparations of *E. ictaluri* in catfish supported by studies on vaccine quality and safety, and 5) the efficacy and protection of whole cell inactivated polyvalent vaccine *E. ictaluri* with and without booster on catfish.

The first phase of the study was aimed at identifying *E. ictaluri* isolates phenotypically and genotypically. The characteristics of the seventeen bacterial isolates from different regions were seven isolates from West Java (PCjG, PJIG), PSb5G, PSb3G, PSb1G, PSmH, P), one isolate from East Java (PTaH), two isolates from Riau (PR1G, BRSH), three isolates from South Sumatra (B1, B2, A2), one isolate from Jambi (PJbH), one isolate from Lampung (S.935G) and two isolates from South Kalimantan (PBm1G, PBm2G) were biochemically and API 20E identified as *E. ictaluri*. All isolates were  $\beta$ -hemolytic but the brightest zones were seen in PSb1G, PJbH, A2, P, and PBm1G isolates. The enzyme activities and antibiotic profiles were homologous in all isolates. The PCR analysis of all isolates with specific primers of *E. ictaluri* detected at 129 bp. The *E. ictaluri* isolates from Indonesia showed variations in genotypes. All isolates were 99.56-100% similar to strains of *E. ictaluri* 93-146 complete genome.

The second phase of the study aimed to identify virulence genes and analyze the correlation of virulence and pathogenicity genes in determining the composition of the *E. ictaluri* polyvalent vaccine. The identification of virulent genes showed varied results and in general all isolates of *E. ictaluri* had T6SS (evpC) and urease genes. The highest mortality of catfish due to infection with *E. ictaluri* of 96.67 – 100% occurred in fish infected with *E. ictaluri* PSb1G, PJbH, A2, P, and PBm1G with an average time of death of 3.73-4.58 days postinfection. The mortality of catfish due to ESC infection was not affected by the number of virulent genes possessed by *E. ictaluri*. The *E. ictaluri* infection causes changes in clinical pathological abnormalities, blood picture, and tissue damage.

The third phase of the study aimed to analyze the protein profile, whole cell toxicity and extracellular product (ECP) and their correlation to pathogenicity. The characterization of whole cell protein and ECP *E. ictaluri* using SDS-PAGE were indicated by the results of molecular weight (BM) measurements in each

preparation. The protein profile of intact cells in PjBH isolates showed 14 protein bands in the range 11.18 – 140 kDa, while in isolates P and PBm1G showed 10 protein bands in the range 11.18 – 71.06 kDa. The ECP protein profile detected only found 2 bands, namely 11.18 and 14.30 kDa. The highest mortality occurred in the treatment of whole cells P and PBm1G of 97.78% and 100%, while the PjBH showed a low mortality of 15.56%. The whole cell toxicity causes clinical symptoms, anatomic changes, and tissue damage.

The fourth stage of the study aimed to analyze the synergy and competence of various *E. ictaluri* bacterin antigens in inducing immunity in catfish. The results of the characterization of phenotype, genotype, strain similarity, virulence, and pathogenicity genes, whole cell potential were used as the basis for the preparation of vaccine formulations. Vaccines were tested for quality and safety before being used. The composition of the polyvalent vaccine consisted of PjBH, P, and PBm1G isolates in a ratio of 1:1:1. The whole cell monovalent, bivalent, and polyvalent vaccine preparations of *E. ictaluri* inactivated 0.3% formalin proved safe to use and did not cause side effects in catfish. The *E. ictaluri* monovalent, bivalent, and polyvalent vaccine efficacy with a concentration of  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> fish<sup>-1</sup> injected intraperitoneally. The inactivated polyvalent *E. ictaluri* vaccine provided the best level of protection and shown to be able to increase specific and non-specific immune responses until maintenance for 35 days.

The fifth stage of the study was aimed at assessing the effectiveness and protection of the inactivated polyvalent whole cell vaccine of *E. ictaluri* bacterin with and without a booster in producing an immune response and increasing survival in catfish. The catfish were vaccinated with the inactivated polyvalent bacterin *E. ictaluri* vaccine at concentrations of  $10^{10}$  and  $10^9$  CFU mL<sup>-1</sup> fish<sup>-1</sup>. The inactivated polyvalent whole cell *E. ictaluri* vaccine  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> fish<sup>-1</sup> with a booster was proven to be able to provide the best protection for RPS values of 90.47, 55.00 and 60.00% when challenged with PjBH, P, and PBm1G isolates and showed an increase in specific and non-specific immune responses compared to non booster until maintenance for 77 days.

The final conclusion from this research was that *E. ictaluri* originating from Java, Sumatra, and Kalimantan, differ in phenotype and genotype; have variations in the number of different virulent genes but generally have T6SS (evpC) and urease genes. The *E. ictaluri* infection causes changes in clinical pathological abnormalities, blood picture, and tissue damage. The whole cell of *E. ictaluri* contain components of virulent factors that play a role in the pathogenesis mechanism of ESC infection which causes a high mortality rate of 97.78-100% in catfish. The monovalent, bivalent, and polyvalent whole cell vaccines *E. ictaluri* inactivated formalin 0.3% proved safe to use and did not cause side effects in catfish; the polyvalent inactivated vaccine *E. ictaluri* at a concentration of  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> fish<sup>-1</sup> was able to induce specific and non-specific immune responses and provide the best protection with RPS values. by 61.02% against multiple infections of *E. ictaluri* compared to monovalent, bivalent, and control axins to maintenance for 35 days. The polyvalent vaccines of *E. ictaluri* at a concentration of  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> fish<sup>-1</sup> with a booster were able to induce specific and non-specific immune responses and provide the best protection with the highest RPS value against *E. ictaluri* PjBH, P, and PBm1G infection until maintenance for 77 days.

**Keywords:** *E. ictaluri*, genotype, phenotype, polyvalent, *relative percent survival*



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

© Hak Cipta milik IPB, tahun 2022  
Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

*Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah, dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB.*

*Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB.*





**VAKSIN POLIVALEN *Edwardsiella ictaluri* UNTUK PENCEGAHAN  
PENYAKIT *ENTERIC SEPTICEMIA OF CATFISH* PADA IKAN  
PATIN (*Pangasianodon hypophthalmus*)**

**UNI PURWANINGSIH**

Disertasi  
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Doktor pada  
Program Studi Ilmu Akuakultur

**ILMU AKUAKULTUR  
SEKOLAH PASCASARJANA  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR  
2022**

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
    - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
    - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
  2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



**@Hak cipta milik IPB University**

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

**Penguji Luar Komisi Pembimbing pada Ujian Tertutup Disertasi:**

- 1 Dr. Tb. Haeru Rahayu, A.Pi, M.Sc
- 2 Dr. Julie Ekasari, S.Pi. M.Sc

**Promotor Luar Komisi Pembimbing pada Sidang Promosi Terbuka Disertasi:**

- 1 Dr. Tb. Haeru Rahayu, A.Pi, M.Sc
- 2 Dr. Julie Ekasari, S.Pi. M.Sc



@Hak cipta milik IPB University

Judul : Vaksin Polivalen *Edwardsiella ictaluri* Untuk Pencegahan Penyakit *Enteric Septicemia of Catfish* Pada Ikan Patin (*Pangasianodon hypophthalmus*)  
Nama : Uni Purwaningsih  
NIM : C161180091

Disetujui oleh  
Komisi Pembimbing

Ketua:  
Prof. Dr. Ir. Sukenda, M.Sc



Anggota:  
Dr. drh. Angela Mariana Lusiastuti, M.Si



Anggota:  
Prof. Dr. Alimuddin, M.Sc



Anggota:  
Prof. Dr. Ir. Widanarni, M.Si



Anggota:  
Dr. Sri Nuryati, S.Pi, M.Si



Diketahui oleh

Ketua Program Studi:  
Prof. Dr. Alimuddin, M.Sc  
NIP 19700103 199512 1 001



Dekan Sekolah Pascasarjana:  
Prof Dr Ir Anas Miftah Fauzi, M.Eng  
NIP 19600419 198503 1 002



Tanggal Ujian: 15 Januari 2022

Tanggal Lulus: 29 JAN 2022

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang  
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :  
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah  
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.  
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



## PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah subhanaahu wa ta'ala atas segala karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan disertasi yang berjudul “Vaksin Polivalen *Edwardsiella ictaluri* Untuk Pencegahan Penyakit *Enteric Septicemia of Catfish* Pada Ikan Patin (*Pangasianodon hypophthalmus*)”. Hasil yang diperoleh dari penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat sebagai referensi untuk pengembangan vaksin untuk pengendalian penyakit pada budidaya ikan khususnya patin di Indonesia.

Disertasi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan studi program doktor di Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Penulis menyadari bahwa penelitian dan penulisan disertasi ini tidak terlepas dari dukungan berbagai pihak. Oleh karena itu penulis menyampaikan rasa hormat, penghargaan dan terima kasih yang setinggi-tingginya kepada:

1. Prof. Dr. Sukenda, M.Sc (Ketua komisi pembimbing), Anggota komisi pembimbing: Dr. drh. Angela Mariana Lusiastuti, M.Si; Prof. Dr. Alimuddin, M.Sc; Prof. Dr. Widanarni, M.Si; Dr. Sri Nuryati, M.Si yang telah mencurahkan ilmu, waktu, kesabaran, semangat, arahan, saran dan masukan yang sangat berarti bagi penulis.
2. Dr. Tb. Haeru Rahayu, A.Pi, M.Sc selaku Direktur Jenderal Perikanan Budidaya Kementerian Kelautan dan Perikanan dan Dr. Julie Ekasari, S.Pi, M.Sc yang telah meluangkan waktu berkenan menjadi penguji luar komisi pada sidang tertutup dan terbuka.
3. Dr. Ir. Mia Setiawati, M.Si dan Dr. Julie Ekasari, S.Pi, M.Sc yang telah berkenan menjadi penguji pada uji kualifikasi lisan, atas masukan dan saran untuk perbaikan proposal.
4. Rektor IPB, Dekan Sekolah Pascasarjana IPB, Dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan (FPIK) IPB, Ketua Program Studi Ilmu Akuakultur serta semua staf pengajar dan tenaga kependidikan yang telah menerima saya sebagai mahasiswa IPB mendapatkan pelayanan, fasilitas dan akses pendidikan, pengajaran dan kegiatan penelitian dengan baik.
5. Kepala Badan Riset Sumberdaya Manusia Kelautan dan Perikanan, Kepala Pusat Pendidikan Kelautan dan Perikanan BRSDMKP, Kementerian Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia, yang telah memberikan beasiswa program doctoral di IPB.
6. Dr. Arif Wibowo, M.Si selaku kepala Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan (BRPBATPP) Bogor.
7. Tim kesehatan ikan Instalasi Riset Pengendalian Penyakit Ikan (IRPPI) Depok: Ir. Taukhid, MSc; Dr. Desy Sugiani, M.Si; Dr. Lila Gardenia, M.Si; Dr. Yani Aryati, M.Si; Septiyan Andriyanto, M.Si; Tuti Sumiati, M.Si; Dr. Nunak Nafiqoh, M.Sc; drh. Tatik Mufidah, M.BioMed; Ahmad Wahyudi; Setiadi; Edy Farid Wadjdy; Johan Afandi, yang dengan sabar membantu tenaga dan waktu selama kurang lebih 1.5 tahun penulis melaksanakan penelitian.
8. Seluruh staf peneliti dan karyawan-karyawati lingkup Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan atas motivasinya selama penulis melaksanakan tugas belajar.
9. Dr. Ahmad Suhermanto, M.Si yang telah memberi banyak masukan dan semangat optimisme selama penulis menyelesaikan studi.

10. Rekan-rekan seperjuangan AKU 2018: Reza Samsudin, M.Si; Andri Herdiana, M.Si; Andri Iskandar, M.Si; Teuku Fadhlon, M.Si; Mulyadi, M.Si; Deasy Heptarina, M.Si dan Indarsiani, M.Si yang selalu saling memotivasi, menyemangati dan mendoakan semoga persahabatan dan kerjasama terjalin tanpa batas sepanjang hayat.
11. Dendi Hidayatullah, M.Si dan Wahid Hasyimi, M.Si atas segala bantuan, saran dan waktu diskusi selama penulis menyelesaikan penelitian.
12. Bapak/Ibu rekan sejawat di Kementerian Kelautan dan Perikanan lintas institusi yang telah banyak membantu kami: Edi Barkat, M.Sc; Mira Mawardi, M.Si; Wiwik Susanti, M.Si; Sumino, M.Si; Dayu Utami, M.Si; Jatmiko Darmawan Widi Prasetya, M.Si; Khumaira Puspasari, M.Si; Sri Sundari, A.Md, semoga Allah SWT membalas kebaikan Bapak dan Ibu.
13. Alm. Titi Lestari yang telah banyak membantu penulis sebagai petugas belajar program S2 dan S3 beasiswa BRSDM KKP, semoga Allah SWT membalas kebaikan beliau dengan pahala berlipat dan menempatkan ditempat terbaik bersama orang-orang beriman.
14. Ayahanda Sri Purwanto dan Ibu Suwarni, Bapak H.Saini dan Ibu Hj. Siti Sulaminah (ayah dan ibu mertua), eyang kakung Niti Miharjo dan eyang kakung Hadi Sumarto atas doa tulus tak henti, semangat, motivasinya untuk ananda menyelesaikan pendidikan tertinggi.
15. Suami tercinta drh. Agus Karyono, M.Si, ananda Fathia Qutrotunada Alifa, Fahira Amalia Khairunnisa dan Dirga Asgadipa Ghazi Alfarizky, Adik Herry Parbowo serta seluruh keluarga besar atas doa dan motivasi yang selalu memberikan semangat.

Semoga hasil penelitian ini bermanfaat untuk peningkatan produksi budidaya ikan patin dan bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Bogor, Februari 2022

*Uni Purwaningsih*

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.





### *@Hak cipta milik IPB University*

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

## DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xx
<b>I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Kerangka Berpikir Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	5
1.6 Kebaruan ( <i>Novelty</i> )	5
1.7 Hipotesis	5
<b>II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Ikan Patin ( <i>P. hypophthalmus</i> )	6
2.2 Penyakit <i>Enteric Septicemia of Catfish</i>	7
2.3 Bakteri <i>Edwardsiella ictaluri</i>	8
2.4 Virulensi Bakteri <i>Edwardsiella ictaluri</i>	9
2.5 Sistem Imunologi Ikan	10
2.6 Sitokin Pada Ikan	11
2.7 Vaksinasi Ikan	12
<b>III METODOLOGI UMUM</b>	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	13
3.2 Ikan Uji	13
3.3 Isolat Bakteri	13
3.4 Vaksin	14
3.5 Alur Pelaksanaan Penelitian	14
<b>IV PERBANDINGAN FENOTIPE DAN GENOTIPE <i>Edwardsiella ictaluri</i> ISOLAT LOKAL INDONESIA PENYEBAB <i>ENTERIC SEPTICEMIA OF CATFISH</i> PADA IKAN PATIN (<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>)</b>	
4.1 Pendahuluan	17
4.2 Bahan dan Metode	17
4.3 Hasil dan Pembahasan	20
4.4 Simpulan	28
<b>V IDENTIFIKASI GEN VIRULEN DAN PATOGENISITAS <i>Edwardsiella ictaluri</i> DARI SENTRA BUDIDAYA IKAN PATIN (<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>) DI INDONESIA</b>	

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

5.1	Pendahuluan	30
5.2	Bahan dan Metode	31
5.3	Hasil dan Pembahasan	33
5.4	Simpulan	44
<b>KARAKTERISTIK PROTEIN DAN TOKSISITAS <i>Edwardsiella ictaluri</i> PENYEBAB PENYAKIT <i>ENTERIC SEPTICEMIA OF CATFISH</i> PADA IKAN PATIN, <i>Pangasianodon hypophthalmus</i></b>		
6.1	Pendahuluan	46
6.2	Bahan dan Metode	47
6.3	Hasil dan Pembahasan	49
6.4	Simpulan	54
<b>VII EFIKASI VAKSIN MONOVALEN, BIVALEN DAN POLIVALEN SEL UTUH <i>Edwardsiella ictaluri</i> UNTUK PENCEGAHAN PENYAKIT <i>ENTERIC SEPTICEMIA OF CATFISH</i> PADA IKAN PATIN (<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>)</b>		
7.1	Pendahuluan	56
7.2	Bahan dan Metode	57
7.3	Hasil dan Pembahasan	61
7.4	Simpulan	69
<b>VIII EFIKASI DAN PROTEKSI VAKSIN POLIVALEN INAKTIF SEL UTUH <i>Edwardsiella ictaluri</i> UNTUK PENCEGAHAN PENYAKIT <i>ENTERIC SEPTICEMIA OF CATFISH</i> PADA IKAN PATIN (<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>)</b>		
8.1	Pendahuluan	71
8.2	Bahan dan Metode	72
8.3	Hasil dan Pembahasan	74
8.4	Simpulan	83
IX	PEMBAHASAN UMUM	84
X	SIMPULAN DAN SARAN UMUM	
10.1	Simpulan	93
10.2	Saran	93
	DAFTAR PUSTAKA	94
	LAMPIRAN	109
	RIWAYAT HIDUP	112

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang  
 1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :  
 a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah  
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.  
 2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

## DAFTAR TABEL

1	Isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian	13
2	Primer yang digunakan untuk <i>rep</i> -PCR	18
3	Karakteristik biokimia isolat bakteri dari ikan patin di Indonesia	20
4	Karakteristik profil aktivitas enzim bakteri dari ikan patin di Indonesia	21
5	Uji sensitivitas bakteri asal ikan patin terhadap antibiotik	23
6	Primer yang digunakan untuk mendeteksi gen virulen <i>E. ictaluri</i>	31
7	Identifikasi gen virulen <i>E. ictaluri</i>	33
8	Nilai mortalitas dan MTD pada ikan patin	35
9	Kode isolat <i>E. ictaluri</i> , asal dan jenis gen virulen	47
10	Perlakuan uji toksisitas	48
11	Konsentrasi protein sel utuh dan ECP bakteri <i>E. ictaluri</i>	49
12	Berat molekul protein bakteri <i>E. ictaluri</i>	50
13	Mortalitas ikan uji toksisitas sel utuh dan ECP <i>E. ictaluri</i>	52
14	Komponen perlakuan vaksin dan ujiantang	58
15	Kadar formalin sediaan vaksin <i>E. ictaluri</i> yang diinaktivasi dengan formalin 0.3%	61
16	Deteksi kadar residu formalin pada daging ikan patin yang divaksinasi vaksin monovalen, bivalen dan polivalen <i>E. ictaluri</i> yang diinaktivasi formalin 0.3%.	62
17	Tingkat SR dan RPS ikan patin pasca ujiantang bakteri <i>E. ictaluri</i>	68
18	Parameter kualitas air selama pemeliharaan ikan patin	69
19	Komponen perlakuan vaksin dan ujiantang	72
20	Pembobotan skor berdasarkan nilai RPS	73
21	Urutan primer yang digunakan untuk evaluasi respons imun dengan analisis RT-qPCR pada ikan patin pascavaksinasi dengan vaksin polivalen <i>E. ictaluri</i> dan pasca ujiantang	74
22	RPS ikan patin perlakuan <i>booster</i> dan <i>non booster</i> pasca ujiantang bakteri <i>E. ictaluri</i>	83
23	Parameter kualitas air selama pemeliharaan ikan patin	83



## DAFTAR GAMBAR

1	Kerangka pemikiran penelitian vaksin polivalen <i>E. ictaluri</i> untuk pencegahan penyakit ESC pada ikan patin	4
	Morfologi ikan patin	6
	Tahapan rencana penelitian vaksin polivalen <i>E. Ictaluri</i> untuk pencegahan penyakit ESC pada ikan patin	15
	Uji aktivitas hemolisis pada Agar Darah isolat kode sampel PSb1G, PjBH, A2, P dan PBm1G	21
	<i>Total plate count</i> dan nilai absorbansi pertumbuhan bakteri isolat kode sampel 1-17 selama 0-72 jam	22
6	Hasil amplifikasi <i>polymerase chain reaction</i> isolat sampel dengan primer spesifik <i>E. ictaluri</i>	24
7	Hasil amplifikasi <i>repetitive-sequence-mediated</i> PCR dari 17 isolat <i>E. Ictaluri</i>	25
8	Analisis <i>cluster</i> UPGAMA dendrogram dari Rep-PCR menggunakan primer (a) ERIC I & II, (b) ERIC II, (c) BOX dan (d) GTG <sub>5</sub>	26
9	Pohon filogenetik bakteri <i>E.ictaluri</i> berdasarkan gen sekuen 16S rRNA dengan metode <i>Neighbor Joining Tree</i>	27
10	Regresi linear korelasi jumlah gen virulen dengan mortalitas pada ikan patin	35
11	Gejala klinis ikan patin yang diinfeksi <i>E. ictaluri</i>	36
12	Kadar hematokrit ikan patin yang diinfeksi isolat <i>E. ictaluri</i> kode sampel 1-17	38
13	Kadar hemoglobin ikan patin yang diinfeksi isolat <i>E. ictaluri</i> kode sampel 1-17	38
14	Jumlah sel darah merah ikan patin yang diinfeksi isolat <i>E. ictaluri</i> kode sampel 1-17	39
15	Jumlah sel darah putih ikan patin yang diinfeksi isolat <i>E. ictaluri</i> kode sampel 1-17	39



16	Total limfosit ikan patin yang diinfeksi isolat <i>E. ictaluri</i> kode sampel 1-17	40
17	Total monosit ikan patin yang diinfeksi isolat <i>E. ictaluri</i> kode sampel 1-17	40
18	Total neutrofil ikan patin yang diinfeksi isolat <i>E. ictaluri</i> kode sampel 1-17	41
19	Kadar glukosa darah ikan patin yang diinfeksi isolat <i>E. ictaluri</i> kode sampel 1-17	41
20	Patologi anatomi organ hati, ginjal, dan limpa yang terinfeksi bakteri <i>E. ictaluri</i> 48 jam pascainfeksi	42
21.	Histopatologi organ Ginjal (1), Hati (2), Usus (3), Limpa (4), dan insang (5). N= kontrol; A= hari ke-4 pascainfeksi; B= hari ke-7 pascainfeksi; C= hari ke-14 pascainfeksi dan D = hari ke-21 pascainfeksi	43
22.	Hasil <i>SDS-PAGE</i> protein bakteri <i>E. ictaluri</i> (M) Marker (A) sel utuh isolat PjBH (B) sel utuh isolat P (C) sel utuh isolat PBm1G (D) ECP isolat 1PjBH (E) ECP isolat P (F) ECP isolat PBm1G	50
23.	Gejala klinis ikan patin yang diinjeksi dengan sel utuh <i>E. ictaluri</i> mengalami <i>ocular opacity</i> (A) lesi pada permukaan tubuh (B) lubang kepala (C), dan bengkak anus (D)	52
24.	Abnormalitas pola berenang ikan patin yang diinjeksi dengan sel utuh <i>E. ictaluri</i> mengalami kesulitan bernafas, berenang tidak menentu, dan akhirnya mati	52
25.	Patologi anatomi organ internal hati, ginjal, dan limpa pada uji toksisitas. A: kontrol, B: perlakuan ECP dan C: perlakuan sel utuh	53
26.	Histopatologi organ hati (A), ginjal (B) dan limpa (C) pascainjeksi sel utuh <i>E. ictaluri</i>	53
27.	Nilai titer antibodi serum ikan patin pasca vaksinasi dan pasca ujiantang terhadap antigen <i>E. ictaluri</i> yang berbeda	62
28.	Persen fagositosis ikan patin pasca vaksinasi dengan berbagai sediaan vaksin monovalen, bivalen dan polivalen <i>E.ictaluri</i> yang diinaktivasi dengan formalin 0.3% dan pasca ujiantang dengan multi infeksi <i>E. ictaluri</i>	63

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang  
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :  
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah  
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.  
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



29.	Indeks fagositik ikan patin pasca vaksinasi dengan berbagai sediaan vaksin monovalen, bivalen dan polivalen <i>E.ictaluri</i> yang diinaktivasi dengan formalin 0.3% dan pasca ujiantang dengan multi infeksi <i>E. ictaluri</i>	64
30.	Aktivitas lisozim ikan patin pasca vaksinasi dengan berbagai sediaan vaksin monovalen, bivalen dan polivalen <i>E.ictaluri</i> yang diinaktivasi dengan formalin 0.3% dan pasca ujiantang dengan multi infeksi <i>E. ictaluri</i>	65
31.	NBT Assay ikan patin pasca vaksinasi dengan berbagai sediaan vaksin monovalen, bivalen dan polivalen <i>E.ictaluri</i> yang diinaktivasi dengan formalin 0.3% dan pasca ujiantang dengan multi infeksi <i>E. ictaluri</i>	66
32.	Persentase total limfosit ikan patin pasca vaksinasi dengan berbagai sediaan vaksin monovalen, bivalen dan polivalen <i>E.ictaluri</i> yang diinaktivasi dengan formalin 0.3% dan pasca ujiantang dengan multi infeksi <i>E. ictaluri</i>	67
33.	Persentase total neutrofil ikan patin pasca vaksinasi dengan berbagai sediaan vaksin monovalen, bivalen dan polivalen <i>E.ictaluri</i> yang diinaktivasi dengan formalin 0.3% dan pasca ujiantang dengan multi infeksi <i>E. ictaluri</i>	67
34.	Persentase total monosit ikan patin pasca vaksinasi dengan berbagai sediaan vaksin monovalen, bivalen dan polivalen <i>E.ictaluri</i> yang diinaktivasi dengan formalin 0.3% dan pasca ujiantang dengan multi infeksi <i>E. ictaluri</i>	68
35.	Nilai titer antibodi serum ikan patin yang divaksin dengan vaksin polivalen <i>E. ictaluri</i>	75
36.	Persen fagositosis ikan patin pasca vaksinasi vaksin polivalen <i>E.ictaluri</i> yang diinaktifasi dengan formalin 0.3% hingga 77 hari pemeliharaan	75
37.	Indeks fagositosis ikan patin pasca vaksinasi vaksin polivalen <i>E.ictaluri</i> yang diinaktifasi dengan formalin 0.3% hingga 77 hari pemeliharaan	76
38.	Lisozim ikan patin pasca vaksinasi vaksin polivalen <i>E.ictaluri</i> yang diinaktifasi dengan formalin 0.3% hingga 77 hari pemeliharaan	77

39	NBT Assay ikan patin pasca vaksinasi dengan vaksin polivalen <i>E.ictaluri</i> yang diinaktifasi dengan formalin 0.3% hingga 77 hari pemeliharaan	78
40	Total limfosit ikan patin pasca vaksinasi vaksin polivalen <i>E.ictaluri</i> yang diinaktifasi dengan formalin 0.3% hingga 77 hari pemeliharaan	79
41	Total neutrofil ikan patin pasca vaksinasi vaksin polivalen <i>E.ictaluri</i> yang diinaktifasi dengan formalin 0.3% hingga 77 hari pemeliharaan	79
42	Total monosit ikan patin pasca vaksinasi vaksin polivalen <i>E.ictaluri</i> yang diinaktifasi dengan formalin 0.3% hingga 77 hari pemeliharaan	80
43	Tingkat ekspresi mRNA MHC II ikan patin pascavaksinasi dan pasca ujiantang	81
44	Tingkat ekspresi mRNA IL-1 $\beta$ ikan patin pascavaksinasi dan pasca ujiantang	82
45	Mekanisme kerja vaksin polivalen <i>E. ictaluri</i> terhadap kelangsungan hidup, RPS dan respons imun spesifik dan non spesifik (modifikasi dari Rogge dan Thune (2011); Crommelin <i>et al.</i> (2013)	91

## DAFTAR LAMPIRAN

1	Hasil <i>SDS- PAGE</i> protein sel utuh dan ECP bakteri <i>E. ictaluri</i>	109
2	Pengujian kadar formalin dengan metode AOAC (1990)	110
3	Hasil analisis formalin dari sediaan vaksin <i>E. ictaluri</i> dan ikan patin	111



### @Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.