



**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 mengumumkan 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 mengumumkan 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 mengumumkan 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 SDS- PAGE 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.

## I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Ikan patin (*Pangasianodon hypophthalmus*) merupakan salah satu komoditas utama ikan air tawar yang secara intensif dikembangkan sejak tahun 2015 di Indonesia. Produksi patin Indonesia sebesar 562.000 ton dari total produksi dunia sebesar sekitar 2.7 juta ton (tidak termasuk China), dan Indonesia merupakan negara produsen patin nomor empat terbesar didunia setelah Vietnam, India, dan Bangladesh (FAO 2020). Pada konferensi *Global Outlook for Aquaculture Leadership (GOAL) 2020*, berdasarkan data survei *Global Aquaculture Alliance (GAA)* diprediksi bahwa produksi patin pada tahun 2020 mengalami penurunan sebesar 7.4% akibat pandemi Covid-19 dan akan mengalami peningkatan kembali sebesar 11.2% pada tahun 2021. Di Indonesia, sentra budidaya patin tersebar di berbagai daerah yaitu Jambi, Sumatera Selatan, Riau, Lampung, Kalimantan Selatan, Kalimantan Tengah, Jawa Barat, dan Jawa Timur. Peningkatan produksi patin Indonesia selaras dengan amanat Instruksi Presiden No 7 Tahun 2016 tentang Percepatan Pembangunan Industri Perikanan Nasional. Peluang industri patin untuk konsumsi lokal sangat terbuka luas dengan adanya kebijakan larangan impor ikan patin oleh Kementerian Kelautan dan Perikanan yang didukung dengan Peraturan Menteri Perdagangan RI nomor 66 tahun 2018 mengenai pembatasan ketentuan impor hasil perikanan.

Intensifikasi budidaya merupakan salah satu usaha untuk mendukung peningkatan produksi patin lokal. Salah satu kendala yang timbul sejalan dengan perkembangan budidaya ikan patin adalah gangguan penyakit, baik yang bersifat infeksius maupun non-infeksius. Penyakit utama yang menjadi kendala pada budidaya patin dengan tingkat prevalensi dan mortalitas tinggi adalah *enteric septicemia of catfish (ESC)* yang disebabkan oleh bakteri *Edwardsiella ictaluri*. Penyakit tersebut memiliki tingkat virulensi yang tinggi, bersifat per akut hingga kronis, dan mengakibatkan kematian massal pada budidaya ikan patin.

*Edwardsiella ictaluri* tersebar luas dan terdeteksi pada lebih dari 20 spesies ikan air tawar dan laut dari 25 negara di Amerika, Eropa, Asia, Australia, Afrika, dan Timur Tengah (Hawke dan Khoo 2004). Bakteri *E. ictaluri* teridentifikasi menginfeksi *channel catfish* (Menanteau-Ledouble *et al.* 2011), *China farmed yellow catfish* (Ye *et al.* 2009; Liu *et al.* 2010), ikan ayu (Sakai *et al.* 2018), ikan zebra (Hawke *et al.* 2013), ikan patin (Crumlish *et al.* 2002; Dung *et al.* 2008 ; Mawardi *et al.* 2018; Phillips *et al.* 2016) dan ikan *catfish* hibrida (Suanyuk *et al.* 2014). Kasus kematian ikan patin akibat infeksi *E. ictaluri* menjadi penghambat keberhasilan produksi budidaya ikan patin di Indonesia. Timbulnya infeksi penyakit tersebut dapat terjadi karena rendahnya ketahanan tubuh ikan, lingkungan pemeliharaan yang buruk, dan manajemen pemberian pakan yang tidak baik. Monitoring dan surveilans hama penyakit ikan yang dilakukan sejak tahun 2015 sampai Agustus 2019 telah menetapkan ESC termasuk kedalam penyakit yang patut diwaspadai penyebarannya serta menyebabkan kerugian fisik dan ekonomi berdasarkan Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan No.17/KEPMEN-KP/2021. Estimasi kerugian akibat penyakit ini ditaksir mencapai 8.98 Milyar dalam kurun waktu 2015 hingga 2018 dengan tingkat prevalensi sebesar 6 % dan mortalitas 20%.

Upaya pengendalian yang dapat dilakukan untuk menanggulangi penyakit ESC adalah dengan menggunakan antibiotik jenis *florfenicol* dan *sulfadimethoxine* atau ormetoprim (Nho *et al.* 2017) namun menyebabkan berbagai dampak negatif yaitu akumulasi residu antibiotik dalam jaringan tubuh ikan dapat berpengaruh pada pertumbuhan, resistansi bakteri, dan immunosupresi (Maqsood *et al.* 2009). Antibiotik juga menjadi penyebab resistansi dan virulensi pada bakteri, termasuk transfer plasmid pada budidaya ikan lain, pencemaran lingkungan, dan berpengaruh terhadap kesehatan manusia (Pereira *et al.* 2015).

Salah satu kontrol terhadap penyakit ESC dapat dilakukan melalui vaksinasi yang merupakan upaya untuk menghindari berbagai dampak negatif dari penggunaan antibiotik. Vaksinasi merupakan salah satu upaya pencegahan melalui peningkatan sistem kekebalan ikan secara spesifik dan non-spesifik yang diharapkan dapat menjadi solusi aplikatif untuk menanggulangi penyakit tersebut pada budidaya ikan patin di Indonesia. Vaksinasi merupakan komponen terpenting dalam manajemen pengendalian penyakit ikan dan mengurangi penggunaan obat dalam budidaya ikan (Hanstein *et al.* 2005). Efektivitas vaksinasi terlihat dari menurunnya mortalitas ikan budidaya akibat infeksi patogen, menurunnya penggunaan antibiotik pada budidaya ikan, dan menurunnya resistansi beberapa jenis patogen terhadap antibiotik (Sun *et al.* 2014). Jenis vaksin yang sering digunakan dapat mengandung satu strain bakteri (monovalen) atau gabungan beberapa strain (polivalen).

Penanggulangan penyakit ESC akibat infeksi *E. ictaluri* dengan metode vaksinasi monovalen telah banyak dilakukan. Wang *et al.* (2016) menyatakan bahwa pemberian vaksin *E. ictaluri* secara signifikan mampu meningkatkan respons imun yang ditandai dengan peningkatan persentase fagositik, indeks fagositik, titer antibodi, persentase limfosit dan RPS sebesar 89.3%. Chatakondi *et al.* (2018) menyatakan bahwa kematian pada kelompok ikan yang tidak divaksin, baik *catfish* hibrida (85%) maupun *channel catfish* (73%) lebih tinggi dibandingkan pada kelompok ikan yang divaksin yaitu *catfish* hibrida sebesar 14.1 % dan *channel catfish* sebesar 26,6%. Vaksin *live attenuated E. ictaluri* (Ei1evpB dan ESC-NDKL1) memberikan perlindungan yang signifikan terhadap ESC pada benih ikan *channel catfish* (Nho *et al.* 2017; Abdelhamed *et al.* 2018). Penelitian yang dilakukan oleh Kordon *et al.* (2018) menunjukkan *catfish* yang divaksin *E. ictaluri* memiliki kemampuan fagositik secara signifikan lebih tinggi dibandingkan kelompok ikan kontrol. Kordon *et al.* (2019) menyatakan peningkatan signifikan aktivitas gen T-helper seperti IFN- $\gamma$  dan reseptor sel T pasca induksi vaksin *E. ictaluri* ESC-NDKL1 ditemukan pada ginjal anterior dan limpa.

Penapisan berbagai isolat *E. ictaluri* dari berbagai provinsi sentra budidaya patin sangat diperlukan untuk melihat keragaman genetik dalam menentukan isolat kandidat penyusun vaksin. Identifikasi gen virulen menjadi dasar penentuan komposisi pembuatan vaksin agar lebih efektif digunakan pada semua sentra produksi budidaya. Penelitian mengenai vaksin polivalen *E. ictaluri* adalah sesuatu yang baru dan sampai saat ini belum ditemukan publikasinya pada jurnal nasional maupun internasional. Penelitian ini merupakan langkah awal untuk mengeksplorasi potensi antigen dari berbagai strain bakteri *E. ictaluri* sebagai bahan vaksin dalam menginduksi respons kekebalan spesifik pada ikan patin untuk mencegah penyakit ESC.

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.



## 1.2 Rumusan Masalah

Penyakit ESC yang disebabkan oleh *E. ictaluri* merupakan penyakit utama pada budidaya ikan patin di Indonesia. Di Indonesia, prevalensi penyakit ini sebesar 10-30% dengan tingkat mortalitas 50-100% dalam waktu 2-3 minggu (Yuasa *et al.* 2003). Salah satu kontrol terhadap penyakit ESC dapat dilakukan melalui vaksinasi. Vaksinasi merupakan salah satu upaya pencegahan melalui peningkatan sistem kekebalan ikan secara spesifik dan non-spesifik yang diharapkan dapat menjadi solusi aplikatif untuk menanggulangi penyakit tersebut pada budidaya patin di Indonesia. Strain bakteri *E. ictaluri* dari berbagai wilayah di Indonesia kemungkinan memiliki perbedaan karakteristik dan sifat patogenisitas terhadap ikan patin. Vaksin polivalen *E. ictaluri* yang berasal dari isolat lokal Indonesia terseleksi dengan pertimbangan kajian fenotipe, similaritas strain, gen virulen, dan sifat patogenisitas diharapkan efektif dapat meningkatkan kelangsungan hidup ikan patin terhadap multi-infeksi strain *E. ictaluri* yang ada dibandingkan vaksin monovalen yang hanya protektif terhadap satu jenis strain saja.

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan umum penelitian ini adalah mengembangkan vaksin polivalen *E. ictaluri* untuk pencegahan penyakit ESC pada ikan patin. Penelitian ini secara khusus bertujuan :

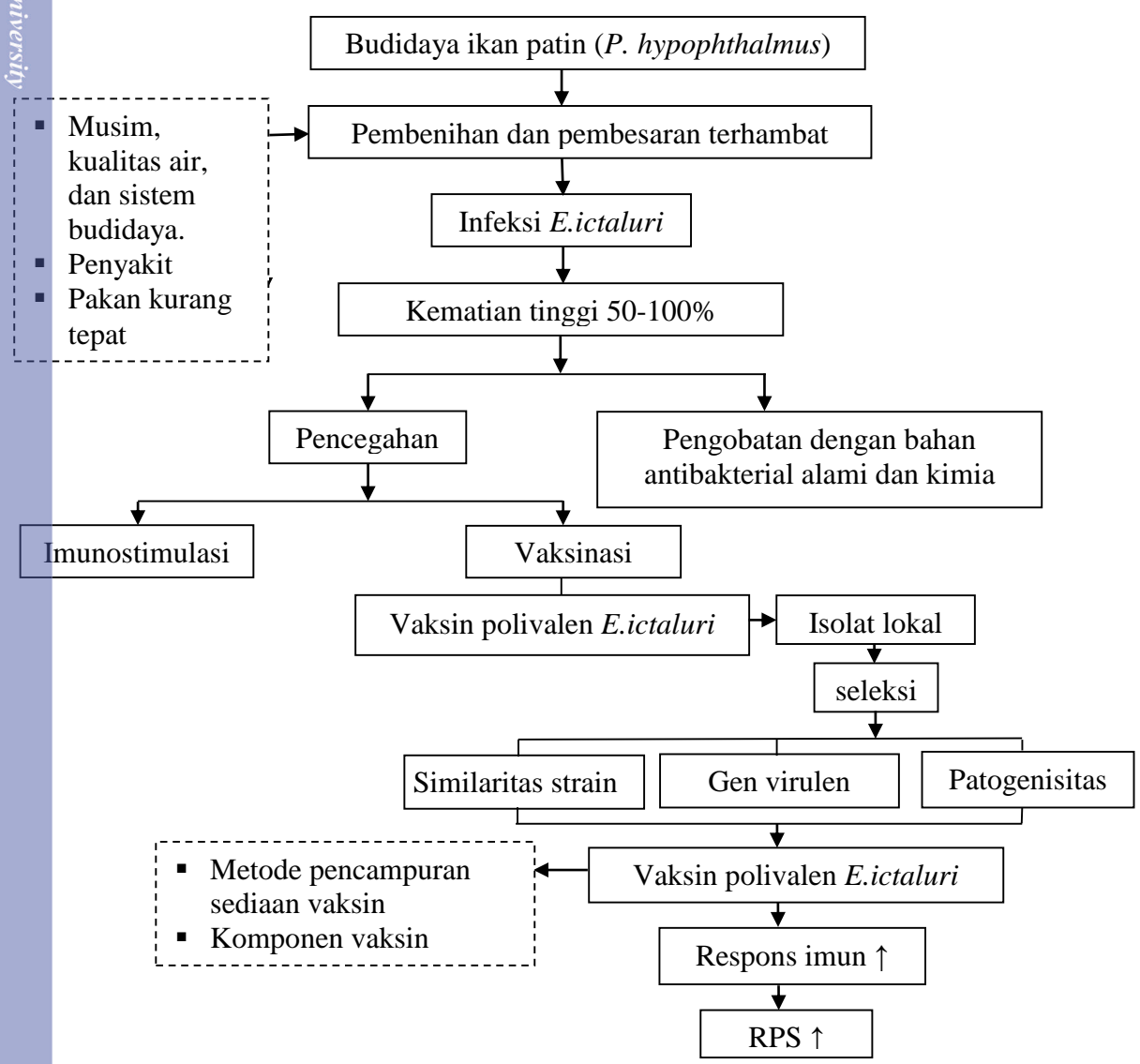
1. Mengidentifikasi isolat *E. ictaluri* secara fenotipe dan genotipe.
2. Mengidentifikasi gen virulen dan menganalisis korelasi gen virulen terhadap patogenisitas dalam menentukan komposisi penyusun vaksin polivalen *E. ictaluri*.
3. Menganalisis profil protein, toksisitas sel utuh, dan *extracellular product* (ECP) serta korelasinya terhadap patogenisitas.
4. Menganalisis sinergitas dan kompetensi berbagai antigen bakterin *E. ictaluri* dalam menginduksi imunitas pada ikan patin.
5. Mengkaji efektivitas dan proteksi vaksin inaktif polivalen sel utuh bakterin *E. ictaluri* dengan atau tanpa *booster* dalam menghasilkan respons imun dan meningkatkan kelangsungan hidup pada ikan patin.

## 1.4 Kerangka Penelitian

Budidaya ikan patin pada fase pembenihan dan pembesaran sangat rentan terhadap berbagai hambatan yang dapat mempengaruhi kelangsungan hidup. Faktor penyebab kegagalan kegiatan budidaya ikan patin dapat disebabkan gangguan dari lingkungan, nutrisi yang kurang baik, dan adanya serangan penyakit. Infeksi *E. ictaluri* menjadi masalah penting yang mempengaruhi kelangsungan hidup ikan patin, karena dapat menyebabkan kematian 50-100%. Ada dua opsi penanggulangan serangan penyakit ini yaitu melalui pengobatan, baik dengan menggunakan bahan alami maupun obat dari bahan kimia tertentu yang bersifat antibakteri namun belum tentu memberikan hasil yang optimal. Opsi kedua adalah melalui pencegahan yaitu dengan prinsip imunostimulasi melalui peningkatan respons imun yang bersifat non-spesifik dengan menggunakan imunostimulan sedangkan vaksinasi dengan target utamanya adalah meningkatkan kemampuan sel memori untuk mengenali agen penyebab penyakit sehingga proses respons imun dalam tubuh ikan dapat terbentuk lebih baik lagi melalui peningkatan respons imun

spesifik dan non-spesifik. Keuntungan aplikasi vaksinasi adalah memberi perlindungan dalam jangka tertentu terhadap infeksi patogen terhadap wabah penyakit yang sangat sulit diprediksi. Pada penelitian ini dikonstruksi suatu vaksin inaktif polivalen dari berbagai sediaan antigen heterolog untuk pencegahan penyakit ESC. Kajian yang dilihat adalah tingkat keamanan, profil protein, dan level proteksi ketika diaplikasikan secara injeksi intraperitoneal pada ikan patin. Hasil akhir dari penelitian ini menunjukkan sediaan bentuk vaksin polivalen yang dapat memberikan *relative percent survival* (RPS) paling tinggi.

Latar belakang dan kerangka berfikir penelitian vaksin polivalen inaktif antigen *E. ictaluri* untuk pencegahan penyakit pada ikan patin (*P. hypophthalmus*) dijabarkan pada Gambar 1.



Gambar 1 Kerangka pemikiran penelitian vaksin polivalen *E. ictaluri* untuk pencegahan penyakit ESC pada ikan patin

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.

## 1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini menghasilkan kandidat vaksin polivalen *E. ictaluri* dan komposisi penyusun vaksin untuk pencegahan penyakit ESC pada budidaya ikan patin di seluruh Indonesia.

## 1.6 Kebaruan (*novelty*)

Penelitian ini mempunyai nilai kebaruan (*novelty*) yaitu:

1. Gen virulen isolat lokal *E. ictaluri* asal Indonesia
2. Formula vaksin polivalen *E. ictaluri*
3. Vaksin polivalen untuk pencegahan infeksi ESC

## 1.7 Hipotesis

Hipotesis penelitian ini sebagai berikut:

1. Strain bakteri *E. ictaluri* dari berbagai wilayah di Indonesia memiliki perbedaan fenotipe dan genotipe.
2. Ada korelasi antara gen virulen dan patogenisitas bakteri *E. ictaluri* sebagai dasar dalam menentukan formulasi vaksin polivalen *E. ictaluri*.
3. Sel utuh bakteri *E. ictaluri* mengandung lebih banyak komponen protein yang berperan dalam patogenisitas infeksi ESC pada ikan patin.
4. Berbagai antigen bakteri *E. ictaluri* memiliki sinergitas dan kompetensi dalam menginduksi respons imun pada ikan patin.
5. Vaksin polivalen bakterin *E. ictaluri* dengan *booster* dapat memberikan proteksi lebih baik dibandingkan tanpa *booster* pada ikan patin.



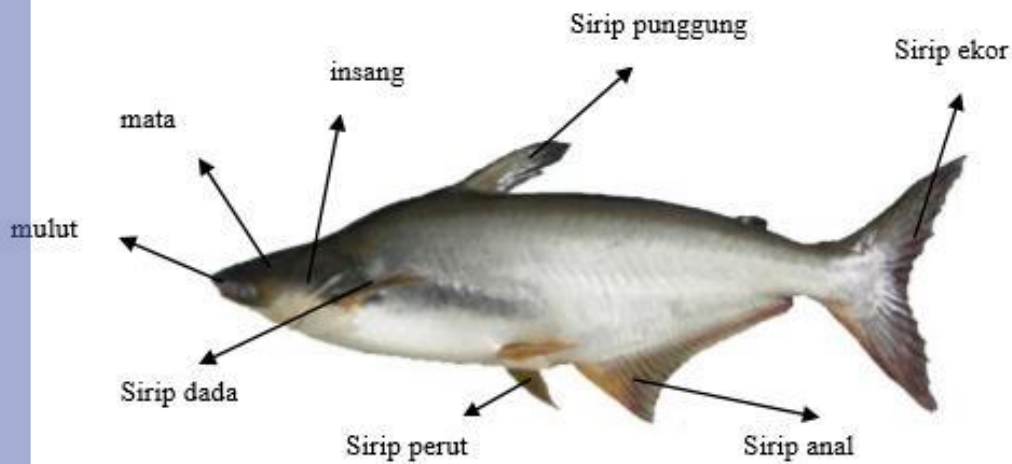
## II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Ikan Patin (*P. hypophthalmus*)

Ikan patin siam (*P. hypophthalmus*) merupakan salah satu ikan introduksi yang telah dikenal masyarakat Indonesia. Budidaya ikan patin siam mulai berkembang pada tahun 1980 sejak keberhasilan teknik produksi massal benih secara buatan (Hardjamulia *et al.* 1981). Ikan patin siam merupakan salah satu komoditas perikanan yang memiliki nilai ekonomis tinggi baik pada tahap pembenihan maupun pembesaran. Prospek usaha ikan patin sangat menjanjikan karena segmentasi pasarnya masih terbuka luas baik di dalam negeri maupun pasar internasional untuk skala ekspor. Ikan patin siam memiliki keunggulan antara lain laju pertumbuhannya cepat, fekunditas tinggi, dapat diproduksi secara massal, dan memiliki harga jual yang tinggi, serta rasa daging yang digemari oleh masyarakat.

Klasifikasi ikan patin siam menurut Saanin (1984) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Ordo	: Ostariophysi
Sub ordo	: Siluroidei
Family	: Schilbeidae
Genus	: Pangasius
Spesies	: <i>Pangasius hypophthalmus</i>



Gambar 2 Morfologi Ikan Patin (*P. hypophthalmus*)

Ikan patin siam mempunyai bentuk tubuh yang memanjang, berwarna putih perak dengan punggung berwarna agak kebiruan, kepala ikan relatif kecil dengan mulut terletak di ujung kepala agak kebawah. Ikan patin tidak memiliki sisik, hal ini merupakan ciri khas golongan *catfish*, panjang tubuhnya dapat mencapai 120 cm, sudut mulutnya terdapat dua pasang kumis pendek yang berfungsi sebagai

peraba. Pada permukaan punggung terdapat sirip lemak berukuran sangat kecil dan sirip ekornya membentuk cagak bentuk simetris (Subagja 1999).

Habitat ikan patin adalah tepi dan muara sungai serta danau. Dilihat dari bentuk mulut ikan patin yang letaknya sedikit agak ke bawah, maka ikan patin termasuk ikan yang hidup di dasar perairan. Kelangsungan hidup ikan sangat dipengaruhi oleh kualitas air, media air yang digunakan untuk pemeliharaan ikan patin siam harus memenuhi kebutuhan optimal ikan yaitu suhu 25-33 °C, oksigen terlarut > 4 ppm dan pH 6-8. Patin bersifat nokturnal, yaitu beraktivitas di malam hari. Benih patin di alam biasanya bergerombol dan sesekali di permukaan air untuk menghirup oksigen langsung dari udara menjelang fajar.

Ikan patin merupakan ikan pemakan segala (omnivor), tetapi cenderung ke arah karnivor. Di alam, makanan utama ikan patin siam berupa udang renik (*crustacea*), insekta, dan *molusca*. Sementara makanan pelengkap ikan patin berupa rotifera, ikan kecil, dan daun-daunan yang ada di perairan. Sumber energi yang didapatkan dari makanan tersebut digunakan sebagai pertumbuhan dan kelangsungan hidup ikan patin (Mahyuddin 2010). Pertumbuhan patin yang baik harus didukung oleh pakan yang berkualitas dengan kandungan nutrisi yang mencakup protein, lemak, karbohidrat, vitamin, dan mineral. Pakan yang diberikan untuk ikan patin diharapkan mampu menghasilkan bobot rata-rata, kadar protein tubuh, dan efisiensi pakan yang tinggi (Tahapari *et al.* 2008). Cara yang biasa dilakukan oleh pengusaha budidaya ikan patin untuk menambah tingkat produktivitas dan kesuburan yaitu dengan memberikan pelet yang berkadar protein 30-40%. Dosis pakan yang diberikan 3-5% dari bobot tubuh dengan frekuensi tiga kali pemberian per hari yaitu pada pagi, siang, dan sore hari.

## 2.2 Penyakit *Enteric Septicemia of Catfish*

*Enteric septicemia of catfish* pertama kali dikenal pada tahun 1976 sebagai penyebab kematian pada benih *channel catfish* (*Ictalurus punctatus*) di Alabama dan Georgia, USA. Bakteri penyebab penyakit ini teridentifikasi sebagai spesies *E. ictaluri*. *Edwardsiella ictaluri* juga dilaporkan telah menginfeksi *walking catfish* (*Clarias batrachus*) yang dibudidayakan di Thailand pada tahun 1987. Bakteri *E. ictaluri* merupakan penyebab ESC pada patin yang menimbulkan kematian sebesar 50-90% (Triet *et al.* 2019). Di Indonesia, ESC dilaporkan pertama kali menginfeksi ikan patin siam (*P. hypophthalmus*) di Provinsi Jambi pada bulan Januari 2002 (Panigoro *et al.* 2005). Supriyadi *et al.* (2005) juga menemukan adanya *E. ictaluri* yang telah menginfeksi ikan patin yang dibudidayakan di Provinsi Jambi, dan ikan lele di daerah Blitar, Jawa Timur. *Edwardsiella ictaluri* juga diidentifikasi sebagai penyebab penyakit pada *P. hypophthalmus* di Indonesia (Dung *et al.* 2008). Dugaan infeksi penyakit ESC dengan tanda klinis yang spesifik teridentifikasi masih terus terjadi hingga saat ini di berbagai lokasi sentra budidaya patin di Indonesia.

*Enteric septicemia of catfish* menyebabkan kerugian ekonomi yang besar akibat angka kematian tinggi, kerentanan terhadap penyakit lain serta biaya pengobatan yang tinggi. Kerugian akibat ESC pada industri *catfish* dilaporkan mencapai 40-60 milyar (Shoemaker *et al.* 2009). Pada infeksi akut, kematian dapat terlihat pada hari ke-4 sampai ke-12. Hawke *et al.* (2013) juga melaporkan kejadian infeksi ESC sebagai penyebab kematian pada ikan zebra (*Danio rerio*). Faktor stres termasuk kualitas air, kualitas pakan yang buruk, penanganan yang kasar, kepadatan tinggi, dan fluktuasi suhu air meningkatkan kerentanan ikan terhadap

ESC (Abdelhamed *et al.* 2017). Stres dan manajemen yang buruk meningkatkan kerentanan terhadap ESC yang memengaruhi mekanisme pertahanan inang (Cunningham *et al.* 2014; Eissa dan Wang 2016).

Secara umum, ESC umumnya hadir dalam tiga bentuk, yaitu septikemia akut dengan mortalitas tinggi dan bentuk kronis terbatas pada sistem saraf pusat yang ditandai dengan bentuk lesi khas “hole in the head”, sedangkan bentuk subakut ditandai tingkat kematian yang lebih rendah daripada infeksi akut. ESC rentan pada ikan berumur kurang dari satu tahun dengan infeksi terjadi akut dalam kisaran suhu optimal 22-28 °C dan kronis di luar kisaran tersebut. Penyakit kronis juga terlihat pada populasi yang selamat dari wabah yang telah memiliki kekebalan terhadap ESC, terutama jika kondisi lingkungannya kurang optimal (Thune *et al.* 2007).

### 2.3 Bakteri *Edwardsiella ictaluri*

*Edwardsiella ictaluri* adalah patogen intraseluler fakultatif yang menyebabkan septikemia enterik pada ikan, dilaporkan pada tahun 1981 (Hawke *et al.* 1981; Hawke *et al.* 1998). Dua dari tiga spesies yang termasuk genus *Edwardsiella* berkaitan dengan proses infeksi pada manusia dan hewan. Karakteristik biokimia *E. ictaluri* pertama kali digambarkan oleh Hawke *et al.* (1981) dan dipelajari lebih lanjut oleh Waltman *et al.* (1986) dengan menguji 119 isolat *E. ictaluri* dan ditemukan 100% positif dalam pengujian metil red, nitrat reduktase, lisin dekarboksilase, ornithin dekarboksilase, dan katalase. Selain itu, hasil pengujian menyatakan 100% negatif dalam pengujian sitrat, malonat, *Voges Proskauer*, *phenylalanin*, indol, arginin dihidrolase, sitokrom oksidase,  $\beta$ -galactosidase, dan *hydrolyzing urea*.

Karakteristik dari *E. ictaluri* adalah bergerak dengan flagela, tidak berspora, tidak berkapsul, batang, pleomorfik, Gram-negatif, berukuran 0.75-2.5  $\mu$ m, koloni kecil, bulat transparan, tidak berwarna, suhu optimum 28-30 °C, oksidase (-), katalase (+), H<sub>2</sub>S (-), indol (-) (dari tryptophan), fermentatif, resisten terhadap antibiotik 0/129, lisin dekarboksilase (+), arginin dihidrolase (-), ornithin (+), gelatin (-), urea (-), citrat (-), *Voges-Proskauer* (-), glukosa (+), inositol (-), sorbitol (-), rhamnose (-), mannitol (-), arabinose (-), sukrose (-), dan fakultatif anaerob (Austin and Austin 1987; Crumlish *et al.* 2002; *World Organization for Animal Health*, 2006; Holt *et al.* 1994). Masa inkubasi *E. ictaluri* adalah 36-48 jam, tampak sebagai koloni non-pigmen yang halus, bundar (diameter 1-2 mm), cembung ramping sampai keseluruhan tepi. *E. ictaluri* dengan mudah dapat dibedakan dari *E. tarda* dari ketidakmampuannya untuk memproduksi indol dan H<sub>2</sub>S dimana *E. tarda* mampu memproduksi keduanya.

Berdasarkan tes API ZYM, *E. ictaluri* memiliki sifat enzimatik positif terhadap alkali fosfatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), *leucine arylamidase*, *valine arylamidase*,  $\alpha$ -chymotrypsin, *acid phosphatase*, *naphthol-AS-BI-phosphohydrolase* dan *N-acetyl- $\beta$ -glucosaminid*, dan reaksi negatif untuk lipase (C14), sistin arilamidase, tripsin,  $\alpha$ -galaktosidase,  $\beta$ -galaktosidase,  $\beta$ -glukuronidase,  $\alpha$ -glukosidase,  $\beta$ -glukosidase,  $\alpha$ -mannosidase, dan  $\alpha$ -fucosidase (Liu *et al.* 2010).

## 2.4 Virulensi *E. ictaluri*

Efek patogenik *E. ictaluri* telah dilaporkan dapat menyebabkan kematian hingga 50%. Mekanisme mengenai patogenisitas *E. ictaluri*, dan korelasi antara produk ekstraseluler dengan faktor virulensi belum banyak diketahui (Williams *et al.* 2008). Faktor virulensi *E. ictaluri* ditemukan pada beberapa bagian diantaranya flagela (Newton dan Triche 1993), kapsul ekstraseluler polisakarida (Standley *et al.* 1994), lipopolisakarida (Lawrence *et al.* 2001), protein membran luar (Arias *et al.* 2003), hemolisin (Williams dan Lawrence 2005) dan kondroitinase (Copper *et al.* 1996).

Riset menunjukkan bahwa *lipopolysaccharide oligo-polysaccharide* (LPS O-PS) *E. ictaluri* memainkan peran utama selama infeksi (Santander *et al.* 2014), dalam siklus *tricarboxylic acid* (TCA) dan sistem pengambilan *ferric hydroxamate* juga berkontribusi terhadap virulensi *E. ictaluri* pada ikan *catfish* (Dahal *et al.* 2013). Gen TonB berpartisipasi dalam patogenesis ESC dan merupakan faktor virulensi *E. ictaluri* yang penting (Abdelhamed *et al.* 2017). TonB memediasi transportasi zat besi, vitamin B, nikel, karbohidrat, dan substrat lainnya (Noinaj *et al.* 2010). Menurut Thune *et al.* (2007) genom *E. ictaluri* diketahui memiliki delapan insersi gen yang mengodekan protein terkait dengan virulensi, termasuk tiga gen yang terlibat dalam biosintesis *lipopolysaccharide*, tiga gen yang terlibat dalam sistem sekresi tipe III (T3SS), dan dua gen yang terlibat dalam aktivitas urease. Perbandingan kandungan nukleotida pada T3SS dari *E. ictaluri* menunjukkan kedekatan dengan *Chromobacterium violaceum*.

Sakai *et al.* (2018) melakukan analisis komparatif proteomik antara strain *E. ictaluri* virulen dan tidak virulen yang berasal dari ikan ayu (*Plecoglossus altivelis*), hasilnya menunjukkan bahwa *E. ictaluri* memiliki berbagai faktor virulen yang secara umum juga dimiliki oleh *E. tarda* dan sebagian besar faktor virulen tersebut berhubungan dengan kelangsungan hidup bakteri pada inang. Sekuen amino acid dari kelompok protein porin (LomR) terdeteksi pada *E. ictaluri* strain FPC1091 dan 50% sama dengan adhesin *E. coli* (Fagan and Smith 2007). Protein tersebut berkontribusi pada inflamasi granulomatosa dan beberapa infiltrasi makrofag menjadi ciri khas dari ESC dan aktivitas *respiratory burst* teridentifikasi tinggi pada neutrofil ikan ayu.

*Edwardsiella ictaluri* mengodekan beberapa sistem akuisisi besi dalam genomnya, hal tersebut mengindikasikan pentingnya penyerapan zat besi selama infeksi. Mutasi protein TonB pada *Pseudomonas fluorescens* mengakibatkan penurunan pertumbuhan dalam media Luria Bertani dengan atau tanpa suplementasi zat besi (Hu *et al.* 2012). Kurangnya zat besi menyebabkan stres yang signifikan untuk bakteri patogen dan dianggap sebagai sinyal yang mengarah pada perubahan ekspresi gen virulen (Massé dan Arguin 2005). Di lingkungan lambung ikan, *E. ictaluri* menghadapi stres akibat kekurangan zat besi selama fase awal infeksi. Penelitian yang dilakukan oleh Dumpala *et al.* (2015) menunjukkan bahwa protein *E. ictaluri* ada yang mengalami peningkatan kelimpahan dalam kondisi terbatas zat besi dan penurunan gen *Ei1tonB* sebesar 2.16 kali lipat dibandingkan dengan *E. ictaluri* strain alam.

Soto *et al.* (2012) menyatakan bahwa ikan mempunyai kerentanan yang berbeda terhadap infeksi *E. ictaluri*. Ikan nila dapat mengalami kematian sampai 40% pada infeksi bakteri dengan konsentrasi  $10^3$  CFU mL<sup>-1</sup> dan pada ikan ayu kematian mencapai 50% jika diinfeksi  $10^4$  CFU mL<sup>-1</sup> (Sakai *et al.* 2008). Selain itu



Suanyuk *et al.* (2014) melaporkan bahwa konsentrasi *E. ictaluri*  $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup> menimbulkan kematian 50% pada *catfish* hibrida dan Pasnik *et al.* (2007) menyatakan bahwa kematian ikan *white perch* terjadi sampai 100% pada infeksi *E. ictaluri*  $10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>.

Patogenesis *E. ictaluri* dipengaruhi oleh multifaktor, mekanismenya sangat sedikit dipahami, lokasi pelekatan (*attachment*), dan penetrasinya tidak diketahui, meskipun usus dan kulit adalah tempat yang paling disukai untuk penetrasi bakteri. Informasi mengenai karakteristik fenotipe, genotipe dan proteotipik *E. ictaluri* dari lingkungan maupun klinis masih sangat terbatas (Menanteau-Ledouble *et al.* 2011). Hal ini menjadi penyebab pembudidaya ikan tidak tepat mengidentifikasi patogen sebenarnya sehingga keliru dalam menentukan pengobatan yang akhirnya berpengaruh terhadap keberhasilan pengendalian penyakit tersebut.

## 2.5 Sistem Imunologi Ikan

Pendapat awal menyatakan bahwa ikan teleostei dianggap tidak memiliki suatu reaksi kekebalan, namun terbantahkan setelah ditemukan suatu reaksi kekebalan pada ikan salmon. Ikan seperti hewan pada umumnya, memiliki mekanisme pertahanan diri (sistem imun) terhadap patogen. Meskipun sistem imun belum selengkap pada vertebrata tingkat tinggi tetapi sistem imun ikan jauh lebih berkembang dibandingkan dengan sistem imun pada invertebrata. Selain itu pada ikan sudah terdapat respons imun spesifik terhadap antigen (Irianto 2005). Respons imun dibentuk oleh organ limfoid, pada ikan organ limfoid letaknya menyatu dengan jaringan myeloid sehingga dikenal dengan jaringan limfomyeloid.

Sistem pertahanan spesifik tubuh ikan terbagi menjadi dua, yaitu pertahanan seluler (*cell mediated immunity*) dan pertahanan humoral (*antibody production*). Paparan antigen menghasilkan stimulasi sejumlah sel limfosit muda yang dapat mengenali antigen melalui reseptor spesifik. Pada awal kehidupannya, sistem pertahanan ikan yang mula-mula berfungsi adalah sistem pertahanan non-spesifik, sedangkan pertahanan spesifik pada ikan baru berkembang dan dapat berfungsi dengan baik sekitar umur beberapa minggu setelah telur menetas (Ellis 1988).

Menurut Anderson (1974) respons seluler pada ikan merupakan respons imun yang bersifat non-spesifik. Respons ini meliputi pertahanan mekanik dan kimiawi (mukus, kulit, sisik, dan insang) serta pertahanan seluler (sel makrofag, leukosit seperti limfosit, monosit, neutrofil, eosinofil, dan basofil). Mekanisme pertahanan tubuh yang sinergis antara pertahanan humoral dan seluler dimungkinkan oleh adanya interleukin, interferon, dan sitokin, yang berperan sebagai komunikator dan amplifikasi dalam mekanisme pertahanan humoral dan seluler ikan.

Antibodi pada teleost memainkan peran kunci dalam respons imun. Secara umum, IgM adalah imunoglobulin yang utama pada teleost yang dihasilkan dari respons humoral spesifik yang efektif terhadap berbagai antigen (Kaattari *et al.*, 1998). Selain itu juga dilaporkan mengenai keberadaan IgD / IgZ / IgT pada ikan (Stenfik *et al.* 2000 ; Danilova *et al.* 2005 ; Hansen *et al.* 2005). Sel B lebih banyak dipelajari karena sejumlah metode telah berhasil dalam mengisolasi dan mengidentifikasi antibodi monoklonal (Zhang *et al.* 2011).

Antibodi dapat bekerja melalui 3 cara yaitu: 1) langsung menyerang benda asing, 2) melalui pengaktifan sistem komplemen untuk menghancurkan benda asing dan 3) pengaktifan sistem yang mengubah lingkungan antigen benda asing. *Major*



*histocompatibility complex* (MHC) merupakan molekul protein yang berfungsi mengenal antigen dalam mekanisme imunitas spesifik. Madigan *et al.* (2016) menyatakan bahwa MHC merupakan daerah gen yang menyandi beberapa protein penting untuk pemrosesan dan penyajian antigen dimana protein MHC I diekspresikan pada semua sel dan MHC II hanya diekspresikan pada sel penyaji antigen (*antigen presenting cell*). Parameter humoral utama yang diperoleh adalah Igs (antibodi), sebagai reseptor limfosit B, disekresi dalam plasma, pemicu aktivasi sistem kekebalan adaptif dan proliferasi limfosit, berlangsung di jaringan limfoid yang terorganisir. Setelah aktivasi oleh antigen tertentu, baik dalam bentuk terlarut atau dalam hubungan dengan MHC pada *antigen presenting cell*, sel B berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel memori dan sel plasma mengeluarkan antibodi spesifik. Sel T menggunakan spesifik reseptor, mengenali patogen dalam hubungan dengan MHC pada *antigen presenting cell* (Magnadóttir 2010)

Tanggapan kebal adaptif dapat terbentuk pada kelompok teleost seperti ikan dan dapat dideteksi dalam hitungan hari bahkan minggu (4-6 minggu) dari infeksi atau peradangan awal tergantung dari suhu lingkungan. Tanggap kebal adaptif terdiri dari jaringan sel protein kompleks, pengantar pesan biokimia (sitokin), dan gen yang bekerja sama untuk menghasilkan suatu induksi tanggap kebal spesifik yang memerlukan Abs (antibodi spesifik) dan Ags (antigen spesifik) (Press & Evenson 1999).

## 2.6 Sitokin Pada Ikan

Pada ikan mekanisme kompleks yang mengatur respons imun bawaan dan adaptif terkait erat dengan peran berbagai sitokin. Sitokin adalah protein yang disekresikan dengan fungsi pertumbuhan, diferensiasi, dan aktivasi mengatur sifat respons imun. Sitokin terlibat dalam beberapa langkah respons imun, dari induksi respons bawaan ke generasi sel T sitotoksik dan produksi antibodi. Pada vertebrata yang lebih tinggi, kombinasi sitokin disekresikan sebagai respons terhadap stimulasi kekebalan dalam menginduksi ekspresi gen kekebalan melalui beberapa jalur pensinyalan, yang berkontribusi pada inisiasi respons imun. Sitokin dapat memodulasi respons imun melalui autokrin atau cara parakrin saat terikat pada reseptor yang sesuai (Wang *et al.* 2011).

Sitokin diproduksi oleh makrofag, limfosit, granulosit, sel dendritik, sel mast, dan sel epitel. Jenis sitokin antara lain interferon (IFN), interleukin (IL), tumor nekrosis faktor (TNF), *colony stimulating factors*, dan kemokin. Makrofag dapat mengeluarkan IL-1, IL-6, IL-12, TNF $\alpha$ , dan kemokin seperti IL-8 dan MCP-1, yang semuanya sangat diperlukan untuk perekrutan makrofag, neutrofil, dan limfosit ke jaringan yang terinfeksi dan mengeliminasi patogen. Sementara itu, sitokin yang dilepaskan oleh fagosit dalam jaringan juga dapat menginduksi protein fase akut, termasuk *mannosa binding lectin* (MBL) dan *C-reactive protein* (CRP), dan mempromosikan migrasi dari sel dendritik (Reyes-Cerpa *et al.* 2012).

Studi mengenai ekspresi gen imun telah banyak dilakukan untuk mendeteksi respons imun pada ikan. Bilodeau *et al.* (2005) berhasil mengidentifikasi *toll like receptor* TLR3 dan TLR5 pada *catfish* yang terinfeksi bakteri *E. ictaluri*. Gao *et al.* (2012) menyatakan bahwa sejumlah gen imun ditemukan sebagai respons imun bawaan pada *catfish*, termasuk pola pengenalan reseptor, peptida antimikroba, komplemen, lektin, sitokin, transferin, dan *profiling* ekspresi gen dengan teknik *microarrays*. Penelitian Kordon *et al.* (2019) menunjukkan bahwa pemberian



vaksin *live attenuated* secara signifikan meningkatkan ekspresi gen IFN- $\gamma$  dan MHC II dan juga kemokin pro-inflamasi dan gen sitokin IL-8, IL-1 $\beta$ , dan TNF- $\alpha$  dibandingkan dengan kelompok kontrol.

## 2.7 Vaksinasi Ikan

Vaksinasi merupakan upaya untuk meningkatkan respons imun terhadap patogen tertentu. Antigen yang digunakan sebagai vaksin dapat berupa organisme hidup yang masih ganas atau sudah dilemahkan, organisme utuh yang dimatikan, fragmen subseluler, antigen permukaan sel, toksin yang diinaktifkan, rekombinan DNA, dan anti-idiotipe.

Vaksin bakteri adalah antigen buatan yang berasal dari suatu jasad patogen yang sudah dilemahkan atau dimatikan, selanjutnya akan merangsang sistem imun dengan cara meningkatkan kekebalan ikan dari infeksi patogen tertentu. Umumnya ada dua tipe vaksin, yaitu vaksin mati (*dead vaccine*) dan vaksin hidup (*live vaccine*). Vaksin mati yang berupa organisme patogen yang dinonaktifkan (dimatikan) dengan cara pemanasan yaitu pada suhu 100 °C (*heat killed*), formalin (*formaline killed*), dan penghancuran dengan menggunakan sonikator (*sonic killed*), sedangkan vaksin hidup yang berupa organisme patogen yang dilemahkan tanpa atau dengan mengurangi virulensinya (Ellis 1988).

Ikan dapat diimunisasi dengan tiga cara, melalui injeksi (intraperitoneal), perendaman dalam larutan vaksin, dan melalui oral (dicampur dengan pakan). Ketiga cara ini memiliki keuntungan dan kerugian yang akan mempengaruhi level proteksi, efek samping, dan biaya yang harus dikeluarkan untuk kegiatan vaksinasi. Pemberian vaksinasi melalui injeksi telah banyak digunakan pada skala industri dan kegiatan riset vaksin di laboratorium terkait alur mekanisme pembentukan respons imunnya juga telah diketahui alur penyerapan antigen dan presentasi antigen setelah diserap secara oral maupun perendaman (Gudding *et al.* 1999).

Vaksin yang efektif harus memenuhi 3 syarat utama, yaitu 1) mampu menginduksi imunitas yang tepat, 2) stabil dalam penyimpanan, dan 3) bersifat imunogenik. Perbedaan sifat antigenik yang beragam antara kelompok organisme yang kompleks, maka diperlukan strategi penggunaan vaksinasi, baik dengan menggunakan monovalen dan vaksin polivalen. Menurut Baba *et al.* (1988) bahwa vaksinasi dengan larutan antigen ekstraselular lebih efektif dalam memberikan perlindungan melawan serotipe yang heterolog dibandingkan dengan vaksin yang hanya terdiri dari satu jenis sel utuh dari antigen.

### III METODOLOGI UMUM

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari Bulan Januari 2020 sampai dengan Bulan Juli 2021, bertempat di Instalasi Riset Pengendalian Penyakit Ikan, Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan Bogor; Laboratorium Kesehatan Ikan Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor; Laboratorium Terpadu PAU IPB; dan Laboratorium Uji Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Jakarta.

#### 3.2 Ikan Uji

Ikan patin (*P. hypophthalmus*) pembudidaya ikan patin di Sukamandi, Jawa Barat. Ikan diaklimatisasi selama 2 minggu dalam wadah terkontrol dan pemberian pakan pelet secara satiasi dengan frekuensi tiga kali sehari. Ikan yang digunakan diasumsikan *spesifik pathogen free* (SPF) bebas dari karakteristik penyakit ESC pasca masa aklimatisasi melalui pemeriksaan secara bakteriologis.

#### 3.3 Isolat Bakteri

*Master seed* bakteri yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak tujuh belas isolat. Isolat disimpan dalam gliserol pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  dan/atau dalam bentuk kering beku (*Freeze dried*). Sampel isolat bakteri yang digunakan tertera pada Tabel 1.

Tabel 1 Isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian

Kode Sampel	Kode isolat	Asal
1	PCjG	Cijengkol, Jawa Barat
2	B1	BKIPM Palembang
3	B2	BKIPM Palembang
4	PJIG	Jatiluhur, Jawa Barat
5	PSb5G	Sukabumi, Jawa Barat
6	PR1G	Riau, Kepulauan Riau
7	S.935G	BKIPM Lampung
8	PSb3G	Sukabumi, Jawa Barat
9	PTaH	Tulung Agung, Jawa Tengah
10	PSb1G	Sukabumi, Jawa Barat
11	PJbH	BPBAT Jambi
12	A2	BKIPM Palembang
13	PBm2G	BPBAT Mandiangin, Kalimantan Selatan
14	BSRH	Riau, Kepulauan Riau
15	PSmH	Sukamandi, Jawa Barat
16	P	BPBAT Sukabumi, Jawa Barat
17	PBm1G	BPBAT Mandiangin, Kalimantan Selatan

Isolat-isolat yang digunakan merupakan hasil penapisan pada penelitian yang dilakukan di Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan Bogor Jawa Barat sebanyak sembilan isolat, dua isolat berasal dari Balai Pengembangan Budidaya Air Tawar Mandiangin, satu dari Balai Pengembangan Budidaya Air Tawar Jambi, satu dari Balai Pengembangan Budidaya Air Tawar Sukabumi, satu dari Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Lampung, dan tiga dari Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Palembang. Isolat bakteri tersebut diinokulasi dalam media *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA).

### 3.4 Vaksin

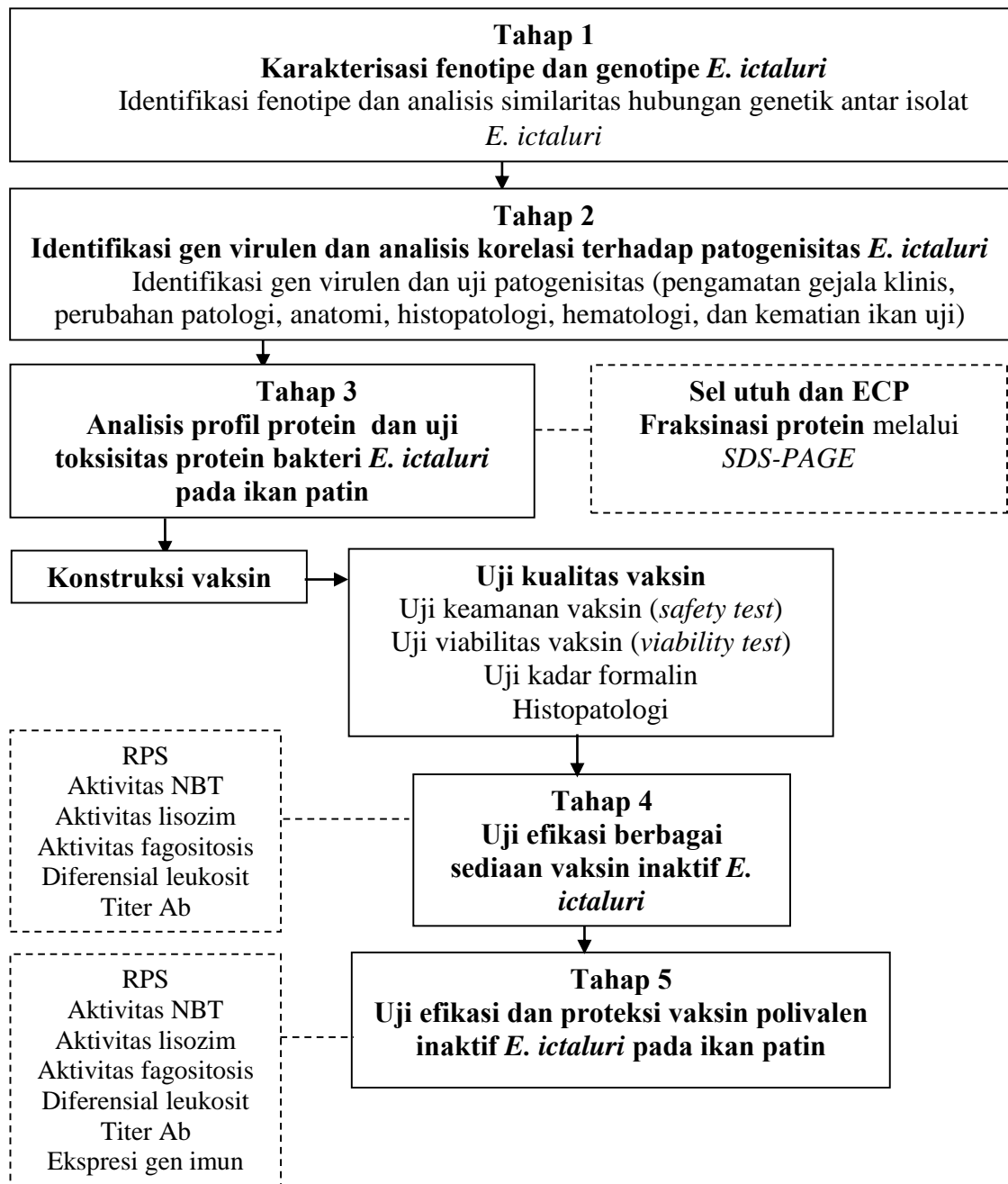
Ada 3 sediaan vaksin yang di uji pada penelitian ini, yaitu vaksin monovalen, bivalen, dan polivalen *E. ictaluri*.

### 3.5 Alur Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilakukan dalam lima tahapan penelitian (Gambar 3). Tahap pertama penelitian dilakukan untuk mengidentifikasi karakteristik bakteri *E. ictaluri* meliputi identifikasi, waktu kultur untuk memperoleh data pertumbuhan optimal bakteri yang akan digunakan untuk uji berikutnya, uji morfologi, biokimia, API 20E, dan aktivitas enzim, serta identifikasi isolat dengan konvensional PCR. Analisis similaritas hubungan genetik antar isolat *E. ictaluri* dilakukan dengan menggunakan analisis *genomic fingerprinting* dengan *rep*-PCR. Hasil dari penelitian tahap pertama berupa isolat *E. ictaluri* yang definitif setelah melalui beberapa pengujian dan dijadikan kandidat untuk penelitian tahap kedua

Tahap kedua dilakukan identifikasi gen virulen dari bakteri yang digunakan dalam penelitian secara PCR, bertujuan untuk mengidentifikasi gen virulen pada tiap isolat dan menghitung persentase adanya gen virulen pada tiap isolat. Munculnya serta jumlah gen virulen akan dikorelasikan dengan patogenisitas bakteri pada ikan patin dengan mengamati gejala klinis, perubahan patologi anatomi, hematologi, histopatologi, dan kematian ikan.

Hasil dari tahap dua dijadikan dasar penentuan komposisi formulasi vaksin pada penelitian tahap tiga. Penentuan komposisi vaksin polivalen *E. ictaluri* mengacu pada fenotipe, genotipe, similaritas strain, kombinasi gen virulen yang ada dan patogenisitas. Kajian sediaan vaksin dilakukan dengan analisis protein sel utuh dan uji kualitas vaksin dengan didukung pemeriksaan histopatologi jaringan organ untuk menguji efek imunopatologi dari sediaan vaksin yang diinjeksikan. Selanjutnya penelitian tahap empat yaitu uji efikasi berbagai sediaan vaksin inaktif sel utuh *E. ictaluri* pada ikan patin dengan parameter utama RPS, titer antibodi dengan *indirect ELISA*, aktivitas fagositosis, aktivitas lisozim, aktivitas *respiratory burst* dan diferensial leukosit, dan tahap lima yaitu uji efikasi dan proteksi vaksin inaktif sel utuh polivalen *E. ictaluri* secara *in vivo* pada ikan patin dengan parameter utama meliputi : RPS, titer antibodi dengan *indirect ELISA*, aktivitas fagositosis, aktivitas lisozim, aktivitas *respiratory burst*, diferensial leukosit, dan ekspresi gen imun.



Gambar 3 Tahapan penelitian vaksin polivalen *E. ictaluri* untuk pencegahan penyakit ESC pada ikan patin

## IV PERBANDINGAN FENOTIPE DAN GENOTIPE *Edwardsiella ictaluri* ISOLAT LOKAL INDONESIA PENYEBAB ENTERIC SEPTICEMIA OF CATFISH PADA IKAN PATIN (*Pangasianodon hypophthalmus*)

### ABSTRAK

*Edwardsiella ictaluri* penyebab penyakit *enteric septicemia of catfish* (ESC) merupakan kendala utama pada berbagai sentra budidaya patin di Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan karakter fenotipe dan genotipe *E. ictaluri* yang berasal dari berbagai sentra budidaya patin di Indonesia. Isolat bakteri yang digunakan berasal dari Jawa Barat, Jawa Timur, Sumatera Selatan, Jambi, Lampung, Riau, dan Kalimantan Selatan. Karakterisasi biokimia dan API 20E menunjukkan perbedaan pada kemampuan menghidrolisis gelatin, *sacharose*, dan *amylase*. Profil enzim menunjukkan aktivitas terhadap *alkaline phosphatase*, *acid phosphatase*, *esterase (C4)*, *leucine arylamidase*, *valine arylamidase*, *Naphthol AS BI Phosphohydrolase*, dan *N-acetyl β-glucosaminidase*. Secara umum, isolat-isolat bakteri menunjukkan sensitif terhadap *chloramphenicol*, *oxytetracycline*, *tetracycline*, *cephalotine*, *ciprofloxacin*, *norfloxacin*, *ampicillin*, *gentamycin*, *enrofloxacin*, dan *nalidixid acid*. Analisis filogenetik sekuens 16S rRNA dengan metode *Neighbor Joining Tree* menunjukkan kemiripan sebesar 99.56-100% dengan *E. ictaluri* 93-146 (CP.001600.2). Analisis similaritas strain dengan *Genetic Fingerprinting rep-PCR* menunjukkan profil genotipe yang berbeda, yaitu terklaster menjadi 3 genotipe dengan primer ERIC I dan II, 4 genotipe dengan primer ERIC II dan BOX serta 2 genotipe dengan primer GTG<sub>5</sub>. Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa isolat *E. ictaluri* dari berbagai lokasi budidaya di Indonesia memiliki perbedaan fenotipe dan genotipe yang dapat menjadi dasar pertimbangan penentuan isolat kandidat vaksin untuk pengendalian ESC di Indonesia.

Kata kunci: *Edwardsiella ictaluri*, *enteric septicemia of catfish*, fenotipe, genotipe, patin (*Pangasianodon hypophthalmus*)

### ABSTRACT

*Edwardsiella ictaluri* which causes enteric septicemia of catfish (ESC) is a major obstacle in various catfish farming centers in Indonesia. This study aims to compare the phenotype and genotype characters of *E. ictaluri* from various centers of catfish farming in Indonesia. The bacterial isolates were obtained from West Java, East Java, South Sumatra, Jambi, Lampung, Riau, and South Kalimantan. The biochemical characterization and API 20E showed differences in the ability to hydrolyze gelatin, sacharose, and amylase. The enzyme profile showed activity against alkaline phosphatase, acid phosphatase, esterase (C4), leucine arylamidase, valine arylamidase, Naphthol AS BI Phosphohydrolase, and N-acetyl β-glucosaminidase. In general, bacterial isolates showed sensitivity to chloramphenicol, oxytetracycline, tetracycline, cephalotine, ciprofloxacin, norfloxacin, ampicillin, gentamicin, enrofloxacin, and nalidixid acid. The phylogenetic analysis of 16S rRNA sequence using the Neighbor Joining Tree method showed a similarity of 99.56-100% with *E. ictaluri* 93-146 (CP.001600.2). The strain similarity analysis using Genetic Fingerprinting Rep-PCR showed

different genotype profiles, namely clustered into 3 genotypes with ERIC I and II primers, 4 genotypes with ERIC II and BOX primers and 2 genotypes with GTG5 primers. Based on the results obtained, it can be concluded that *E. ictaluri* isolates from various cultivation locations in Indonesia have phenotype and genotype differences which can be the basis for consideration of determining vaccine candidate isolates for ESC control in Indonesia.

**Key words** : *Edwardsiella ictaluri*, enteric septicemia of catfish, phenotype, genotype, catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)

## 4.1 Pendahuluan

Berbagai kajian terkait fenotipe dan genotipe bakteri *E. ictaluri* telah banyak dilakukan. Griffin *et al.* (2015) meneliti isolat *E. ictaluri* asal jenis ikan dan geografis yang berbeda menunjukkan secara fenotipe homolog, memiliki profil terhadap antimikroba yang sama namun berbeda secara genotipe dengan *rep*-PCR dan sekuensing gens *gyrB* dimana teridentifikasi menjadi tiga genotipe yang berbeda. Bartie *et al.* (2012) melakukan studi epidemiologi molekuler terhadap 90 isolat *E. ictaluri* dari patin (*P. hypophthalmus*) sakit yang dibudidayakan di Delta Mekong-Vietnam menunjukkan bahwa semua isolat tidak berbeda secara fenotipe namun berbeda secara genotipe dengan *rep*-PCR menggunakan primer GTG<sub>5</sub> menghasilkan dua kelompok yang dikategorikan sebagai (GTG)<sub>5</sub>-grup 1 dan 2 diantara isolat Vietnam serta 13 isolat *E. ictaluri* dari Amerika Serikat terbukti menyerupai (GTG)<sub>5</sub>-grup 1. Profil *E. ictaluri* JF0208 isolat Indonesia terkluster pada (GTG)<sub>5</sub>-grup 2. Hasil *repetitive* PCR *E. ictaluri* yang berasal dari *P. hypophthalmus* memiliki genotipe sama dengan isolat *E. ictaluri* dari *Channel catfish* dari Mississippi, AS (Phillips *et al.* 2016). Rogge *et al.* (2013) menyatakan bahwa perbandingan menggunakan *rep*-PCR menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antar isolat *E. ictaluri* Vietnam dan Amerika.

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan karakter fenotipe dan genotipe isolat bakteri *E. ictaluri* asal berbagai wilayah sentra budidaya patin di Indonesia. Karakterisasi berbagai isolat *E. ictaluri* tersebut sangat diperlukan untuk melihat keragaman genetik sebagai dasar untuk menentukan upaya pengendalian penyakit ESC yang hingga saat ini masih menjadi kendala pada budidaya patin di Indonesia.

## 4.2 Bahan dan Metode

### 4.2.1 Isolat Bakteri

Penelitian ini menggunakan sebanyak tujuh belas isolat, yaitu sembilan isolat merupakan koleksi Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan (BRPBATPP) Bogor Jawa Barat dan delapan isolat diperoleh dari berbagai wilayah di Indonesia (Tabel 1). Bakteri *E. ictaluri* dikultur dalam media *brain heart infusion agar* (BHIA; Oxoid Ltd, UK) dan diinkubasi selama 36-48 jam pada suhu 28°C.

#### 4.2.2 Identifikasi dan Kinetik Pertumbuhan

Identifikasi *E. ictaluri* dilakukan berdasarkan SNI 7545.1: 2009 melalui uji konvensional (uji biokimia) dan API kit 20E (Biomerieux, Marcy l'Etoile, Perancis). Uji konvensional antara lain meliputi: pewarnaan Gram, uji oksidasi, uji motilitas, uji oksidatif-fermentatif (O/F), uji indol, uji H<sub>2</sub>S, kultur pada *mac conkey agar* (MCA), uji sitokrom oksidase, uji oksidatif-fermentatif, uji tetes bergantung, uji malonate, L-arabinosa, D-mannitol, sukrosa, dan trehalosa. Pengujian aktivitas hemolitik dilakukan dengan menumbuhkan bakteri dalam media agar darah (*blood agar base*) yang dicampur dengan 5% v/v darah kambing, diinkubasi selama 48 jam pada suhu 28 °C.

Uji kinetik pertumbuhan dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada media *brain heart infusion broth* (BHIB; Oxoid Ltd, UK) pada suhu 28 °C diinkubasi selama 24, 36, 48, dan 72 jam. Pertumbuhan bakteri diamati dengan menghitung koloni yang tumbuh pada media dengan hasil pengenceran seri yang dikultur pada BHIA, inkubasi 36-48 jam pada suhu 28 °C dan dihitung kepadatannya menggunakan metode *total plate count* (TPC) mengacu pada SNI 01-2332.3-2006.

#### 4.2.3 Uji Sensitivitas Antibiotik

Uji sensitivitas bakteri *E. ictaluri* terhadap antibiotik mengacu pada metode Kirby-Bauer (Bauer *et al.* 1966). Bakteri *E. ictaluri* dikultur pada media BHIA dan diinkubasi 36-48 jam pada suhu 28 °C, dipanen dan diencerkan secara serial sesuai standar *McFarland* No. 0.5, kemudian dikultur pada media *mueller hinton agar* (MHA) (Oxoid Ltd, UK). Uji sensitivitas antibiotik menggunakan 18 jenis antibiotik yang merupakan produk Oxoid, Cambridge, Inggris yaitu *kanamycin* 30 µg, *chloramphenicol* 30 µg, *chloramphenicol* 50 µg, *rifampicin* 5 µg, *oxycytetracycline* 30 µg, *novobiocin* 5 µg, *tetracycline* 30 µg, *cephalotine* 30 µg, *ciprofloxacin* 5 µg, *norfloxacin* 10 µg, *streptomycin* 10 µg, *erythromycin* 15 µg, *ampicillin* 10 µg, *gentamycin* 10 µg, *enrofloxacin* 5 µg, *clindamycin* 10 µg, *nalidixid acid* 30 µg, dan *methicillin* 5 µg.

#### 4.2.4 Profil Aktivitas Enzim

Penentuan aktivitas enzim dari isolat *E. ictaluri* menggunakan API ZYM kit (API ZYM 25200, Biomerieux, Marcy l'Etoile, Perancis) mengikuti prosedur yang tertera pada produk. Aktivitas enzimatis dinilai dari angka 0 sampai 5 berdasarkan intensitas pembentukan warna dengan kategori perubahan warna lemah dengan angka 0-1 yang berarti negatif dan perubahan sedang hingga kuat dengan angka 2 hingga 5 yang berarti reaksi positif.

#### 4.2.5 Analisis Molekuler

Deteksi PCR spesifik *E. ictaluri* dilakukan menggunakan primer ESCF2 (5'-ACTTATCGCCCTCGCAAC 3') dan ESCR2 (5'-GCCTCTGATAAGTGGTT CTCG-3') dengan target amplifikasi 129 bp (Phillips *et al.* (2016), Siklus suhu amplifikasi yang digunakan untuk semua tahapan



identifikasi dengan PCR adalah suhu predenaturasi 95 °C selama 10 menit kemudian suhu denaturasi 95 °C selama 15 detik, suhu *annealing* 60 °C selama 1 menit dan elongasi pada 72 °C selama 5 menit. Siklus denaturasi, *annealing* dan elongasi diulang sebanyak 30 kali dan dilanjutkan dengan 1 siklus elongasi akhir pada 72 °C selama 10 menit.

Analisis sekuensing menggunakan pasangan primer 16 S-Flank dan 23 S-F mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh William dan Lawrence (2010). Sekuensing dilakukan menggunakan jasa perusahaan sekuensing 1<sup>st</sup> Base Singapura. *Alignment multiple analysis* kelompok dilakukan mengacu pada data *genbank* dengan program BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) pada level nukleotida. Pohon hubungan kekerabatan filogenik strain isolat bakteri dibuat dengan menggunakan program *MEGA (Moleccular Evolusionare Genetic Analysis software) version 7.1*.

#### 4.2.6 Analisis Genetic Fingerprinting Repetitive PCR

Analisis *Genetic Fingerprinting Repetitive PCR (rep-PCR)* mengacu pada Griffin *et al.* (2015). Isolat *E. ictaluri* dikultur dalam media BHIB dan diinkubasi selama 36 jam pada suhu 28 °C. Biakan disentrifugasi 5.000 rpm selama 30-60 detik, pellet ditambahkan 2 mL PIV *buffer* (1M NaCl, 10 mM Tris HCl pH 7.6), disentrifugasi, disimpan pada suhu 4 °C sebelum digunakan untuk persiapan genom utuh. Analisis sebanyak 25 mL reaksi terdiri dari 13 ml IQ Supermix (BioRad, Hercules, CA, USA), 20 pmol primer (ERIC I dan II) atau 40 pmol primer (BOX, ERIC II, GTG5), 100 ng *template* DNA, dan H<sub>2</sub>O bebas nuklease. Amplifikasi dilakukan pada PTC 200 *gradient cycler* (MJ Research, Waltham, MA) dengan profil suhu berikut: 1 siklus pada 95 °C selama 10 menit; 5 siklus 95 °C selama 1 menit, 40 °C untuk 1 menit, dan 72 °C selama 5 menit; 35 siklus dari 95 °C selama 1 menit, 55 °C selama 1 menit, dan 72 °C selama 5 menit. *Aliquot* dari setiap reaksi amplifikasi (masing-masing 10 mL) dielektroforesis melalui gel agarosa 1.5% (b/v) yang mengandung etidium bromida (1 mg mL<sup>-1</sup>) dan divisualisasikan menggunakan sinar ultraviolet. Ukuran pita ditetapkan dengan perbandingan langsung dengan standar DNA yang dijalankan secara bersamaan (Hyperladder II, Bioline USA inc., Taunton, MA, USA).

Tabel 2 Primer yang digunakan untuk *rep-PCR*

Primer	Sekuen (5'-3')	Referensi
BOX	CTACGGCAAGGCGACGCTGAC G	Griffin <i>et al.</i> (2015)
ERIC I	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	
ERIC II	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	
GTG <sub>5</sub>	GTGGTGGTGGTGGTG	

#### 4.2.7 Analisis Data

Data hasil uji biokimia, uji API 20E, uji kinetik pertumbuhan, uji sensitivitas antibiotik, uji aktivitas enzim, dan deteksi DNA *E. ictaluri* dianalisis secara deskriptif, sedangkan hasil *rep-PCR E. ictaluri* dibuat UPGMA dendrogram dan filogenetik dikonstruksi dengan *cluster analysis*.

### 4.3 Hasil dan Pembahasan

Secara umum, isolat pada penelitian ini merupakan bakteri Gram-negatif berbentuk batang pleomorfik dengan karakteristik biokimia dan API 20E pada semua isolat menunjukkan oksidatif, fermentatif, motil,  $\beta$ -hemolitik, tidak memproduksi H<sub>2</sub>S, menghasilkan gas dari glukosa, tumbuh pada media *mac conkey agar*, *rimler shott agar*, *Edwardsiella ictaluri Agar*, tidak menghasilkan  $\beta$ -galaktosidase dan *arginine dihydrolase*, positif *ornithine decarboxylase*, citrat negatif, *urease* negatif, negatif indol, *voges-proskauer* negatif, memfermentasi glukosa namun tidak terhadap mannose, inositol, sorbitol, rhamnase, dan mellibiose (Tabel 3).

Tabel 3 Karakteristik biokimia isolat bakteri *E. ictaluri* dari ikan patin di Indonesia

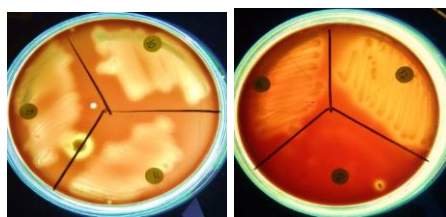
Karakteristik	Kode sampel																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	<i>E.tarda</i> *
Morfologi sel	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oksidatif/Fermentatif	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Pertumbuhan pada Sulphide Indole-Motility (SIM)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Produksi H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Produksi gas dari glukosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Mac conkey agar</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rimler-shott agar</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Edwardsiella ictaluri agar</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\beta$ -galaktosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Simmon's Citrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Produksi indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatin	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Produksi asam dari :																		
Glukosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saccarose	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Innositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amylase	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Mellibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemolisis (5% sheep blood agar)	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	NT

Keterangan: B= batang, (-); Reaksi negatif; (+): Reaksi positif,  $\beta$ : beta-hemolitik ; NT: Tidak diuji. \*) Dubey et al. (2019)  
 Kode isolat : 1. PCjG; 2. B1; 3. B2; 4. PJIG; 5. PSb5G; 6. PR1G; 7. S 935G; 8. PSb3G; 9. PTaH; 10. PSb1G; 11. PjBH; 12. A2; 13. PBm2G; 14. BSRH; 15. PSmH; 16. P; 17. PBm1G

Berdasarkan perbedaan kemampuan menghidrolisis gelatin, *saccarose* dan *amylase*, isolat-isolat tersebut dapat dibagi menjadi 6 kelompok yaitu 1) isolat PCjG dan PSb1G mampu menghidrolisis gelatin dan *saccarose*; 2) isolat B1 dan PBm2G mampu menghidrolisis gelatin, *saccarose* dan *amylase*; 3) isolat PSb5G mampu menghidrolisis gelatin; 4) isolat PR1G mampu menghidrolisa *saccarose*; 5) isolat BSRH mampu menghidrolisis gelatin dan *amylase*; 6) isolat B2, PJIG, S.935G, PSb3G, PTaH, PjBH, A2, PSmH, P dan PBm1G tidak mampu menghidrolisis ketiganya. Seluruh sampel terkonfirmasi sebagai *E. ictaluri* seperti halnya yang

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 mengumumkkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

ditemukan pada penelitian yang dilakukan oleh Waltman *et al.* (1986); Liu *et al.* (2010); Hawke *et al.* (2013); Mawardi *et al.* (2018) dan Purwaningsih *et al.* (2019). Rogge *et al.* (2013) menyatakan identifikasi *E. ictaluri* yang berasal dari *striped catfish* Vietnam menunjukkan kesamaan dengan isolat dari *channel catfish* Amerika yaitu hasil negatif untuk sitrat dan motil. Uji aktivitas hemolisis menunjukkan semua isolat termasuk dalam  $\beta$ -hemolitik yang ditandai dengan adanya zona lisis pada media agar darah. Zona hemolisis ini dapat menjadi indikator virulen atau tidaknya suatu bakteri, semakin terang zona hemolisisnya maka semakin virulen. Pada isolat dengan kode isolat PSb1G, PJbH, A2, P, dan PBm1G memiliki zona hemolisis yang terlihat lebih terang dari isolat lainnya (Gambar 4).



Gambar 4 Uji aktivitas hemolisis pada media agar darah kode isolat PSb1G, PJbH, A2, P, dan PBm1G

Enzim adalah biokatalis yang berperan penting dalam semua tahapan metabolisme dan reaksi biokimia (Nigam 2013). Seluruh isolat memiliki aktivitas enzim yaitu *alkaline phosphatase*, *acid phosphatase*, *esterase (C4)*, *leucine arylamidase*, *valine arylamidase*, *Naphthol AS BI Phosphohydrolase*, dan *N-acetyl  $\beta$ -glucosaminidase* (Tabel 4). Selain itu, penelitian Liu *et al.* (2010) juga menunjukkan reaksi positif terhadap *esterase lipase (C8)* dan  *$\alpha$ -Chymotrypsin*.

Tabel 4 Karakteristik profil aktivitas enzim bakteri *E. ictaluri* dari ikan patin

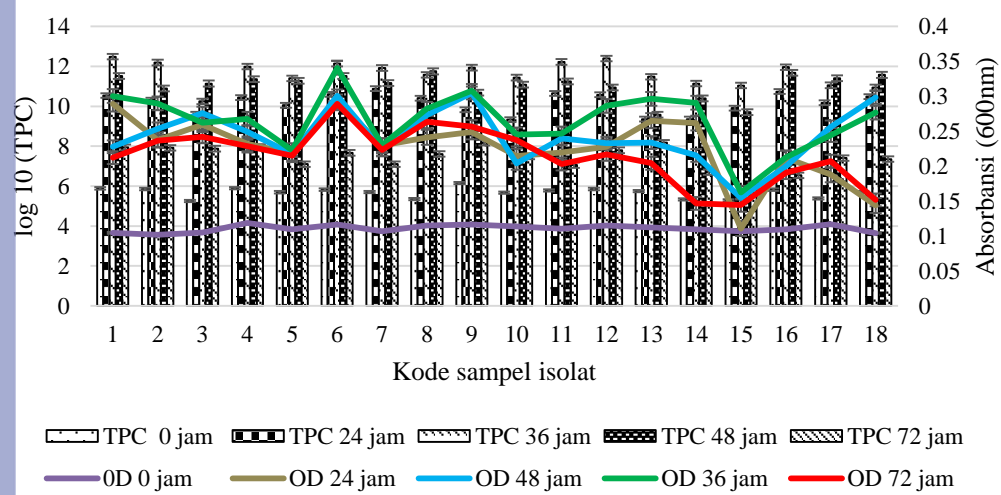
Karakteristik	Kode sampel																	Liu <i>et al.</i> 2010	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
<i>Alkaline phosphatase</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Esterase (C4)</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Esterase lipase (C8)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Lipase (C14)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leucine arylamidase</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Valine arylamidase</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cystine arylamidase</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trypsin</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i><math>\alpha</math>-Chymotrypsin</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Acid phosphatase</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Naphthol AS BI Phosphohydrolase</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i><math>\alpha</math>-galactosidase</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i><math>\beta</math>-galactosidase</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i><math>\beta</math>-glucuronidase</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i><math>\alpha</math>-glucosidase</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i><math>\beta</math>-glucosidase</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>N-acetyl <math>\beta</math>-glucosaminidase</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i><math>\alpha</math>-mannosidase</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i><math>\alpha</math>-fucosidase</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan: (-): Reaksi negatif; (+): Reaksi positif. Kode isolat : 1. PCjG; 2. B1; 3. B2; 4. PJIG; 5. PSb5G; 6. PR1G; 7. S935G; 8. PSb3G; 9. PTaH; 10. PSb1G; 11. PJbH; 12. A2; 13. PBm2G; 14. BSRH; 15. PSmH; 16. P; 17. PBm1G

Enzim *alkaline* dan *acid phosphatase* menunjukkan level aktivitas sebagian besar sampel pada nilai 5, enzim ini dihasilkan ketika mikroba aktif pada kondisi asam dan basa sehingga mampu untuk menghidrolisis semua ester fosfat (Mudryk dan Podgorska 2006). Fungsi enzim *alkaline phosphatase* yaitu memineralisasi fosfor (P) atau P-organik menjadi P-anorganik yang kemudian dapat diserap dan dimetabolisme oleh mikrob (Bums 1982). *Esterase* merupakan enzim lipolitik yang termasuk kelompok enzim serbaguna dengan urutan asam amino yang beragam dan memiliki struktur tiga dimensi (Kovacic *et al.* 2019). *Leucine* dan *valine arylamidase* merupakan enzim protease yang menghidrolisis ikatan peptida. Menurut Potempa *et al.* 1988 bahwa enzim protease yang disekresikan oleh beberapa strain bakteri dapat mendegradasi beberapa protein penting termasuk imunoglobulin dari inang dan juga secara tidak langsung memproses banyak faktor virulensi toksik lainnya. Pada isolat bakteri kode sampel PJBH, P, dan PBm1G aktivitas *Leucine* dan *valine arylamidase* teridentifikasi lebih kuat pada nilai 5 dibanding isolat lainnya pada nilai kisaran 2-3.

Jatt *et al.* (2018) menyatakan bahwa peran enzim dalam patogenesis infeksi menunjukkan hubungan erat antara karakter virulensi dengan kemampuannya untuk menghasilkan enzim. Aktivitas enzimatik oleh populasi mikrob merupakan proses penting dalam dekomposisi bahan organik, daur ulang nutrisi, aliran karbon, dan energi. Pengaturan aktivitas enzimatik bakteri didasarkan pada tingkat ekosistem, faktor lingkungan, dan tingkat lingkungan mikro melalui interaksi enzim-substrat. Produksi enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti fase pertumbuhan, lingkungan (suhu atau pH), dan faktor nutrisi (Madigan *et al.* 2016).

Berdasarkan analisis sidik ragam dengan tingkat kepercayaan 95% ( $P < 0.05$ ) nilai TPC tertinggi pada isolat PCjG, B1, PJBH, dan A2 pada 36 jam dibandingkan kode isolat lainnya. Hasil TPC sebagian besar fase log berada pada 36 jam, kecuali untuk isolat PSb3G dan PBm1G berada pada 48 jam (Gambar 5).



Gambar 5 Total plate count dan nilai absorbansi pertumbuhan bakteri kode sampel isolat 1-17 selama 0-72 jam. Kode isolat : 1. PCjG; 2. B1; 3. B2; 4. PJIG; 5. PSb5G; 6. PR1G; 7. S 935G; 8. PSb3G; 9. PTaH; 10. PSb1G; 11. PJBH; 12. A2; 13. PBm2G; 14. BSRH; 15. PSmH; 16. P; 17. PBm1G

Pertumbuhan bakteri dibagi menjadi empat fase, yaitu fase lag, fase logaritma (eksponensial), fase stasioner, dan fase kematian. Adaptasi bakteri pada lingkungan baru terjadi pada fase lag. Adaptasi bakteri bervariasi dipengaruhi media, pH, suhu, dan jumlah sel inokulan (Madigan *et al.* 2016). Fase lag dimulai 0-24 jam. Fase logaritma 24-36 jam. Fase stasioner pada 36-48 jam selanjutnya mengalami penurunan setelah 48 jam menuju 72 jam. Fase log menunjukkan pertumbuhan sebesar  $10^{11}$ - $10^{12}$  CFU mL<sup>-1</sup> dengan nilai *optical density* (OD) 0.2-0.3 pada panjang gelombang 600 nm. Hasil penelitian secara umum menunjukkan nilai TPC yang diperoleh berbanding lurus dengan nilai OD pada setiap isolat, hal ini menunjukkan bahwa pertumbuhan bakteri memengaruhi tingkat kekeruhan media kultur.

Rata-rata hasil uji sensitivitas sampel bakteri *E. ictaluri* terhadap antibiotik menunjukkan resistan terhadap *rifampicin*, *novobiocin*, *erythromycin*, dan *methicillin*; *intermediate* terhadap *streptomycin* serta sensitif terhadap *chloramphenicol*, *oksitetrasikline*, *tetracycline*, *chephalotine*, *ciprofloxacin*, *norfloxacin*, *amphicillin*, *gentamycin*, *enrofloxacin*, dan *nalidixid acid* (Tabel 5).

Tabel 5 Uji sensitivitas bakteri *E. ictaluri* asal ikan patin terhadap antibiotik

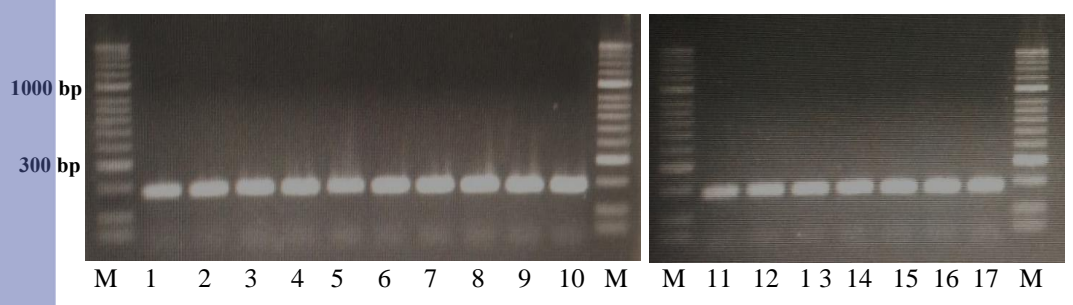
No	Antibiotik	Kandungan ( $\mu$ g)	Resistant (%)	Intermediate (%)	Susceptible (%)
1	<i>kanamycin</i>	30		17.65	82.35
2	<i>chloramphenicol</i>	30			100
3	<i>rifampicin</i>	5	100		
4	<i>oksitetrasikline</i>	30			100
5	<i>novobiocin</i>	5	100		
6	<i>tetracycline</i>	30			100
7	<i>chephalotine</i>	30			100
8	<i>ciprofloxacin</i>	5			100
9	<i>norfloxacin</i>	10			100
10	<i>streptomycin</i>	10		100	
11	<i>eritromycin</i>	15	100		
12	<i>amphicillin</i>	10			100
13	<i>gentamycin</i>	10			100
14	<i>enrofloxacin</i>	5			100
15	<i>clindamycin</i>	10	11.76	52.94	35.30
16	<i>nalidixid acid</i>	30			100
17	<i>methicillin</i>	5	100		
18	<i>chloramphenicol</i>	50			100

Hasil yang tak berbeda juga ditemukan oleh Dung *et al.* (2008) bahwa tak satu pun dari 64 isolat *E. ictaluri* asal *P. hypophthalmus* Vietnam menunjukkan resistansi terhadap amoksisilin, asam amoksisilin-klavulanat, kloramfenikol, florfenikol, gentamisin, kanamisin, neomisin, dan nitrofurantoin. Nho *et al.* (2019) menyatakan bahwa antibiotik jenis *florfenicol* dan *sulfadimethoxine* atau ormetoprim efektif dalam menanggulangi penyakit ESC di Amerika Serikat. Resistansi terhadap *rifampicin*, *novobiocin*, *erythromycin*, dan *methicillin* terjadi karena golongan antibiotik tersebut bersifat *narrow spectrum* tidak mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. ictaluri* secara optimal. Hasil penelitian

menunjukkan bahwa sebagian besar penggunaan antibiotik masih efektif dalam pengendalian penyakit ESC sehingga perlu kontrol pengawasan yang ketat pada budidaya patin di Indonesia.

Penggunaan antibiotik dalam budidaya di Indonesia oleh pemerintah telah diatur dalam PERMEN-KP no. 1 tahun 2019, bahwa antibiotik jenis *tetracycline*, *oxytetracycline*, *erythromycin*, *enrofloxacin*, dan *sulfadiazine* dapat digunakan dalam pengobatan penyakit ikan. Antibiotik yang direkomendasikan dan diizinkan pemerintah masih efektif untuk digunakan dalam penanggulangan ESC di Indonesia, namun secara bijak perlu dipertimbangkan efek negatif yang mungkin terjadi yaitu masalah akumulasi residu antibiotik dalam jaringan ikan yang dapat berpengaruh terhadap pertumbuhan dan kaitannya dengan keamanan pangan, resistansi bakteri terhadap antibiotik serta risiko pencemaran lingkungan.

Identifikasi dengan primer spesifik pada semua isolat terdeteksi pita berukuran antara 100-200 bp (Gambar 6) yang merupakan fragmen protein *putative transposon* yang dimiliki oleh *E. ictaluri* virulen. Fragmen dengan ukuran yang sama juga diidentifikasi dari dua sampel *E. ictaluri* yang berasal dari *Pangasius* sp. (Phillips *et al.* 2016).



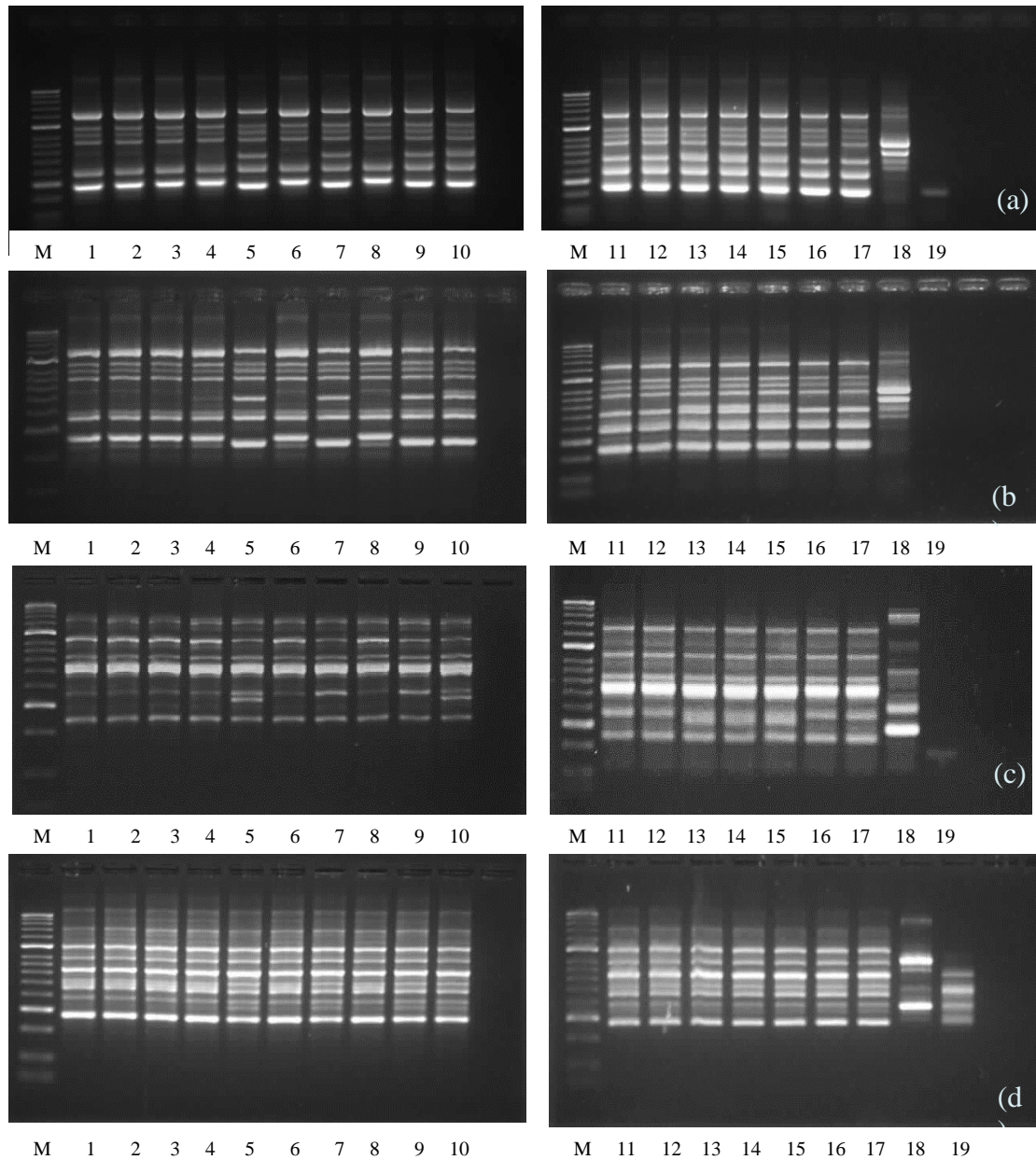
Gambar 6 Hasil amplifikasi *Polymerase Chain Reaction* sampel isolat dengan primer spesifik *E. ictaluri*. M: Marker, 1-17: sampel isolat bakteri asal patin.

*Repetitive PCR* adalah metode cepat dan sederhana untuk membedakan hubungan antar spesies bakteri yang dekat kekerabatannya, bahkan pada strain dari spesies yang sama. *Repetitive PCR* dengan empat jenis primer pada penelitian ini menunjukkan perbedaan pola pita antar isolat dari berbagai sentra budidaya patin di Indonesia dan pola pita untuk masing-masing primer bervariasi kompleksitasnya (Gambar 7). Griffin *et al.* (2011) menyatakan bahwa sebagian besar *E. ictaluri* dari *Ictalurus punctatus* di Mississippi USA adalah sama begitupun dengan Rogge *et al.* (2011) melaporkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara isolat *E. ictaluri* dari *Pangasianodon* di Vietnam.

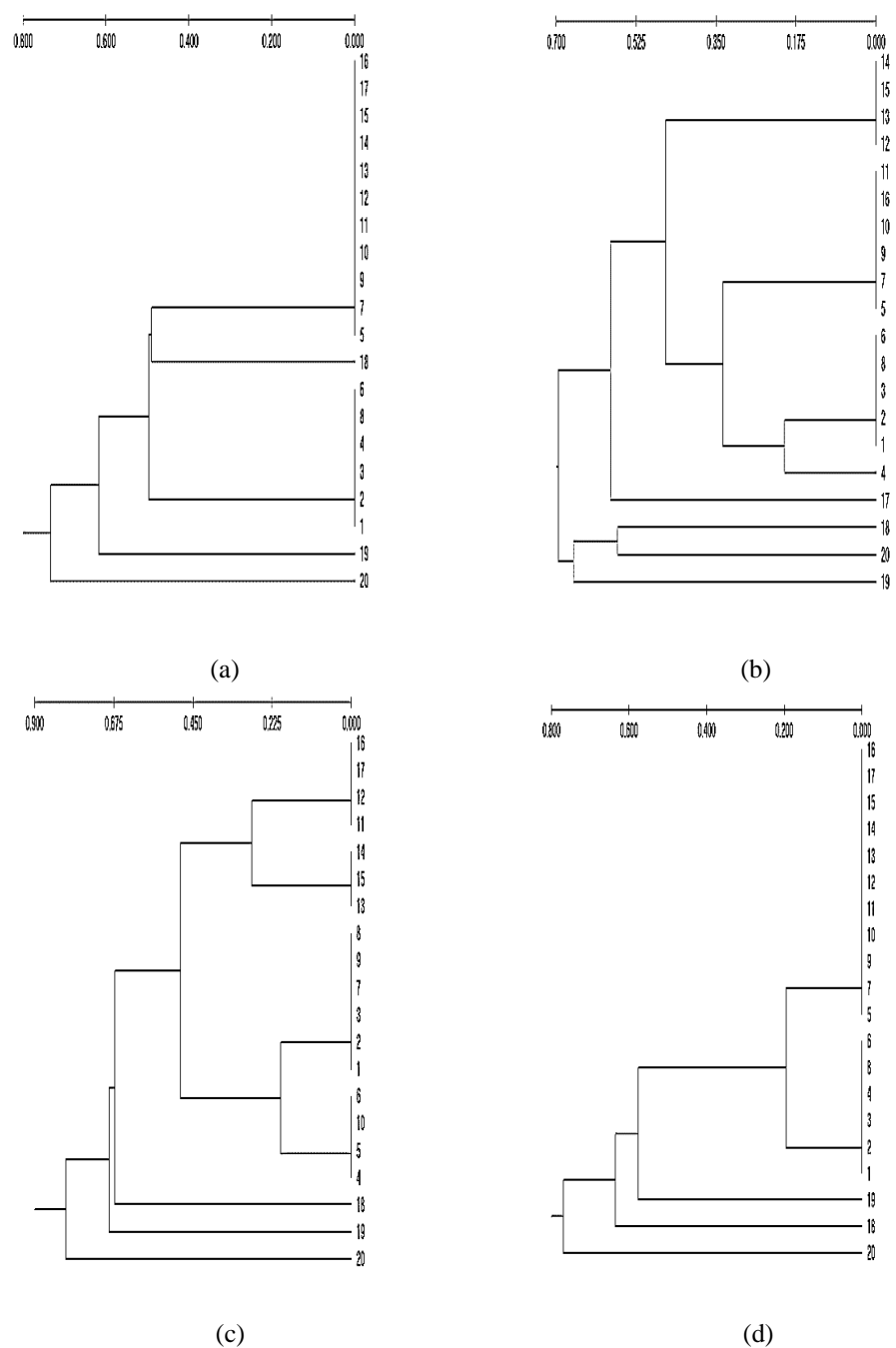
*Repetitive PCR* isolat *E.ictaluri* asal Indonesia dalam penelitian ini menunjukkan pengelompokan yang berbeda dari masing-masing primer yang digunakan (Gambar 8). Analisis UPGMA dendrogram berdasarkan primer ERIC I dan II terkluster menjadi tiga genotipe, dua genotipe dengan primer GTG<sub>5</sub>, dan empat genotipe dengan primer ERIC II dan BOX. Pola spesifik *rep*-PCR asal wilayah tidak ditemukan, namun pola yang sama terdeteksi dari isolat asal wilayah yang berbeda. Kenyataan ini menunjukkan bahwa letak geografis tidak memengaruhi karakter spesifik isolat *E. ictaluri*. Isolat *E. ictaluri* asal berbagai wilayah Indonesia berbeda dengan *E. ictaluri* S97-773 asal *Ictalurus punctatus*

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.

USA. Griffin *et al.* (2015) menyatakan bahwa isolat *E. ictaluri* yang diteliti mewakili tiga genotipe unik dan tidak diketahui apakah perbedaan yang terjadi berhubungan dengan spesies inang, praktik budidaya ikan, geografi atau faktor lain yang belum dikenali.



**Gambar 7** Hasil amplifikasi *repetitive* PCR dari 17 isolat *E. ictaluri*. Profil genetik dibentuk menggunakan primer ERIC I dan II (a), ERIC II (b), BOX (c) dan GTG<sub>5</sub> (d). 1-17: *E. ictaluri* asal patin Indonesia, 18: *E. ictaluri* asal lele, 19: *A. hydrophila* AHL0905-2. Kode isolat *E. ictaluri* asal patin : 1. PCjG; 2. B1; 3. B2; 4. PJIG; 5. PSb5G; 6. PR1G; 7. S 935G; 8. PSb3G; 9. PTaH; 10. PSb1G; 11. PJbH; 12. A2; 13. PBm2G; 14. BSRH; 15. PSmH; 16. P; 17. PBm1G



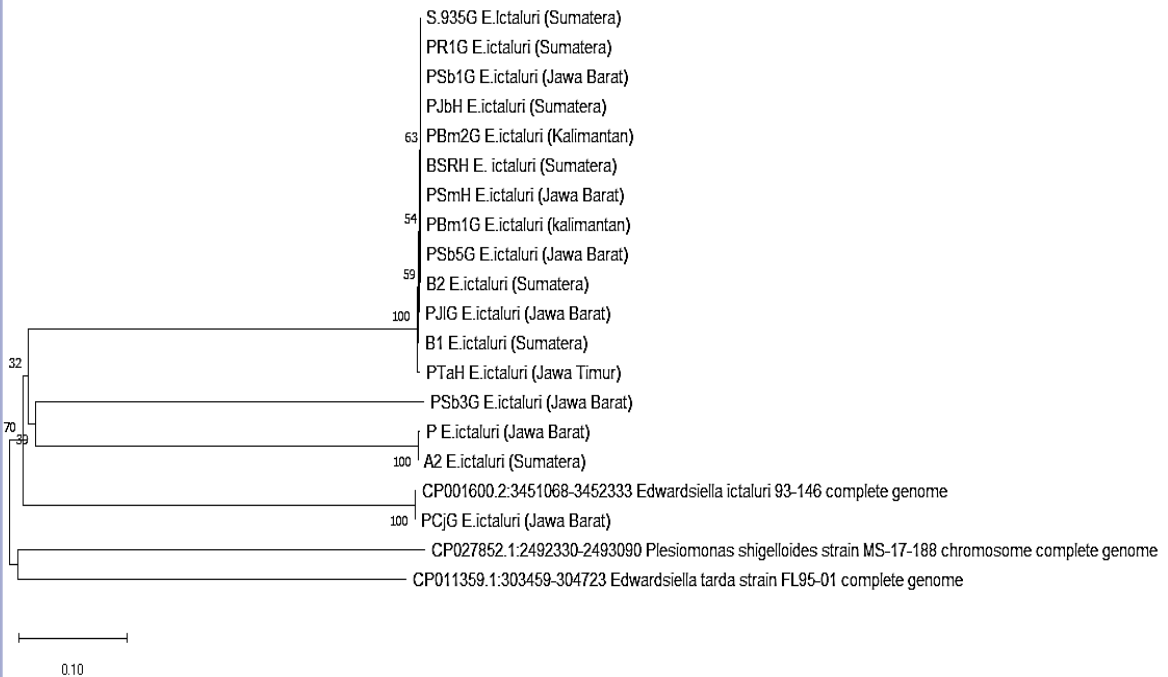
Gambar 8 Analisis *Cluster* UPGMA Dendrogram dari *rep*-PCR menggunakan primer (a) ERIC I & II, (b) ERIC II, (c) BOX dan (d) GTG<sub>5</sub>. 1-17: *E.ictaluri* asal patin Indonesia, 18: *E.ictaluri* asal lele, 19: *E. ictaluri* S97-773 (Griffin *et al.* 2015), 20: *E. tarda* ATCC #15947 (Griffin *et al.* 2015). Kode isolat : 1. PCjG; 2. B1; 3. B2; 4. PJIG; 5. PSb5G; 6. PR1G; 7. S 935G; 8. PSb3G; 9. PTaH; 10. PSb1G; 11. PJbH; 12. A2; 13. PBm2G; 14. BSRH; 15. PSmH; 16. P; 17. PBm1G

Sekuensing menggunakan primer 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat-isolat pada penelitian ini termasuk dalam kelompok *E. ictaluri* yang merupakan

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.



anggota kelompok filogenik dari genus *Edwardsiella* (Gambar 9). Tingkat kedekatan dihitung dengan menggunakan metode *neighbour-joining*. *Edwardsiella ictaluri* asal patin dari berbagai lokasi budidaya di Indonesia memiliki kemiripan 99.56-100% dengan strain *E. ictaluri* 93-146 complete genome (Genbank accession number CP.001600.2). *Edwardsiella ictaluri* 93-146 adalah penyebab ESC yang diisolasi dari wabah pada *catfish* di area budidaya komersial di Louisiana Amerika Serikat pada tahun 1993 (Takedar *et al.* 2020). Pohon filogenetik menunjukkan isolat *E. ictaluri* terbagi menjadi dua klad, yaitu klad pertama terdiri dari 16 isolat dan klad kedua terdiri dari 1 isolat.



Gambar 9 Pohon filogenetik bakteri *E. ictaluri* gen sekuen 16S rRNA dengan *Neighbor Joining Tree*

*Edwardsiella ictaluri* yang ditemukan di Indonesia memiliki perbedaan fenotipe dan genotipe yang diduga dipengaruhi oleh kondisi geografis asal wilayah isolat. Di Indonesia sebaran lahan gambut tropis terluas terdapat di tiga pulau besar (Sumatera, Kalimantan, dan Papua) mencapai luas sekitar 14.9 juta hektar, tidak termasuk lahan gambut di pulau lainnya (Ritung *et al.* 2011). Karakteristik spesifik dari tanah gambut yang membedakan dengan tanah mineral umumnya, antara lain: (1) mudah mengalami kering tak balik (*irreversible drying*), (2) mudah turun (*subsidence*), (3) rendahnya berat isi dan daya dukung (*bearing capacity*) lahan terhadap tekanan, (4) tingginya kemampuan menyimpan air, (5) tingginya kandungan bahan organik dan karbon, (6) rendahnya kandungan hara dan kesuburannya, dan (7) rendahnya pH (Noor *et al.* 2014). Derajat keasaman (pH) dan bahan organik memengaruhi virulensi bakteri *E. ictaluri* dalam patogenisitas infeksi (Rogge *et al.* 2007). Analisa *rep*-PCR menunjukkan perbedaan antara isolat *E. ictaluri* Vietnam dan USA dalam hal infektivitas dan spesifisitas patogen inang (Rogge *et al.* 2013).

*Enteric septicemia of catfish* masih menjadi kendala pada budidaya patin di Indonesia sampai saat ini. Pengembangan riset vaksin diharapkan menjadi langkah strategis dalam upaya pengendalian penyakit tersebut. Karakterisasi merupakan studi penting yaitu menggabungkan hasil fenotipe dengan genotipe untuk mengklasifikasi secara valid *E. ictaluri* asal dari berbagai lokasi di Indonesia guna memperoleh isolat kandidat vaksin yang potensial.

#### 4.4 Kesimpulan

*Edwardsiella ictaluri* yang berasal dari Jawa, Sumatera, dan Kalimantan berbeda secara fenotipe dan genotipe sehingga dapat menjadi dasar pertimbangan penentuan isolat kandidat vaksin dalam rangka upaya pengendalian penyakit ESC di Indonesia.

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.

## V IDENTIFIKASI GEN VIRULEN DAN PATOGENISITAS *Edwardsiella ictaluri* DARI SENTRA BUDIDAYA IKAN PATIN (*Pangasianodon hypophthalmus*) DI INDONESIA

### ABSTRAK

*Enteric septicemia of catfish* (ESC) disebabkan oleh bakteri Gram-negatif *Edwardsiella ictaluri* merupakan kendala serius yang menyebabkan estimasi kerugian ekonomi sekitar 2 milyar rupiah per tahun pada budidaya patin di Indonesia. Patogenesis penyakit ESC tidak terlepas dari peran gen virulen sebagai salah satu faktor virulensi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi gen virulen *E. ictaluri* asal berbagai lokasi di Indonesia dan peranannya dalam patogenesis penyakit ESC pada ikan patin. Deteksi gen virulen bakteri *E. ictaluri* dilakukan pada gen *esrC*, *evpC*, *virD4*, *urease enzyme*, *eseI*, dan *escD*. Uji patogenesis dilakukan secara rancangan acak lengkap dengan menginjeksi bakteri *E. ictaluri* sebanyak 0.1 mL ikan<sup>-1</sup> intraperitoneal. Sampling dilakukan pada hari ke-1, 2, 4, 7, 14, dan 21 dengan parameter kematian ikan uji, parameter darah meliputi hematokrit, hemoglobin, jumlah sel darah merah, jumlah sel darah putih, diferensial leukosit, glukosa, dan histopatologi. Hasil menunjukkan bahwa kematian ikan patin akibat infeksi *E. ictaluri* tertinggi sebesar 96.67-100% terjadi pada ikan yang diinfeksi dengan *E. ictaluri* kode isolat PSb1G, PJBH, A2, P, dan PBm1G dengan rerata waktu kematian 3.73-4.58 hari pascainfeksi. Identifikasi gen virulen menunjukkan hasil yang variatif yaitu sebanyak tiga isolat memiliki 6 gen virulen; empat isolat memiliki 5 gen virulen; dua isolat memiliki 3 dan 4 gen serta enam isolat memiliki 2 gen virulen. Infeksi *E. ictaluri* secara umum dan signifikan menyebabkan perubahan pada semua parameter darah. Perubahan histopatologi berbagai organ yaitu hati, ginjal, usus, limpa, dan insang menunjukkan pola infeksi dan patogenesis penyakit ESC. Mortalitas pada ikan patin akibat infeksi *E. ictaluri* tidak dipengaruhi oleh jumlah gen virulen yang dimiliki. *Edwardsiella ictaluri* dengan 4-5 gen virulen menunjukkan tingkat virulensi yang lebih tinggi dibanding yang memiliki semua gen virulen.

Kata kunci: *Edwardsiella ictaluri*, *enteric septicemia of catfish* (ESC), gen virulen, patogenesis

### ABSTRACT

Enteric septicemia of catfish (ESC) caused by Gram-negative bacteria *Edwardsiella ictaluri* is a severe obstacle that causes the Indonesian catfish farming economy to lose approximately two billion rupiahs per year. The pathogenesis of the ESC disease is not separated from the roles of virulence genes as one of the virulence factors. This study aimed to identify the virulence gene of *E. ictaluri* from various locations in Indonesia and investigate its role in the pathogenicity of the ESC disease in catfish. The virulence genes of bacteria *E. ictaluri* were detected on genes *esrC*, *evpC*, *virD4*, *urease enzyme*, *EseI*, and *escD*. The pathogenicity was tested using the completely randomized design by injecting the bacteria *E. ictaluri* 0.1 mL fish<sup>-1</sup> intraperitoneal. The sampling was conducted on days 1, 2, 4, 7, 14, and 21 with the parameters of death of the testing fish, blood parameters, including

hematocrit, hemoglobin, the number of red blood cells, the number of white blood cells, differential leukocytes, glucose levels, and histopathology. The results showed that the highest death of catfish due to *E. ictaluri* infection was 96.67-100% and occurred in catfish infected by *E. ictaluri* isolates PSb1G, PjBH, A2, P, and Pbm1G with average time of death of 3.73-4.58 day post infection. The identification of virulence genes showed varied results: three isolates had 6 virulence genes; four isolates had 5 virulence genes; two isolates had 3 and 4 virulence genes and six isolates had 2 virulence genes. The *E. ictaluri* infection commonly and significantly caused changes in all blood parameters. Histopathological changes in various organs, such as the liver, kidney, intestine, spleen, and gills, showed infection patterns and pathogenesis of ESC diseases. The mortality in catfish due to infection with *E. ictaluri* was not influenced by the number of virulent genes possessed. The *E. ictaluri* with 4-5 virulence genes showed higher virulence levels than *E. ictaluri* with all genes.

**Key words:** *Edwardsiella ictaluri*, enteric septicemia of catfish (ESC), pathogenicity, virulent genes

## 5.1 Pendahuluan

Kasus *enteric septicemia of catfish* (ESC) di Indonesia yang disebabkan oleh *E. ictaluri* menjadi kendala serius pada budidaya patin. Penelitian tahap satu memperoleh hasil bahwa *E. ictaluri* dari berbagai lokasi di Indonesia memiliki perbedaan fenotipe yaitu pada pola pertumbuhan, kemampuan menghidrolisis gula-gula (*saccharose* dan *amylase*), melisis media agar darah, menghidrolisis gelatin dan aktivitas enzim terhadap *Leucine* dan *valine arylamidase*. Analisis similaritas strain dengan *genetic fingerprinting rep-PCR* menunjukkan profil genotipe yang berbeda dari masing-masing primer ERIC 1, ERIC II, BOX, dan GTG<sub>5</sub>. Berdasarkan hasil tersebut bahwa isolat *E. ictaluri* asal berbagai lokasi budidaya di Indonesia memiliki perbedaan variasi fenotipe dan genotipe yang kemungkinan berkaitan dengan faktor virulensi bakteri *E. ictaluri* yang dipengaruhi oleh kondisi geografis lokasi budidaya.

Menurut Madigan *et al.* (2016) faktor virulensi dapat secara langsung maupun tidak langsung meningkatkan kemampuan invasi bakteri dengan cara memacu infeksi patogen. Salah satu faktor virulensi pada *E. ictaluri* adalah peran gen virulen dalam mekanisme patogenesis penyakit ESC. Menurut Thune *et al.* (2007) genom *E. ictaluri* diketahui memiliki delapan gen penyandi protein terkait dengan virulensi, yaitu tiga gen dalam biosintesis *lipopolysaccharide*, tiga gen lainnya dalam sistem sekresi tipe III (TTSS), dan dua gen dalam aktivitas urease.

*Type III secretion system* (T3SS) *E. ictaluri* diatur secara ketat dan diekspresikan di dalam makrofag *channel catfish* (Rogge dan Thune 2011). *Type VI secretion system* (T6SS) adalah kompleks protein supramolekul yang terletak di sel bakteri Gram-negatif (Pukatzki *et al.* 2006). Regulasi transkripsi operon mayor T6SS (*evpA-O*) diatur oleh *EsrC*, bagian dari regulasi sistem dua komponen *EsrA-EsrB* (Rogge dan Thune 2011). Penelitian Sakai *et al.* (2018) menunjukkan bahwa *E. ictaluri* asal ikan ayu memiliki berbagai faktor virulen yang secara umum juga dimiliki oleh *E. tarda* dan sebagian besar faktor virulen tersebut berhubungan dengan kelangsungan hidup bakteri tersebut pada inang.

Upaya mengeksplorasi gen virulen dalam riset pengembangan vaksin akhir-akhir ini menjadi sebuah harapan baru untuk mendapatkan vaksin yang potensial dalam rangka upaya pencegahan penyakit. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi gen virulen bakteri *E. ictaluri* dan patogenisitasnya sebagai dasar penentuan isolat kandidat vaksin untuk pengendalian penyakit ESC pada ikan patin. Formulasi vaksin polivalen dari isolat kandidat yang tepat diharapkan menjadi kunci keberhasilan pengendalian ESC di Indonesia.

## 5.2 Bahan dan Metode

### 5.2.1 Bakteri

Penelitian ini menggunakan tujuh belas isolat yaitu sebanyak sembilan isolat merupakan koleksi Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan (BRPBATPP) Bogor Jawa Barat dan delapan isolat dari berbagai wilayah di Indonesia (Tabel 1). Bakteri *E. ictaluri* dikultur dalam media *brain heart infusion agar* (BHIA; Oxoid Ltd, UK) inkubasi selama 36 jam pada suhu 28°C.

### 5.2.2 Identifikasi Gen Virulen

Identifikasi gen virulen *E. ictaluri* mengacu pada Rogge *et al.* (2013) menggunakan beberapa pasangan primer dirancang dari gen virulen bakteri *E. ictaluri* yang terdiri dari gen *type III secretion system* (T3SS), *type IV secretion system* (T4SS), *type VI secretion system* (T6SS) dan urease. Primer yang digunakan untuk identifikasi gen virulen pada *E. ictaluri* dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6 Primer yang digunakan untuk mendeteksi gen virulen *E. ictaluri*

Gen virulen	Nama Primer	Sekuen primer	Ukuran (estimasi)
T3SS (EsrC)	5'esrC	5'-CGTTCATGGCTGCCACAG-3'	3-4 kb
	3'esrC	5'-AAACAGGAGGGTACAGGC-3'	
T6SS (EvpC)	5'evpC	5'-ATGCCAGTGGAATTCGCTG-3'	2-3 kb
	3'evpC	5'-CACCGCTTTGGCCATATTGA-3'	
T4SS (VirD4)	5'virD4	5'-GTTGGCGGGTGTGTTTATCGTT-3'	3-4 kb
	3'virD4	5'-TCAGATTACGGGTCAGCTCGTT-3'	
Urease enzyme (Ure)	5'ureA	5'-CACCTGTAGATTCAGCG-3'	1.5-2 kb
	3'ureC	5'-GACAGAGCATGATAAGCC-3'	
T3SS effector (EseI)	5'esel	5'-ATGTTACCTATCAACCGCATCA-3'	1 kb
	3'esel	5'-TGGGATGAAGACTCGCCGTACAGT GGAGGC-3'	
T3SS effector dan Chaperone (EscD)	5'escD	5'GTACCAACGCCGACTAATCCCTAAC GCCTCCCA C-3'	1-2 kb
	3'escD	5'-TGGGATGAAGACTCGCCGTACAGT GG AGGC-3'	

### 5.2.3 Pemeliharaan ikan dan Uji Patogenisitas

Pengujian patogenisitas terbagi dalam dua tahap yaitu tahap pertama, uji patogenisitas terhadap tujuh belas isolat *E. ictaluri* dan tahap kedua yaitu uji patogenisitas isolat terseleksi untuk menentukan dosis LD<sub>50</sub>. Rerata waktu kematian/ *Mean Time to Death* (MTD) dihitung berdasarkan Nitimulyo *et al.* (2005). Isolat yang digunakan pada tahap dua adalah berdasarkan pertimbangan korelasi gen virulen dengan patogenisitas dan hasil tahap satu untuk penentuan LD<sub>50</sub>. Pengamatan dilakukan dengan cara melihat gejala klinis, tingkah laku ikan, dan perubahan patologi anatomi. Parameter yang diamati antara lain kematian ikan uji, patologi klinik darah, gambaran darah, dan histopatologi.

Uji patogenisitas tahap pertama menggunakan ikan patin ukuran  $11 \pm 1.5$  cm dan berat  $20 \pm 2.03$  g yang berasal dari pembudidaya patin daerah Sukamandi, Jawa Barat. Ikan diaklimatisasi selama dua minggu pada kolam beton volume 1.000 L. Selanjutnya 1.140 ekor ikan diinjeksi bakteri *E. ictaluri* secara *intrapertoneal* (IP) dengan volume sebanyak 0.1 mL diamati selama 21 hari dalam wadah pemeliharaan berupa wadah *container* plastik ukuran  $70 \times 48 \times 42.5$  cm<sup>3</sup> (volume 80 L) sebanyak 57 buah dengan padat tebar 20 ekor per wadah.

Uji patogenisitas tahap kedua menggunakan ikan patin ukuran  $12 \pm 1.06$  cm dan berat  $20 \pm 1.62$  g yang berasal dari pembudidaya patin daerah Sukamandi, Jawa Barat. Ikan diaklimatisasi selama dua minggu pada kolam beton volume 1.000 L. Selanjutnya 960 ekor ikan diinjeksi bakteri *E. ictaluri* secara *intrapertoneal* (IP) dengan volume sebanyak 0.1 mL diamati selama 21 hari dalam wadah pemeliharaan berupa wadah *container* plastik ukuran  $70 \times 48 \times 42.5$  cm<sup>3</sup> (volume 80 L) sebanyak 48 buah dengan padat tebar 20 ekor per wadah. Pengujian LD<sub>50</sub> dilakukan secara injeksi intraperitoneal dengan dosis  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  CFU ikan<sup>-1</sup>, dan ikan kontrol diinjeksi dengan PBS 0.85% 0.1 mL ikan<sup>-1</sup>.

Pakan yang digunakan dalam penelitian ini berupa pakan komersial Hi Pro Vite 781 dengan kandungan protein 31-33%. Pemberian pakan dilakukan secara satiasi tiga kali dalam sehari yaitu pukul 07.00, 12.00, dan 17.00 WIB. Penyiponan dan pergantian air dilakukan setiap pagi hari sebanyak 10 % dari total volume air per akuariumnya. Kualitas air dijaga mengacu pada SNI 01.6483.3: 2000, kisaran suhu 25 - 30 °C, DO > 4 mg L<sup>-1</sup>, pH 6-8, amoniak < 0.02 mg L<sup>-1</sup>, dan nitrit < 1 mg L<sup>-1</sup>.

### 5.2.4 Analisis Data

Penelitian dilakukan dengan metode eksperimental menggunakan rancangan acak lengkap. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan program *Microsoft Excel* 2013. Pengaruh perlakuan dianalisis dengan sidik ragam (ANOVA) dengan *software* SPSS versi 22. Analisis yang menunjukkan pengaruh nyata, dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf kepercayaan 95%. Hasil identifikasi gen virulen, gejala klinis, dan histopatologi dianalisis secara deskriptif.

### 5.3 Hasil dan Pembahasan

Bakteri *E. ictaluri* adalah bakteri Gram-negatif yang memiliki mekanisme pertahanan diri khususnya terkait faktor virulensi dalam kelangsungan hidup intraseluler. Gen virulen adalah salah satu faktor virulensi yang dikembangkan bakteri untuk menginfeksi sel inang. Identifikasi gen virulen bakteri *E. ictaluri* menunjukkan hasil yang variatif dari berbagai isolat *E. ictaluri* (Tabel 7), yaitu sebanyak tiga isolat memiliki 6 gen virulen; empat isolat memiliki 5 gen virulen; dua isolat memiliki 3 dan 4 gen serta enam isolat memiliki 2 gen virulen.

Tabel 7 Identifikasi gen virulen *E. ictaluri* dari ikan patin

Kode Sampel	Kode Isolat	<i>Pathogenicity island gene</i>					
		T3SS	T6SS	T4SS	Urease enzym	T3SS effector	T3SS effector dan Chaperone
		EsrC	EvpC	VirD4	Ure	EseI	EscD
1	PCjG	-	+	-	+	-	-
2	B1	-	+	-	+	-	-
3	B2	-	+	-	+	-	-
4	PJIG	+	+	+	+	+	+
5	PSb5G	+	+	+	+	+	+
6	PR1G	+	+	-	+	+	+
7	S.935G	+	+	+	+	+	+
8	PSb3G	-	+	-	+	-	-
9	PTaH	-	+	-	+	-	-
10	PSb1G	-	+	-	+	-	-
11	PJbH	-	+	+	+	+	+
12	A2	+	+	-	+	+	+
13	PBm2G	-	+	-	+	+	+
14	BSRH	+	+	-	+	-	-
15	PSmH	-	+	-	+	-	+
16	P	+	+	-	+	+	-
17	PBm1G	+	+	-	+	+	+
	<i>E. ictaluri channel catfish</i> S97-773 (Phillips <i>et al.</i> 2016)	+	+	+	+	+	+
	<i>E. ictaluri pangasianodon</i> CAF E3 (Rogge <i>et al.</i> 2013)	+	+	-	+	+	+
	<i>E. ictaluri tilapia RUSVM</i> (Griffin <i>et al.</i> 2015)	+	+	-	+	-	-
	<i>E. ictaluri ikan zebra LADL</i> 11-193 (Griffin <i>et al.</i> 2015)	-	+	-	+	-	-

Keterangan: (+) = ada, (-) = tidak ada, NA = tidak dianalisis

Secara umum pada semua isolat *E. ictaluri* asal berbagai lokasi di Indonesia memiliki gen T6SS (evpC) dan urease. Rogge *et al.* (2013) menyatakan bahwa pada *E. ictaluri* asal Vietnam menyandikan gen T3SS (escD, esrC, dan eseI), gen T6SS (evpC), dan enzim urease *amplified representative genes* (ureG) dan tidak ditemukan gen T4SS virD4. Namun pada isolat *E. ictaluri* asal Indonesia, gen T4SS virD4 teridentifikasi pada isolat dengan kode isolat PJIG, PSb5G, S.935G, dan PJbH identik dengan *E. ictaluri* asal *Channel catfish* S97-773 USA (Phillips *et al.* 2016). *Edwardsiella ictaluri* kode isolat PCjG, B1, B2, PSb3G, PTaH, dan PSb1G hanya memiliki 2 jenis gen virulen sama seperti yang teridentifikasi pada *E. ictaluri* asal ikan zebra LADL 11-193 (Griffin *et al.* 2015).

Faktor virulensi pada *E. ictaluri* melibatkan T3SS dan T6SS, seperti halnya pada *E. tarda* yang berperan dalam kelangsungan hidup dan replikasi dalam sel fagosit inang (Srinivasa Rao *et al.* 2004; Okuda *et al.* 2006). *Type III secretion system* adalah mesin protein kompleks membentuk struktur seperti jarum yang mampu mentranslokasi protein efektor melintasi dinding sel Gram-negatif dan membran sel inang, langsung dari sitoplasma bakteri ke sitosol sel inang (Dean 2011). *Type III secretion system E. ictaluri* mirip dengan *pathogenicity islands Salmonella* (Dubyska *et al.* 2016) yang mampu mengganggu apoptosis dan mendestabilisasi mikrotubulus dalam sel fagosit inang (Okuda *et al.* 2006; Xie *et al.* 2010) sedangkan T6SS menghambat aktivasi NLR *family pyrin domain containing 3* (NLRP3) di daerah inflamasi (Chen *et al.* 2017). *Type III secretion system* sangat penting dalam patogenesis *E. ictaluri* (Thune *et al.* 2007; Rogge dan Thune 2011). *Type III secretion system* gen *escD* merupakan *putative chaperone* protein untuk menstimulasi EseI yaitu efektor untuk protein *translocon* yang ditemukan dalam plasmid pE12, sedangkan EsrC adalah pengatur untuk aktivasi transkripsi. Regulasi transkripsi operon mayor T6SS (*evpA-O*) diatur oleh EsrC, bagian dari regulasi sistem dua komponen EsrA-EsrB, yang dipengaruhi oleh pH dan konsentrasi fosfat anorganik (Rogge dan Thune 2011). Gen *EvpC* pada *E. ictaluri* diduga berperan dalam invasi ke dalam sel inang seperti halnya *EvpP* pada *E. piscicida* (Wang *et al.* 2009).

Pertumbuhan mikroorganisme dipengaruhi oleh pH lingkungan ekstraseluler saja, sedangkan pH intraseluler harus tetap mendekati netral dengan tujuan mencegah kerusakan makromolekul (Madigan *et al.* 2016). *Edwardsiella ictaluri* bereaksi positif terhadap urease yang hanya dapat diaktivasi oleh pH rendah atau kondisi lingkungan asam (Booth *et al.* 2009). Urease memainkan peran penting dalam replikasi intraseluler. Derajat keasaman mempunyai peran penting dalam mengaktifkan gen-gen virulen yang ada, di mana pH media budidaya patin pada kondisi di bawah enam mengakibatkan kematian yang tinggi akibat infeksi *E. ictaluri* seperti yang terjadi pada penelitian yang dilakukan oleh Phuoc (2014). Isolat *E. ictaluri* kode isolat PJBH, A2, dan PBm1G berasal dari lokasi yang memiliki pH di bawah enam yaitu lahan gambut sehingga memiliki tingkat virulensi yang lebih tinggi dengan pola kematian yang akut dari isolat lainnya. Sementara pada PSb1G dan P kemungkinan merupakan isolat yang diperoleh pada saat terjadi wabah ESC pada musim penghujan. Rogge dan Thune (2011) menyatakan bahwa sensor kinase mendeteksi pH rendah dan memfosforilasi EsrB, aktivasi EsrB akan meningkatkan ekspresi *pathogenicity islands* gen T3SS termasuk EsrC. Peningkatan ekspresi EsrC akan mengaktifkan gen T6SS *EvpC*. Kombinasi fosfat rendah dan pH rendah akan meningkatkan regulasi *putative E. ictaluri* T3SS efektor EseI.

Kematian ikan patin akibat infeksi *E. ictaluri* tertinggi sebesar 96.67-100% terjadi pada ikan yang diinfeksi dengan *E. ictaluri* kode isolat PSb1G, PJBH, A2, P, dan PBm1G dengan rerata waktu kematian 3.73-4.58 hari (Tabel 8).

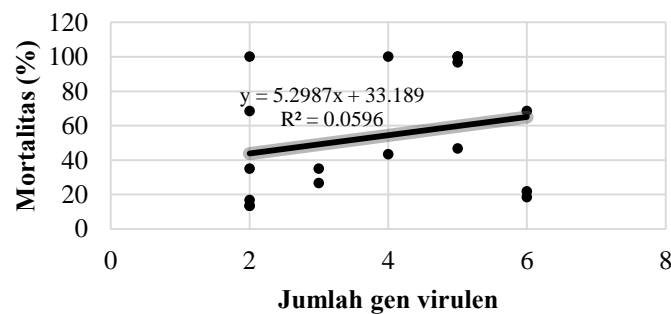


Tabel 8 Nilai mortalitas dan MTD pada ikan patin

Kode Sampel	Kode isolat	Jumlah gen virulen	Mortalitas (%)	MTD (hari)
1	PCjG	2	35.00±8.66 <sup>de</sup>	10.34±0.65 <sup>c</sup>
2	B1	2	68.33±2.89 <sup>bc</sup>	9.94±1.00 <sup>c</sup>
3	B2	2	16.67±5.77 <sup>fg</sup>	7.13±0.33 <sup>b</sup>
4	PJIG	6	68.33±2.89 <sup>bc</sup>	11.90±0.26 <sup>d</sup>
5	PSb5G	6	18.33±2.89 <sup>fg</sup>	6.79±0.77 <sup>b</sup>
6	PR1G	5	46.67±5.77 <sup>c</sup>	6.68±0.81 <sup>b</sup>
7	S.935G	6	21.67±5.77 <sup>fg</sup>	9.40±0.57 <sup>c</sup>
8	PSb3G	2	13.33±2.89 <sup>g</sup>	18.75±0.35 <sup>f</sup>
9	PTaH	2	13.33±2.89 <sup>g</sup>	16.33±0.47 <sup>e</sup>
10	PSb1G	2	100.00±0.00 <sup>a</sup>	4.13±0.25 <sup>a</sup>
11	PJbH	5	100.00±0.00 <sup>a</sup>	4.08±0.11 <sup>a</sup>
12	A2	5	96.67±5.77 <sup>a</sup>	4.58±0.11 <sup>a</sup>
13	PBm2G	4	43.33±2.89 <sup>cd</sup>	10.26±2.14 <sup>c</sup>
14	BSRH	3	35.00±17,32 <sup>de</sup>	7.17±0.24 <sup>b</sup>
15	PSmH	3	26.67±5.77 <sup>ef</sup>	12.58±0.12 <sup>d</sup>
16	P	4	100.00±0.00 <sup>a</sup>	3.73±0.11 <sup>a</sup>
17	PBm1G	5	100.00±0.00 <sup>a</sup>	3.93±0.11 <sup>a</sup>

Angka-angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom yang sama berbeda nyata pada taraf uji (Duncan,  $p < 0.05$ )

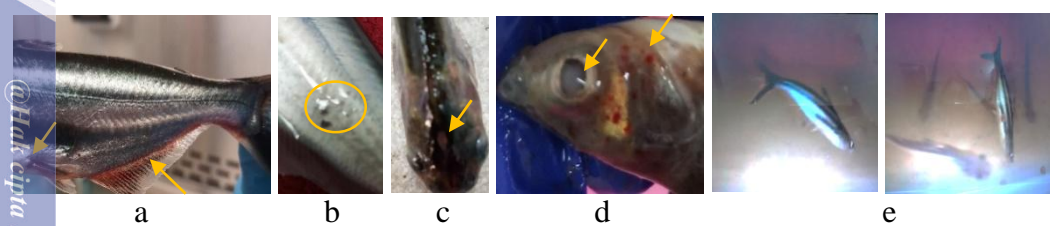
Hasil pengujian menunjukkan nilai korelasi sangat rendah artinya bahwa mortalitas yang terjadi pada ikan patin tidak berkaitan dengan jumlah gen virulen (Gambar 10), hal ini diduga berkaitan dengan faktor lain yang berpengaruh dalam mekanisme patogenisitas ESC. Kematian mulai terjadi pada hari ke-3 pascainfeksi. Ikan patin menunjukkan gejala klinis spesifik terinfeksi *E. ictaluri* antara lain kelemahan, melanosis, hilang nafsu makan, bercak putih pada mata, luka pada kepala, lesi pada permukaan tubuh, anus membengkak, lubang pada bagian kepala, dan abnormalitas berenang.



Gambar 10 Regresi linear korelasi jumlah gen virulen isolat *E. ictaluri* dengan mortalitas pada ikan patin

Melanosis mulai terjadi 24 jam pascainfeksi; kemerahan sirip dan ekor, lesi pada permukaan tubuh, luka sekitar kepala, bercak putih di daerah mata mulai terjadi 48 jam pascainfeksi; nafsu makan menurun signifikan, berenang lemah dan menyendiri mulai terjadi pada hari ke-4 pascainfeksi; perut membesar/*dropsy*, lubang pada bagian kepala, bengkak anus mulai terjadi pada hari ke-6 pascainfeksi, hari ke-7 pascainfeksi menunjukkan mata menonjol, berenang *erratic* dan spiral (Gambar 11). Hasil penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa paparan infeksi

*E. ictaluri* secara eksperimental dalam waktu singkat mampu menimbulkan penyakit dengan gejala khas ESC pada ikan patin.



Gambar 11 Gejala klinis ikan patin yang diinfeksi *E. ictaluri*. Bengkak anus dan kemerahan sirip (a); lesi pada permukaan tubuh (b); lubang pada kepala (c); bercak putih mata dan luka pada daerah kepala (d); berenang *erratic* dan spiral (e).

Isolat *E. ictaluri* yang terseleksi berdasarkan identifikasi gen virulen dan uji patogenisitas serta mempertimbangkan hasil tahap satu untuk pengujian LD<sub>50</sub> adalah PJbH, P, dan PBM1G yang mewakili tiga wilayah besar sentra budidaya yaitu Sumatera, Jawa, dan Kalimantan. Hasil pengujian pada ikan patin diperoleh LD<sub>50</sub> bakteri PJbH, P, dan PBM1G masing-masing sebesar 4.42x10<sup>8</sup>, 5.04x10<sup>6</sup>, dan 6.8x10<sup>5</sup> CFU. Suanyuk *et al.* (2014) juga melaporkan bahwa konsentrasi *E. ictaluri* 10<sup>6</sup> CFU mL<sup>-1</sup> menimbulkan kematian 50% *catfish* hibrida dan Phuoc (2014) menyatakan *E. ictaluri* 10<sup>7</sup> CFU mL<sup>-1</sup> dengan perendaman hingga 30 menit menyebabkan persentase kematian kumulatif 63% dengan gejala klinis dan patologi anatomi khas penyakit ESC. Rerata waktu kematian menunjukkan bahwa *E. ictaluri* terbagi menjadi 2 tipe, yaitu bersifat akut yang menyebabkan kematian cepat dan tinggi pada ikan patin serta tipe kronis yang berjalan lambat dan menyebabkan kematian yang rendah. Tipe akut ditemukan pada ikan patin yang diinjeksi isolat kode PSb1G, PJbH, A2, P, dan PBm1G.

Darah merefleksikan kondisi patofisiologis tubuh dimana adanya infeksi suatu penyakit akan mengakibatkan perubahan pada darah, terutama kandungan hematokrit, hemoglobin, jumlah eritrosit, dan jumlah leukosit. Kadar hematokrit mulai mengalami penurunan pada hari ke-2 dan secara signifikan (P<0.05) pada hari ke-14 dibandingkan perlakuan kontrol (Gambar 12). Infeksi *E. ictaluri* menyebabkan penurunan hematokrit yang merupakan persentase volume eritrosit dalam darah dan hal tersebut akan berpengaruh terhadap nilai jumlah eritrosit. Infeksi bakteri *E. ictaluri* secara fisiologis menyebabkan penurunan nafsu makan sehingga berpengaruh terhadap penurunan nilai hematokrit darah.

Kadar hemoglobin pada perlakuan mulai mengalami penurunan hari ke-2 pascainfeksi dan mulai meningkat kembali pada hari ke-21 pascainfeksi (Gambar 13), hal ini diduga disebabkan tubuh mulai berespons adaptif terhadap invasi patogen yang masuk ke dalam tubuh. Menurunnya nilai hemoglobin dalam darah berkaitan dengan rendahnya nilai eritrosit yang diduga karena darah ikan mengalami lisis. Lisis disebabkan oleh pecahnya eritrosit karena β-hemolisin yang dihasilkan *E. ictaluri* mampu melisiskan dan melepaskan hemoglobin. Ketujuh belas isolat *E. ictaluri* yang digunakan memiliki kemampuan menghasilkan β-hemolisin yang dapat melisiskan agar darah.

Jumlah sel darah merah mengalami penurunan secara signifikan pada hari ke-4 (P<0.05) pada perlakuan dibanding kontrol (Gambar 14). Penurunan jumlah

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.

sel darah merah disebabkan karena *E. ictaluri* memiliki enzim  $\beta$ -hemolisin mampu melisis sel darah merah dan infeksi pada organ hematopoetik yaitu ginjal, hati, dan limpa di mana menyebabkan abnormalitas morfologi dan fungsi yang mempengaruhi dalam kemampuan memproduksi sel darah merah. Penurunan jumlah sel darah merah menunjukkan bahwa patogen berperan menyebabkan penyakit, melisis sejumlah besar sel darah merah yang berujung pada penurunan kemampuan sel darah merah untuk mengangkut oksigen ke sel jaringan, hipoksia, penurunan metabolisme dan secara gejala klinis menunjukkan sesak nafas (*dyspnea*), respons lambat, nafsu makan menurun atau hilang (Li *et al.* 2018). Chen *et al.* (2019) menyatakan bahwa jumlah sel darah merah berkurang secara signifikan seiring lamanya waktu infeksi *E. ictaluri*.

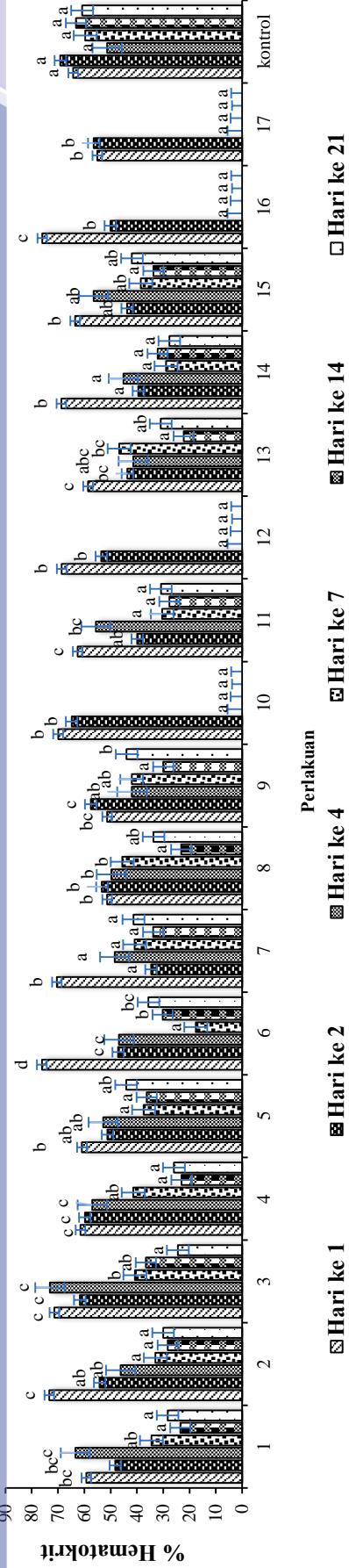
Jumlah sel darah putih mengalami peningkatan mulai 24 jam pascainfeksi dan secara signifikan ( $P < 0.05$ ) pada hari ke-7 dan hari ke-14 pascainfeksi (Gambar 15) menunjukkan bahwa respons imun tubuh segera bekerja ketika patogen menginfeksi. Sel darah putih meliputi fagosit sistem imun bawaan dan limfosit yang aktif pada respons imun adaptif (Madigan *et al.* 2016). Respons imun alami akan bertahan dan berfungsi dengan baik dalam waktu beberapa hari sampai minggu setelah invasi bakteri ke dalam tubuh. Komponen sel darah putih terdiri dari limfosit, monosit, neutrofil, eosinofil, dan basofil. Hasil penelitian menunjukkan bahwa limfosit mengalami penurunan (limfopenia) sebaliknya neutrofil (neutrofilia) dan monosit mengalami peningkatan (monositosis) (Gambar 16, 17, dan 18).

Endotoksin yang dihasilkan oleh bakteri Gram-negatif menyebabkan diare, penurunan limfosit dan trombosit dengan cepat, menstimuli pelepasan sitokin dan inflamasi (Sunatmo 2012). Penurunan persentase limfosit juga dapat disebabkan oleh adanya bakteri atau kondisi stres lainnya (Parvez dan Mudarris 2014). Neutrofil dan monosit memiliki fungsi fagositik yang penting, ketika cedera atau peradangan terjadi, tubuh secara aktif menghasilkan respons darurat, dan jumlah sel darah putih terutama neutrofil serta monosit meningkat secara signifikan (Bao dan Cao 2011; Lin *et al.* 2014).

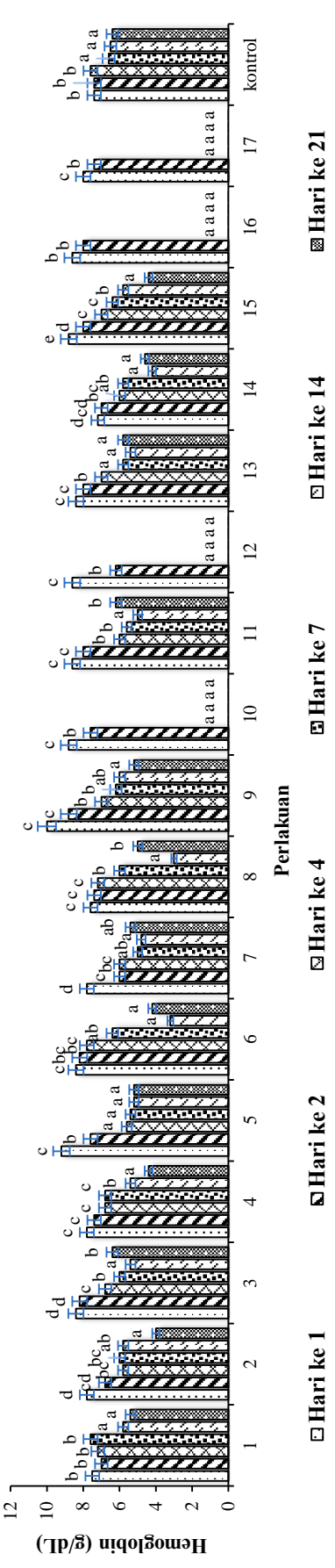
Parameter glukosa darah menunjukkan perbedaan signifikan ( $P < 0.05$ ) pada hari ke-4 untuk perlakuan 4 (PJIG), 5 (PSb5G), 6 (PR1G), 13 (PBm2G), dan 14 (BSRH) serta hari ke-7 pada perlakuan 1 (PcjG), 3 (B2), 7 (S.935G), 8 (PSb3G), 9 (PTaH), dan 12 (A2) (Gambar 19). Kadar glukosa tertinggi pada beberapa perlakuan terdeteksi pada hari ke-4 pascainfeksi dan sebagian mengalami peningkatan pada hari ke-7. Infeksi *E. ictaluri* menyebabkan peningkatan glukosa darah melalui jalur glukogenesis dan glikogenolisis sehingga mempengaruhi respons imun. Glukosa dilepaskan (dari hati dan otot) menuju sirkulasi darah dan masuk ke dalam sel melalui aksi insulin (Nelson & Cox 2005).

Jika pertumbuhan bakteri terjadi dapat menyebabkan bakteremia, jika bakteri sudah menyebar ke pembuluh darah dan limpa dapat menyebabkan septikemia (Madigan *et al.* 2016). Septikemia dapat menyebabkan inflamasi hebat, syok septik, dan kematian cepat. Almendras dan Fuentealba (2014) menyatakan bahwa septikemia adalah kondisi yang mengancam jiwa yang disebabkan oleh respons inang yang tidak seimbang terhadap infeksi yang parah. Selama sepsis, respons inflamasi dapat bertindak sebagai pedang bermata dua, melawan patogen di satu sisi, tetapi berpotensi menyebabkan kerusakan jaringan di sisi lain. Pada infeksi *E. ictaluri* bakteremia dan septikemia menyerang pada organ target yaitu hati, ginjal, dan limpa. Perubahan patologis organ internal yaitu hati, ginjal, dan

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang  
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan nama dan menyebutkan sumber  
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan  
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.



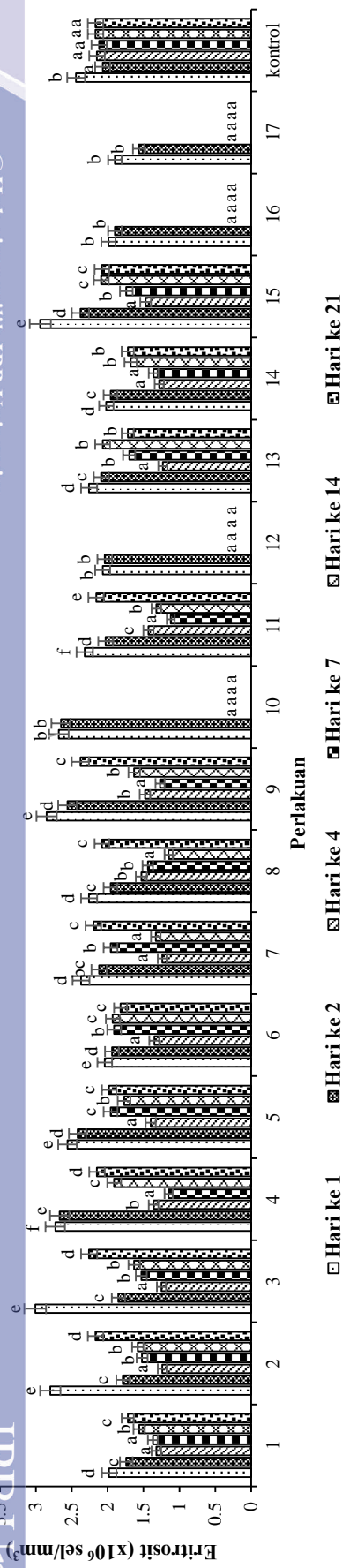
Gambar 12 Kadar hematokrit ikan patin yang diinfeksi isolat *E. ictaluri* kode sampel 1-17. Huruf yang berbeda di atas diagram batang dengan pola yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan berbeda nyata (Duncan,  $p < 0.05$ )



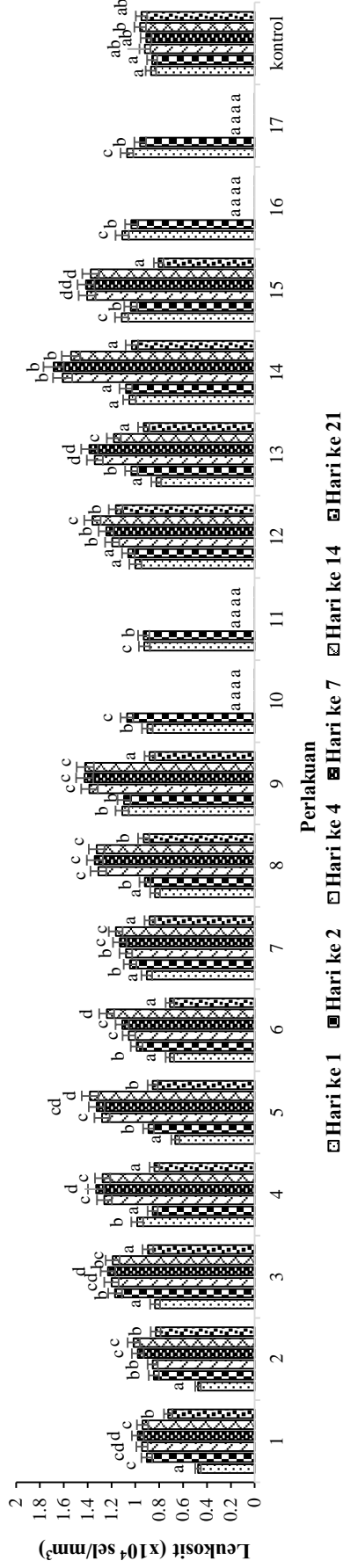
Gambar 13 Kadar hemoglobin ikan patin yang diinfeksi isolat *E. ictaluri* kode sampel 1-17. Huruf yang berbeda di atas diagram batang dengan pola yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan berbeda nyata (Duncan,  $p < 0.05$ )

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 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.



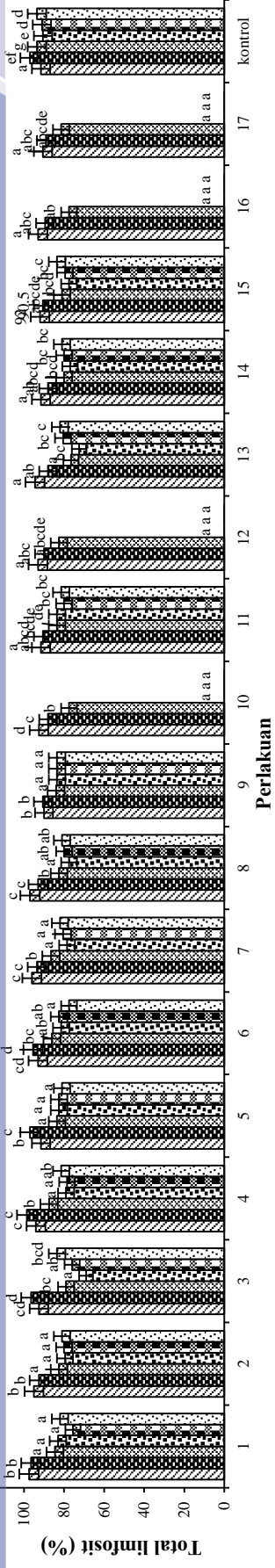
Gambar 14 Jumlah sel darah merah ikan patin yang diinfeksi isolat *E. ictaluri* kode sampel 1-17. Huruf yang berbeda di atas diagram batang dengan pola yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan berbeda nyata (Duncan,  $p < 0.05$ )



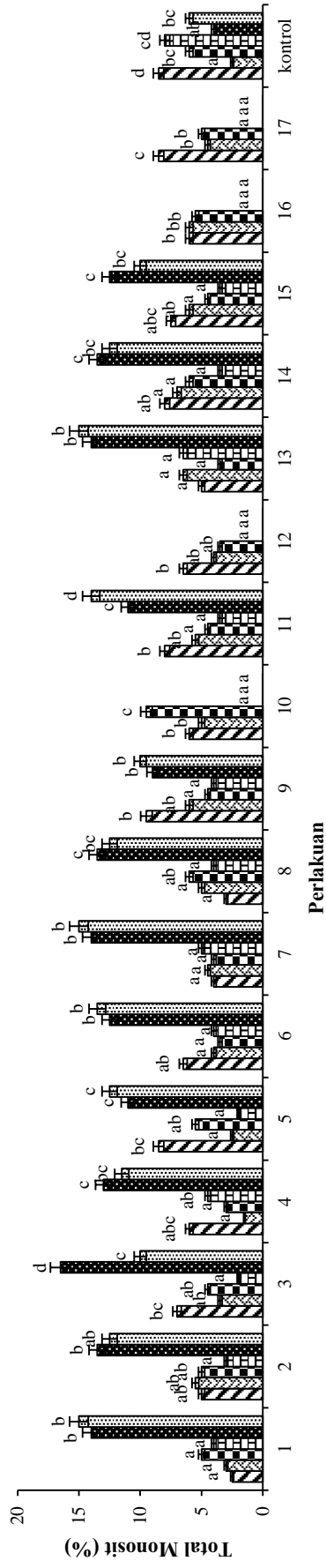
Gambar 15 Jumlah sel darah putih ikan patin yang diinfeksi isolat *E. ictaluri* kode sampel 1-17. Huruf yang berbeda di atas diagram batang dengan pola yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan berbeda nyata (Duncan,  $p < 0.05$ )

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.



Gambar 16 Total limfosit ikan patin yang diinfeksi isolat *E. ictaluri* kode sampel 1-17. Huruf yang berbeda di atas diagram batang dengan pola yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan berbeda nyata (Duncan,  $p < 0.05$ )

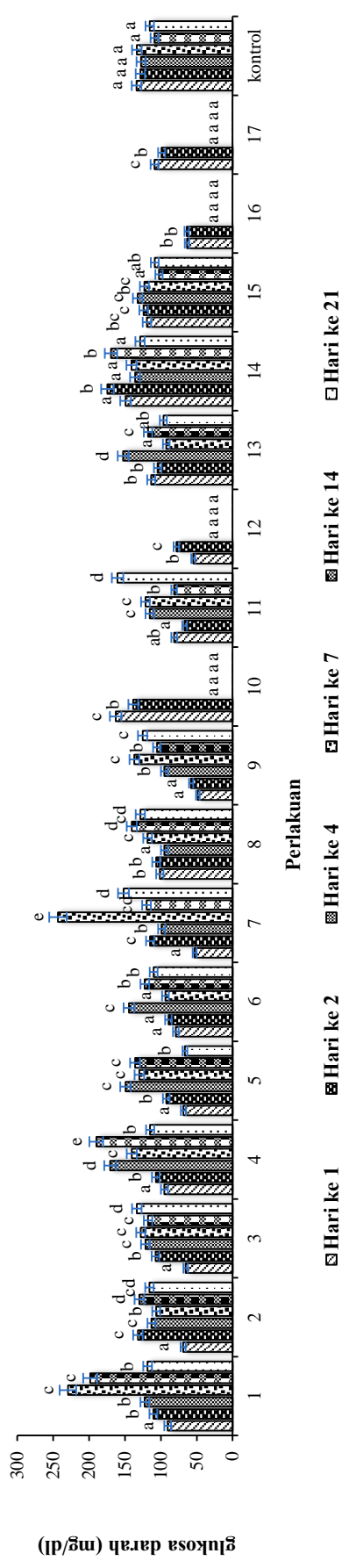


Gambar 17 Total monosit ikan patin yang diinfeksi isolat *E. ictaluri* kode sampel 1-17. Huruf yang berbeda di atas diagram batang dengan pola yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan berbeda nyata (Duncan,  $p < 0.05$ )

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 umum yang sah  
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University

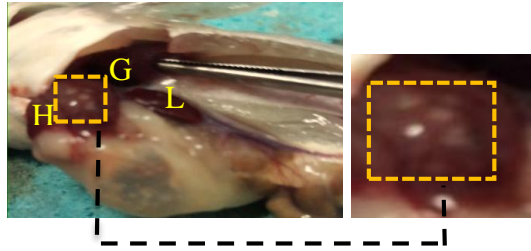


Gambar 18 Total neutrofil ikan patin yang diinfeksi isolat *E. ictaluri* kode sampel 1-17. Huruf yang berbeda di atas diagram batang dengan pola yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan berbeda nyata (Duncan,  $p < 0.05$ )



Gambar 19 Kadar glukosa darah ikan patin yang diinfeksi isolat *E. ictaluri* kode sampel 1-17. Huruf yang berbeda di atas diagram batang dengan pola yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan berbeda nyata (Duncan,  $p < 0.05$ )

limpa mulai teramati 48 jam pascainfeksi. Organ hati, ginjal, dan limpa mengalami pembengkakan dan pendarahan serta nodul keputihan an pada hati (Gambar 20), hal ini mungkin karena hati, ginjal, dan limpa menjadi organ target awal utama dari infeksi *E. ictaluri*.



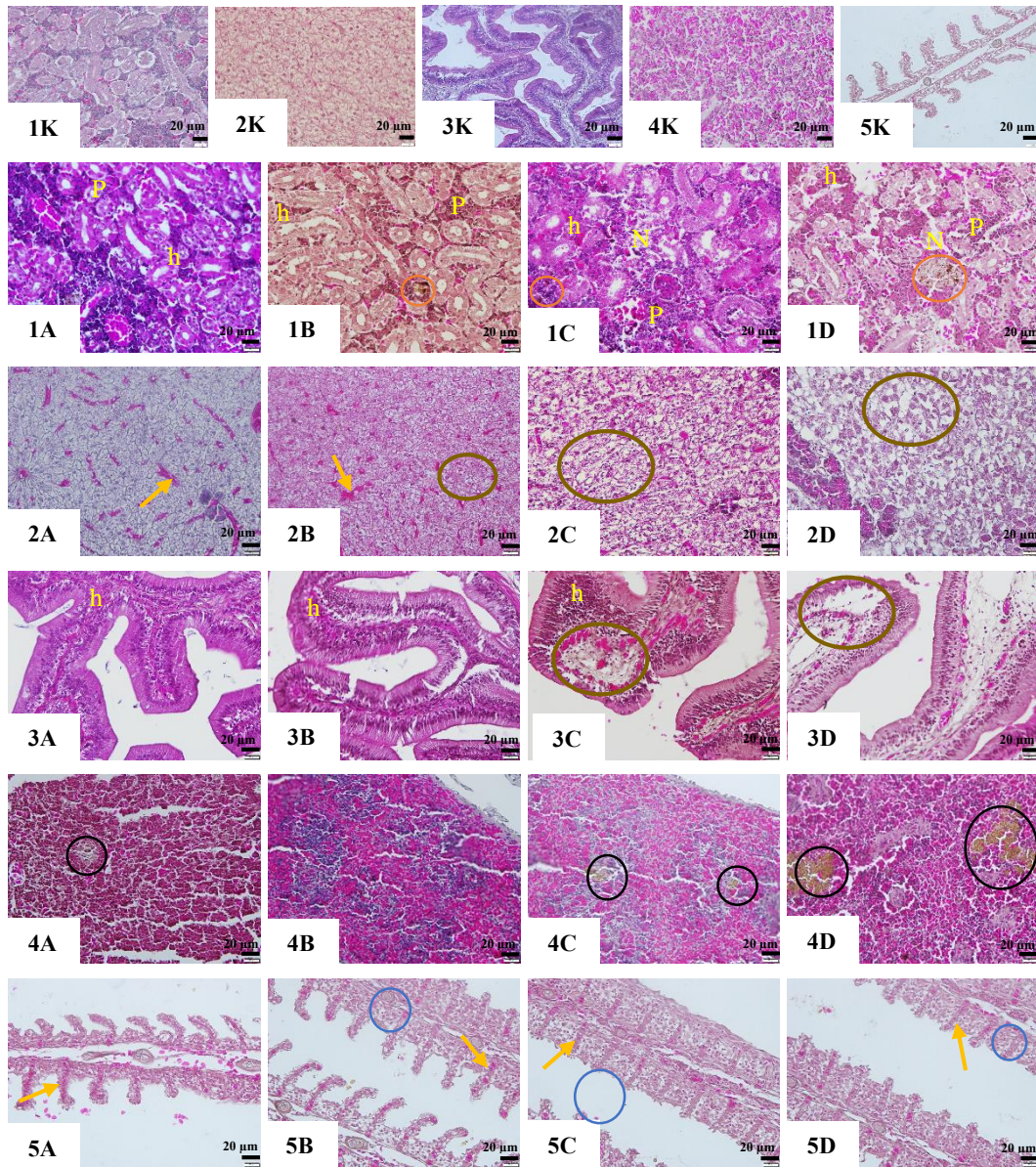
Gambar 20 Patologi anatomi organ hati, ginjal, dan limpa yang terinfeksi bakteri *E. ictaluri* 48 jam pascainfeksi. Nodul keputihan (kotak); H=hati; G=ginjal; L=limpa

Penelitian yang dilakukan oleh Chen *et al.* (2019) menunjukkan awal infeksi (0-1 hari), jumlah koloni *E. ictaluri* di otak lebih rendah dibandingkan dengan jaringan di hati, limpa, dan ginjal. Namun setelah 3 hari pascainfeksi, jumlah *E. ictaluri* di otak, ginjal anterior, dan limpa meningkat, dan jumlah koloni *E. ictaluri* meningkat secara signifikan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa re-isolasi 48 jam pascainfeksi dari organ hati, ginjal, limpa, dan otak ikan yang diinfeksi menunjukkan bakteri *E. ictaluri* teridentifikasi tumbuh pada media BHIA, hal tersebut membuktikan bahwa *E. ictaluri* telah melakukan invasi dan berkolonisasi pada organ target.

Perubahan histopatologi dari organ ginjal, hati, usus, limpa, dan insang ikan patin yang terinfeksi *E. ictaluri* menunjukkan perubahan antara lain kongesti, vacuolisasi, nekrosis pada hati, peradangan, hemoragik, nekrosis, dan *melanomacrophage center* (MMC) pada ginjal, hemoragik dan nekrosis pada usus serta peradangan, nekrosis, dan hemosiderosis pada limpa. Sedangkan insang mengalami kongesti dan proliferasi lamella sekunder, hal tersebut dapat dilihat pada Gambar 21.

Kerusakan jaringan pada tingkat ringan mulai terjadi pada hari ke-4 pascainfeksi dan bertambah seiring dengan lamanya waktu infeksi. Pada hari ke-14 pascainfeksi kerusakan secara signifikan terjadi pada ginjal, hati, usus, limpa, dan insang. Pada tahap awal infeksi, pelebaran kapiler sehingga pembuluh darah penuh terisi eritrosit yang dikenal dengan kongesti dan pada tahap selanjutnya terlihat infiltrasi sel radang (Gambar 1A, 2A, 3A, 4A, dan 5A). Ginjal menunjukkan infiltrasi sel inflamasi dan nekrosis sel (Gambar 1B-D). Sedangkan untuk jaringan usus, peradangan pada usus berkembang menjadi kerusakan yang serius yaitu vakuolisasi dan nekrosis pada beberapa bagian (Gambar 3C-D). Limpa menunjukkan nekrosis limfositik progresif dan makrofag yang semakin banyak seiring perkembangan infeksi (Gambar 4A-D). Insang menunjukkan kongesti dan proliferasi lamella sekunder, kerusakan tersebut menyebabkan ikan mengalami gejala klinis kesulitan bernafas (Gambar 5A-D). Kerusakan secara umum juga terjadi pada penelitian yang dilakukan oleh Akgul *et al.* (2018) bahwa *E. ictaluri* menyebabkan septicemia, nekrosis, hemoragik, inflamasi, dan ulserasi pada *yellow catfish*.





Gambar 21 Histopatologi organ Ginjal (1), Hati (2), Usus (3), Limpa (4), dan insang (5). K= kontrol; A= hari ke-4 pascainfeksi; B= hari ke-7 pascainfeksi; C= hari ke-14 pascainfeksi dan D= hari ke-21 pascainfeksi. Panah kuning: kongesti; lingkaran orange: MMC; lingkaran coklat: vacuolisasi dan nekrosis; h: hemorhagik; N: nekrosis; lingkaran hitam: pengendapan hemosiderin; lingkaran biru: proliferasi lamella. Pewarnaan HE.

Invasi adalah kemampuan patogen untuk masuk ke jaringan atau sel inang. Bakteri *E. ictaluri* menginfeksi ikan melalui beberapa rute dan salah satunya ditularkan melalui air yang selanjutnya menginvasi ke organ olfaktorius melalui saluran pernafasan (nasal) dan bermigrasi ke saraf olfaktorius, kemudian masuk ke selaput otak dan akhirnya ke tengkorak dan kulit (Miyazaki dan plumb 1985; Shotts *et al.* 1986; Morrison dan Plumb 1994). *Edwardsiella ictaluri* masuk melalui darah

menghasilkan septikemia dan jika tertelan masuk ke epitel usus dapat menyebabkan peradangan (Shott et al. 1986; Newton et al. 1989).

Pendarahan akut dan nekrosis pada kasus ESC berkaitan dengan  $\beta$ -hemolisin dan endotoksin yang dihasilkan *E. ictaluri* seperti halnya pada infeksi yang disebabkan oleh *A. hydrophila* (Afifi et al. 2000). Enzim  $\beta$ -hemolisin menyebabkan hemolisis di dalam tubuh ikan diikuti oleh pengendapan hemosiderin pada jaringan limpa (Miyazaki dan Kaige 1985). Hemosiderin adalah pigmen butiran coklat kuning yang mengandung besi yang sering diamati pada bagian jaringan. Di dalam sel, besi biasanya tersusun, terikat pada protein apoferritin sebagai feritin. Ketika sejumlah besar feritin hadir, agregat terbentuk, menghasilkan butiran yang secara histologis dikenal sebagai hemosiderin. Hemosiderin biasanya terlihat di area kongesti atau hemoragik atau dimana ada kerusakan sel darah merah yang berlebihan (Slauson dan Cooper 2002).

#### 5.4 Simpulan

Bakteri *E. ictaluri* asal berbagai lokasi budidaya di Indonesia memiliki variasi jumlah gen virulen yang berbeda namun secara umum memiliki gen T6SS (evpC) dan urease. Jumlah gen virulen yang dimiliki oleh *E. ictaluri* tidak berpengaruh terhadap patogenesis ESC pada ikan patin. Infeksi *E. ictaluri* menyebabkan perubahan abnormalitas patologi klinik, gambaran darah, dan kerusakan jaringan.

## VI KARAKTERISTIK PROTEIN DAN TOKSISITAS *Edwardsiella ictaluri* PENYEBAB PENYAKIT *ENTERIC SEPTICEMIA OF CATFISH* PADA IKAN PATIN, *Pangasianodon hypophthalmus*

### ABSTRAK

*Edwardsiella ictaluri* adalah bakteri Gram-negatif penyebab penyakit *Enteric septicemia of catfish* (ESC) pada ikan patin. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis profil protein dan toksisitas antara sediaan sel utuh dan produk ekstraseluler (ECP) bakteri *E. ictaluri* serta korelasinya terhadap patogenisitas pada ikan patin. Analisis profil protein dilakukan dengan metode *SDS-PAGE*. Uji toksisitas dilakukan dengan menginjeksikan sediaan sel utuh dan ECP dari bakteri *E. ictaluri* secara intraperitoneal dengan dosis 0.1 mL ikan<sup>-1</sup>. Hasil dari fraksinasi protein sel utuh P dan PBm1G menunjukkan 10 pita protein dan 14 pita protein pada PJBH sedangkan pada sediaan produk ekstraseluler hanya 2 pita protein. Uji toksisitas menyebabkan terjadinya kematian yang tinggi pada perlakuan sel utuh sebesar 97.78-100% sedangkan kematian yang rendah sebesar 6.67% terjadi pada perlakuan ECP. Kematian mulai terjadi setelah 48 jam pascainjeksi. Pada perlakuan sel utuh, ikan menunjukkan abnormalitas gejala klinis antara lain keputihan pada lensa mata (*ocular opacity*), lesi pada permukaan tubuh, lubang pada kepala (*hole in the head*), bengkak pada anus, ikan bernafas terengah-engah (*gaspings*), berenang tidak menentu (*erratic*), berenang spiral, dan akhirnya mengalami kematian. Patologi anatomi toksisitas sel utuh menunjukkan akumulasi cairan yang bercampur darah pada rongga perut, pembengkakan hati, ginjal, dan limpa. Histopatologi menunjukkan kongesti, vakuolisasi, dan nekrosis pada hati; peradangan, hemoragik, nekrosis, hemosideriosis, dan *melanomacrophage center* pada ginjal; dan peradangan, hemoragik, hemosiderosis, dan nekrosis pada limpa. Komponen protein dari sel utuh *E. ictaluri* terbukti bersifat virulen yang berperan dalam patogenesis infeksi *E. ictaluri* pada ikan patin.

Kata kunci: *Edwardsiella ictaluri*, gejala klinis, profil protein, *SDS-PAGE*, toksisitas

### ABSTRACT

*Edwardsiella ictaluri* is gram-negative bacteria causing enteric septicemia of catfish (ESC) disease on catfish. The purpose of this study was to analyze the protein profile and toxicity between whole cell preparations and the extracellular product (ECP) of *E. ictaluri* bacteria and their correlation to pathogenicity in catfish. The protein profiles were analyzed using the *SDS-PAGE* method. The toxicity was tested by intraperitoneally injecting the whole-cell dosage and ECP of bacteria *E. ictaluri* with 0.1 mL fish<sup>-1</sup>. The fractionation of whole-cells protein on P and PBm1G isolates discovered ten protein bands, on PJBH discovered 14 protein bands, and on extracellular products discovered two protein bands. Toxicity test led to high mortality for 97.78-100% in the whole-cell treatment, while the low mortality was 6.67% in the ECP treatment. The mortality started to occur after 48 hours of the injection. The fish showed abnormal clinical symptoms in the whole-cell treatment, such as ocular opacity, lesions on the body surface, hole in the head, swollen anus, gasping, erratic, spiral swimming, and death. The anatomic pathology of whole-cell

toxicity showed the accumulation of fluid mixed with blood in the abdominal cavity and swollen liver, kidney, and spleen. The histopathology showed congestion, vacuolization, and necrosis in the liver; hemorrhagic inflammation, necrosis, hemosiderosis, and melanomacrophage centers in the kidney; and inflammation, hemorrhagic, hemosiderosis, and necrosis in the spleen. Protein components of the whole cell of *E. ictaluri* were proved virulent and functioned in the pathogenesis of *E. ictaluri* infection in catfish.

**Key words:** clinical symptoms, *Edwardsiella ictaluri*, protein profile, SDS-PAGE, toxicity

## 6.1 Pendahuluan

Identifikasi gen virulen bakteri *E. ictaluri* asal berbagai lokasi budidaya di Indonesia terhadap gen T3SS, T4SS, T6SS, dan enzim urease diketahui memiliki variasi jenis dan jumlah gen virulen berbeda namun secara umum memiliki gen T6SS dan urease pada semua isolat. Banyaknya jumlah gen virulen tidak berpengaruh terhadap patogenisitas ESC pada ikan patin. Namun diduga ada kombinasi dengan faktor lain yang terlibat dalam virulensi *E. ictaluri*.

Protein ekstraseluler yang menimbulkan penyakit dikenal sebagai faktor virulensi yang merangsang patogen tumbuh dan berkolonisasi. Bakteri Gram-negatif memiliki lipopolisakarida (LPS) yang merupakan endotoksin yang dilepaskan jika sel mengalami lisis (Sunatmo 2012). Endotoksin ditemukan pada berbagai bakteri Gram negatif diantaranya *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Aeromonas* dan *Edwardsiella*. Peran utama protein ekstraseluler yaitu menginvasi patogen ke sel inang, menyerap nutrisi, menyebar luas invasi, dan meningkatkan respons sistem kekebalan inang. Ekstraseluler Produk mengandung banyak zat yang memicu respons imun inang seperti *lipase*, *amylase*, dan *protease* serta menunjukkan aktivitas hemolitik (Song *et al.* 2018).

Korelasi antara protein ekstraseluler dengan faktor virulensi dalam patogenisitas infeksi *E. ictaluri* telah banyak dikaji. Jalur infeksi *E. ictaluri* disinyalir dengan beberapa cara melalui bagian yang merupakan faktor virulensi, seperti halnya yang ditemukan pada *E. tarda*. Pertama menggunakan *flagella* untuk mendekati dan menempel pada sel epitel inang (Newton dan Triche 1993; He *et al.* 2012). Setelah mengikat sel inang, bakteri dibantu oleh protein yang disebut hemolisin untuk menginvasi yang memungkinkan bakteri untuk menyerang atau diinternalisasi ke dalam jaringan inang dan sel seperti sel epitel (Williams dan Lawrence 2005; Wang *et al.* 2010)). Ketika jumlah bakteri meningkat dan inang tidak mampu melawan infeksi lokal maka *Edwardsiella* akan menyebar dan menyerang jaringan lebih dalam dan mencapai darah dan limpo nodus. Setelah berada di sel fagosit inang, *E. ictaluri* mengaktifkan mekanisme sekresi protein tipe III dan VI yang membantu bertahan dan replikasi didalam sel fagosit (Liu *et al.* 2017). Komponen-komponen protein yang terkandung dalam bakteri *E. ictaluri* diduga berperan dalam mekanisme infeksi. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis profil protein dan toksisitas antara sediaan sel utuh dan produk ekstraseluler (ECP) bakteri *E. ictaluri* serta korelasinya terhadap patogenisitas pada ikan patin.

## 6.2 Bahan dan Metode

### 6.2.1 Bakteri

*Edwardsiella ictaluri* yang digunakan merupakan tiga isolat terseleksi yang paling virulen dengan komposisi gen virulen yang saling melengkapi yang berasal dari sampel ikan patin yang terinfeksi penyakit ESC dari sentra budidaya patin di Indonesia (Tabel 9). Bakteri dikultur pada media *brain heart infusion agar* (BHIA; Oxoid Ltd, UK) diinkubasi pada suhu 28 °C selama 36 jam.

Tabel 9 Kode isolat *E. ictaluri*, asal, dan jenis gen virulen

Kode isolat	Asal	Jenis gen virulen
PJbH	BPBAT Jambi	T6SS (EvpC), T4SS (VirD4), <i>Urease Enzyme</i> (Ure), T3SS <i>effector</i> (EseI), T3SS <i>effector</i> dan <i>Chaperone</i> (EscD)
P	BBAT Sukabumi, Jawa Barat	T3SS (EsrC), T6SS (EvpC), <i>Urease Enzyme</i> (Ure), T3SS <i>effector</i> (EseI)
PBm1G	BPBAT Mandiangin, Kalimantan Selatan	T3SS (EsrC), T6SS (EvpC), <i>Urease Enzyme</i> (Ure), T3SS <i>effector</i> (EseI), T3SS <i>effector</i> dan <i>Chaperone</i> (EscD)

### 6.2.2 Preparasi Sel Utuh dan ECP dari *E. ictaluri*

Preparasi mengacu pada metode Rogge dan Thune (2011) yaitu *E. ictaluri* dikultur pada media *brain heart infusion broth* (BHIB; Oxoid Ltd, UK) pada suhu 28 °C selama 36 jam Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 g suhu 4 °C selama 30 menit. Supernatan dan sel utuh yang diperoleh kemudian disaring dengan menggunakan filter paper 0.22 µm.

### 6.2.3 Pengukuran Konsentrasi Protein

Protein secara umum diukur menggunakan metoda Bradford (1976). Sebanyak 100 µL sampel ditambah dengan 1 mL pereaksi Bradford kemudian dihomogenasi dengan vortex dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm. Pereaksi Bradford berasal dari larutan stok yakni: 100 mL etanol 95%, 200 mL *phosphoric acid* 88% dan 350 mg Serva Blue G. Sebanyak 30 mL larutan stok ditambah 425 mL akuades, 15 mL etanol 95% dan 30 mL *phosphoric acid* 88%. Campuran tersebut diencerkan dua kali sebelum digunakan untuk analisis protein. Konsentrasi protein contoh dihitung berdasarkan kurva standar yang dibuat dari *bovine serum albumin* (BSA; Sigma-Aldrich, US). Khusus pada tahap pemurnian, protein dimonitor dengan cara mengukur serapan pada panjang gelombang 280 nm.

### 6.2.4 Analisis SDS-PAGE Protein Sel Utuh dan ECP

Elektroforesis mengikuti metode Laemmli (1970) dengan tahapan persiapan gel pemisah (10%): 3.34 mL larutan A [30% (b/v) akrilamid dan 0.8% (b/v) bis-akrilamid], 2.5 mL larutan B (1.5 M Tris-Cl pH 8.8; 0.4% SDS)

ditambah 50  $\mu\text{L}$  APS 10% dan 5  $\mu\text{L}$  TEMED dituangkan ke dalam cetakan gel. *Stacking* gel (5%): 0.67 mL larutan C (1 M Tris-Cl pH 6.8 dan 0.4% SDS), 2.3 mL akuades, 30  $\mu\text{L}$  APS 10% dan 5  $\mu\text{L}$  TEMED dituang di atas gel pemisah yang sudah beku kemudian dipasang sisir serta ditunggu hingga gel beku sempurna. Bufer elektroforesis berisi Tris 25 mM, glisin 192 mM, dan SDS 0.1%. Bufer diatur pada pH 8.3.

Pemisahan protein dilakukan dengan cara protein sampel (20  $\mu\text{L}$ ) dicampur dengan 5  $\mu\text{L}$  bufer sampel (60 mM Tris-Cl pH 6.8 25% gliserol; 2% SDS; 14.4 mM 2-merkaptotanol dan 0.1% bromfenol biru), dididihkan selama 2-3 menit dan dimasukkan ke dalam gel. Protein dipisahkan dengan memberikan aliran listrik (125 mA dan 150 V). Gel kemudian diwarnai dengan perak nitrat.

Tahapan pewarnaan dengan perak nitrat selanjutnya gel diangkat, direndam selama 30 menit di dalam larutan berisi 50% metanol dan 10% asam asetat kemudian dicuci selama 30 menit di dalam larutan berisi metanol 5% dan asam asetat 7%. Kemudian gel direndam di dalam 10% glutaraldehid selama 30 menit dan dibilas dengan akuades selama 1-2 jam (diganti setiap 30 menit). Selanjutnya gel direndam dalam larutan dithiothreitol (5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) selama 30 menit, larutan dibuang dan diganti dengan larutan perak nitrat 0.1%. Gel kemudian dibilas dengan sedikit akuades, dibilas dua kali dengan sedikit larutan developer (50  $\mu\text{L}$  formaldehid 37% di dalam sodium karbonat). Tahap akhir, gel direndam dalam larutan developer hingga pita protein dapat diamati dengan baik dan reaksinya segera dihentikan dengan mencuci gel di dalam larutan asam sitrat 2.3 M.

### 6.2.5 Pengujian Toksisitas Sel Utuh dan ECP pada Ikan Patin

Ikan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah ikan patin ukuran  $12 \pm 1.82$  cm dan berat  $19.4 \pm 2.6$  g yang berasal dari pembudidaya patin daerah Sukamandi, Jawa Barat. Ikan diaklimatisasi selama dua minggu pada kolam beton volume 1.000 L. Selanjutnya 420 ekor ikan diinjeksikan sel utuh dan ECP *E. ictaluri* secara intraperitoneal dengan dosis 0.1 mL ikan<sup>-1</sup> sesuai perlakuan pada Tabel 10 dan diamati selama 14 hari dalam wadah *container* plastik ukuran  $70 \times 48 \times 42.5$  cm<sup>3</sup> (volume 80 L) sebanyak 21 buah dengan padat tebar 20 ekor per akuarium.

Tabel 10 Perlakuan uji toksisitas

Kode	Perlakuan
A	Sel utuh <i>E. ictaluri</i> PjBH
B	Sel utuh <i>E. ictaluri</i> P
C	Sel utuh <i>E. ictaluri</i> PBm1G
D	ECP <i>E. ictaluri</i> PjBH
E	ECP <i>E. ictaluri</i> P
F	ECP <i>E. ictaluri</i> PBm1G
G	kontrol (BHIB)

Pakan yang digunakan dalam penelitian ini berupa pakan komersial Hi Pro Vite 781 dengan kandungan protein 31-33%. Pemberian pakan dilakukan secara

satiasi tiga kali dalam sehari yaitu pukul 07.00, 12.00, dan 17.00 WIB. Penyiponan dan pergantian air dilakukan setiap pagi hari sebanyak 10 % dari total volume air per akuariumnya. Kualitas air dijaga mengacu pada SNI 01.6483.3: 2000, kisaran suhu 25 - 30 °C, DO > 4 mg L<sup>-1</sup>, pH 5.5-8.5, amoniak < 0.02 mg L<sup>-1</sup>, dan nitrit < 1 mg L<sup>-1</sup>. Parameter pengamatan meliputi gejala klinis, patologi anatomi, kematian dan histopatologi. Pengambilan sampel untuk uji histopatologi dilakukan pada 24, 48, dan 72 jam pascainjeksi. Pewarnaan preparat uji histopatologi menggunakan *haematoxillin eosin* (HE).

#### 6.2.5.1 Kematian

Penghitungan jumlah kematian ikan dihitung menggunakan rumus:

$$M (\%) = \frac{N_0 - N_t}{N_0} \times 100$$

Keterangan:

M: Mortalitas (%); N<sub>0</sub>: Jumlah ikan yang hidup pada awal pengamatan (ekor)

N<sub>t</sub>: Jumlah ikan yang hidup pada akhir pengamatan (ekor)

#### 6.2.5.2 Gejala Klinis

Pengamatan gejala klinis meliputi tingkah laku pola berenang dan patologi anatomi makroskopik internal tubuh (kondisi permukaan tubuh, kondisi mata dan warna tubuh).

#### 6.2.6 Analisis Data

Data *SDS-PAGE* dianalisis menggunakan program *Microsoft excel* 2013 secara deskriptif kuantitatif. Gejala klinis dan histopatologi dianalisis secara deskriptif sedangkan pengaruh perlakuan dianalisis dengan sidik ragam (ANOVA) dengan bantuan *Software SPSS* Versi 22.

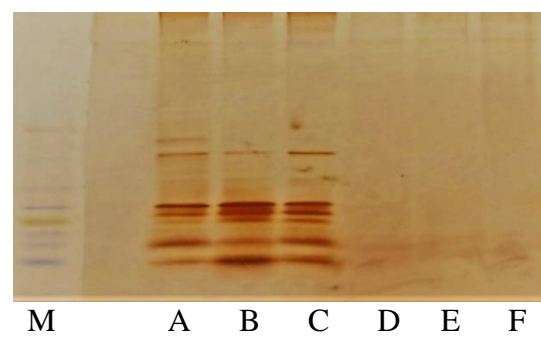
### 6.3 Hasil dan Pembahasan

Nilai konsentrasi protein sel utuh dari tiga isolat bakteri *E. ictaluri* yang digunakan berada pada kisaran 0.2510-0.3855 mg mL<sup>-1</sup>, sedangkan untuk ECP berkisar 0.2045-0.2198 mg mL<sup>-1</sup>, hal ini dapat dilihat pada Tabel 11. Secara umum konsentrasi protein pada sel utuh lebih tinggi dari ECP, hal ini didukung profil protein yang terdeteksi dari hasil *SDS-PAGE*. Sel utuh mengandung berbagai jenis protein yang lebih banyak dari ECP pada bakteri *E. ictaluri*.

Tabel 11 Konsentrasi protein sel utuh dan ECP bakteri *E. ictaluri*

Kode bakteri	Berat protein total (mg/mL)	
	Sel utuh	ECP
PJbH	0.2510	0.2045
P	0.2681	0.2063
PBm1G	0.3855	0.2198

Karakteristik 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 (Gambar 22).



Gambar 22 Hasil SDS-PAGE protein bakteri *E. ictaluri*. (M) Marker (A) sel utuh isolat PJbH (B) sel utuh isolat P (C) sel utuh isolat PBm1G (D) ECP isolat PJbH (E) ECP isolat P (F) ECP isolat PBm1G

Secara umum profil protein ketiga isolat memiliki 10 protein dengan ukuran sama yaitu 11.18; 14.30; 20.70; 23.42; 26.50; 38.36; 43.39; 49.08; 55.53; dan 71.06 (Tabel 12).

Tabel 12 Berat molekul protein bakteri *E. ictaluri*

Berat Molekul (kDa)	Sel Utuh			ECP			Protein
	A PJbH	B P	C PBm1G	D PJbH	E P	F PBm1G	
140.00	+	-	-	-	-	-	BK
123.76	+	-	-	-	-	-	BK
109.40	+	-	-	-	-	-	BK
90.93	+	-	-	-	-	-	AcnB
71.06	+	+	+	-	-	-	OMPs
55.53	+	+	+	-	-	-	T6SS/ EvpB
49.08	+	+	+	-	-	-	Pentapeptide repeat family
43.39	+	+	+	-	-	-	Ppd
38.36	+	+	+	-	-	-	RibD
26.50	+	+	+	-	-	-	OMPs
23.42	+	+	+	-	-	-	LomR
20.70	+	+	+	-	-	-	T3SS (EseD)
14.30	+	+	+	+	+	+	BK
11.18	+	+	+	+	+	+	BK

Keterangan: (+) = ada, (-) = tidak ada, BK= belum diketahui, AcnB = *aconitate hydratase protein*, OMPs = *outer membrane protein sel*, T6SS = *type VI secretion system*, Ppd = *phosphonopyruvat decarboxylase*, RibD = *riboflavin biosynthesis protein*, LomR = *opacity family porin*, T3SS = *type III secretion system*.

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.



Ada dua jenis protein yang diduga bersifat antigenik yaitu 38.36 dan 71.06 kDa seperti yang ditemukan oleh Pananggala *et al.* (2006) yang mendeteksi protein sel utuh *E. ictaluri* berukuran 12,18, 30, 37, dan 70 kDa di mana protein 37 dan 70 kDa yang bersifat antigenik. Baldwin *et al.* (1997) juga menemukan bahwa pada sel utuh *E. ictaluri* terdeteksi 14 pita protein di mana pita yang berukuran 37 dan 39 kDa terwarnai lebih kuat dan diduga bersifat antigenik. Protein utama berukuran 37, 43, dan 97 kDa dari sel utuh isolat bakteri *E. ictaluri* dari *channel catfish*, *Danio* dan *green knife fish* (GNF) (Lombb *et al.* 1993). Menurut Newton dan Triche (1993) protein dengan berat molekul 38 dan 42 kDa merupakan dua molekul protein flagella *E. ictaluri*. Newton *et al.* (1990) menentukan profil protein membran luar (OMP) dari 33 isolat *E. ictaluri* dengan menganalisis ekstrak OMP natrium *N-lauroil sakosinat* dengan elektroforesis gel poliakrilamida *natrium dodecyl sulfat* (SDS-PAGE) teridentifikasi sepuluh pita OMP. Satu pita OMP utama dengan berat molekul 35 kDa merupakan 60% dari total fraksi OMP. Fraksi OMP yang tersisa terdiri dari sembilan pita minor dengan massa molekul 71, 51, 46, 43.5, 38.5, 37.5, 31.5, 28.5, dan 19.5 kDa.

Sakai *et al.* (2018) melakukan analisa 2D-PAGE dan berhasil mengidentifikasi beberapa jenis protein yang identik mendekati dalam penelitian ini yaitu *aconitate hydratase protein* (AcnB) yang berukuran 92.811 kDa, *type VI secretion system protein* (EvpB) yang berukuran 54.423 kDa, *pentapeptide repeat family protein* yang berukuran 47.307 kDa, *phosphonopyruvat decarboxylase* (Ppd) yang berukuran 42.043, *riboflavin biosynthesis protein* (RibD) yang berukuran 40.434, *opacity family porin* (LomR) yang berukuran 22.46 dan *type III secretion system translocon component* (EseD) pada 20.70. Protein dengan ukuran 71.06 kDa dan 26.50 kDa merupakan jenis *outer membrane protein sel* (OMPs) sedangkan protein 140, 123.76, 109.40, 14.30 dan 11.18 kDa yang belum teridentifikasi dengan protein tertentu.

*Aconitate hydratase protein* (AcnB) merupakan protein *iron-sulfur* yang mengatalisasi isomerisasi sitrat dan isositrat yang reversibel melalui *cis-aconitate*. Sementara dalam mitokondria aconitase merupakan bagian dari siklus asam trikarboksilat (TCA), di dalam sitosol aconitase merupakan faktor trans-regulasi yang mengontrol homeostasis besi pada tingkat pasca transkripsi (Trujillo *et al.* 2010). Penelitian yang dilakukan Karsi *et al.* (2009) menunjukkan bahwa gen yang mengkode enzim siklus asam trikarboksilat (TCA), sistem pembelahan glisin, regulator sigmaE, sistem respons oksidatif SOx, dan efektor *type III secretion system* berperan penting untuk kelangsungan hidup *E. ictaluri* pada neutrofil. Protein AcnB yang dimiliki oleh *E. ictaluri* kemungkinan berperan untuk menghindar dari sistem pertahanan seluler inang melalui resistansi terhadap H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

*Protein Type III dan IV secretion system* merupakan protein yang disekresikan sebagai strategi bakteri untuk kelangsungan hidup dan replikasi dalam sel fagosit inang (Mohanty dan Sahoo 2007). Peran RibD sebagai enzim untuk jalur biosintetik riboflavin dalam patogenesis *E. ictaluri* belum diketahui namun hal ini penting dalam kelangsungan hidup bakteri *E. ictaluri* FPC109 sebagai faktor adhesi pada mukosa olfaktorius dan sel epitel ikan (Sakai *et al.* 2018). Menurut Fagan dan Smith (2007) bahwa protein porin (LomR) *Edwardsiella* memiliki kesamaan dengan faktor adhesi pada protein *outer membrane* Hek dari *E. coli* yang berkontribusi dalam infeksi pada inang.



Respons patologis terhadap infeksi dengan sel utuh pada ikan patin menunjukkan gejala klinis yaitu keputihan pada lensa mata (*ocular opacity*), lesi pada permukaan tubuh, lubang pada kepala, bengkak pada anus, ikan bernafas terengah-engah (*gaspings*), berenang tidak menentu (*erratic*), selanjutnya berenang spiral, dan akhirnya mengalami kematian (Gambar 23 dan 24). Gejala klinis yang timbul merupakan abnormalitas yang terjadi akibat infeksi bakteri *E. ictaluri*. Pada ikan patin yang diinjeksi dengan ECP tidak menunjukkan gejala klinis.



Gambar 23 Gejala klinis ikan patin yang diinjeksi dengan sel utuh *E. ictaluri* mengalami *ocular opacity* (A) lesi pada permukaan tubuh (B) lubang kepala (C) dan bengkak anus (D).



Gambar 24 Abnormalitas pola berenang ikan patin yang diinjeksi dengan sel utuh *E. ictaluri* mengalami kesulitan bernafas, berenang tidak menentu dan akhirnya mati.

Mortalitas tertinggi terjadi pada perlakuan sel utuh P dan PBm1G sebesar 97.78% dan 100% sedangkan pada PJBH menunjukkan kematian rendah sebesar 15.56%. Kematian akibat toksisitas sel utuh mulai terjadi setelah 48 jam pascainjeksi. Pada perlakuan ECP hanya mengalami kematian yang sangat rendah yaitu sebesar 6.67% pada perlakuan ikan patin yang diinjeksi dengan ECP isolat PJBH (Tabel 13).

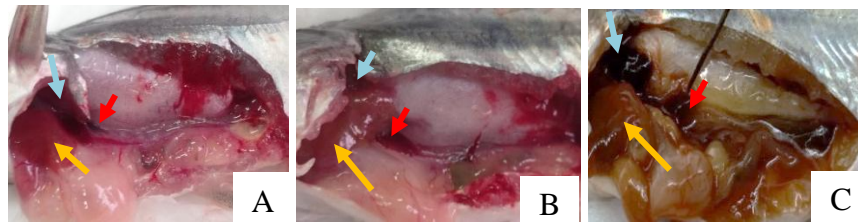
Tabel 13 Mortalitas ikan uji toksisitas sel utuh dan ECP *E. ictaluri*

Kode	Perlakuan	Mortalitas (%)
A	Sel utuh <i>E. ictaluri</i> PJBH	15.56 ± 2.96 <sup>b</sup>
B	Sel utuh <i>E. ictaluri</i> P	97.78 ± 2.96 <sup>a</sup>
C	Sel utuh <i>E. ictaluri</i> PBm1G	100.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
D	ECP <i>E. ictaluri</i> PJBH	6.67 ± 4.44 <sup>c</sup>
E	ECP <i>E. ictaluri</i> P	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>
F	ECP <i>E. ictaluri</i> PBm1G	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>
G	BHIB (kontrol)	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>

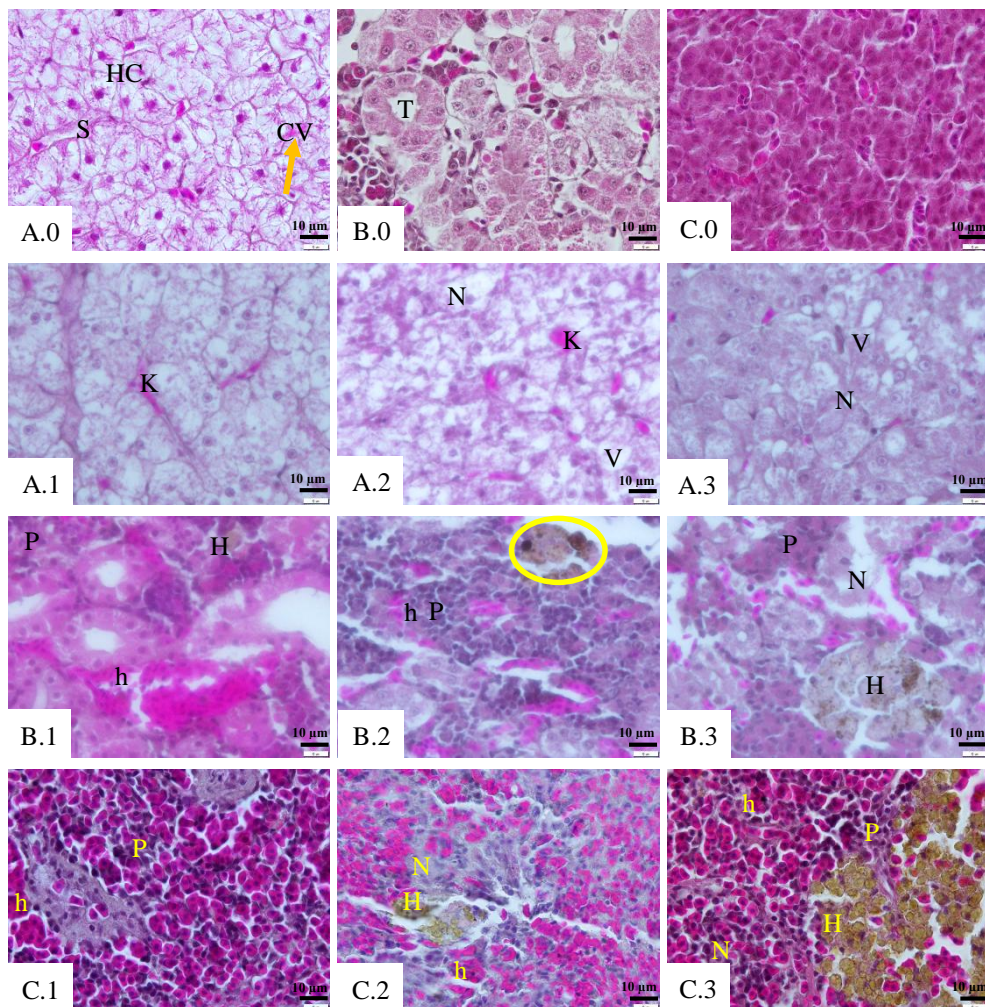
Angka-angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom yang sama berbeda nyata pada taraf uji (Duncan, p<0.05)

Patologi anatomi organ pada perlakuan sel utuh menunjukkan adanya akumulasi cairan yang bercampur darah pada rongga perut, pembengkakan hati, ginjal dan limpa sedangkan pada perlakuan ECP terlihat normal (Gambar 25). Pembengkakan pada hati, ginjal dan limpa tampak jelas teramati pada 48 jam pascainjeksi. Secara histopatologi pada perlakuan sel utuh menunjukkan kongesti,

vakuolisasi, dan nekrosis pada hati, peradangan, hemoragik, nekrosis, hemosideriosis, dan *melanomacrophage center* pada ginjal, peradangan, hemoragik, hemosiderosis, dan nekrosis pada limpa (Gambar 26).



Gambar 25 Patologi anatomi organ internal hati, ginjal, dan limpa pada uji toksisitas. A: kontrol, B: perlakuan ECP dan C: perlakuan sel utuh. Hati (panah kuning); ginjal (panah biru); limpa (panah merah)



Gambar 26 Histopatologi organ hati (A), ginjal (B) dan limpa (C) pascainjeksi sel utuh *E. ictaluri*. HC: sel hati, CV: vena centralis, S: sinusoid, T: tubuli K: kongesti, V: vakuolisasi, N: nekrosis, P: peradangan, H: hemosiderosis, h: hemoragik, *Melanomacrophage center* (lingkaran kuning). 0: kontrol, 1: 24 jam pascainjeksi, 2: 48 jam pascainjeksi, 3: 72 jam pascainjeksi. Pewarnaan HE.

Menurut Madigan *et al* (2016) bakteri Gram-negatif sebagian besar menghasilkan endotoksin yang merupakan polisakarida toksik bukan eksotoksin. Bakteri *E. ictaluri* menghasilkan produk ekstraseluler dalam jumlah kecil yang dapat larut pada bakteri yang sedang tumbuh sehingga pada perlakuan ECP menunjukkan tingkat kematian yang rendah bahkan tidak ada kematian. Sedangkan kematian ikan pada uji toksisitas tertinggi terjadi akibat material toksik endotoksin *E. ictaluri* yang ada pada sel utuh. Endotoksin *E. ictaluri* yang terakumulasi pada sel utuh pada dosis besar dapat menyebabkan syok haemorrhagik dan nekrosis aring. Pada penelitian ini perlakuan sel utuh berasal dari kultur bakteri sebesar  $10^{11}$  CFU mL<sup>-1</sup> dengan volume injeksi sebesar 0.1 mL yang merupakan dosis maksimal. Pasnik *et al.* (2007) menyatakan bahwa kematian ikan *white perch* terjadi sampai 100% pada infeksi *E. ictaluri*  $10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>. Efek patogenik *E. ictaluri* telah dilaporkan dapat menyebabkan kematian hingga 100% (Dahal *et al.* 2013).

Tingginya kematian pada kelompok perlakuan sel utuh disebabkan faktor virulen yang berperan dalam adhesi dan invasi bakteri *E. ictaluri* hanya ditemukan pada sel utuh. Soto *et al.* (2012) menyatakan bahwa ikan mempunyai kerentanan yang berbeda terhadap infeksi *E. ictaluri*. Ikan nila dapat mengalami kematian sampai 40% pada infeksi bakteri dengan konsentrasi  $10^3$  CFU mL<sup>-1</sup> dan pada ikan ayu kematian mencapai 50% jika diinfeksi  $10^4$  CFU mL<sup>-1</sup> (Sakai *et al.* 2018). Selain itu Suanyuk *et al.* (2014) melaporkan bahwa konsentrasi *E. ictaluri*  $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup> menimbulkan kematian 50% *catfish* hibrida. Pada penelitian ini terbukti bahwa komponen protein pada sel utuh terbukti berpengaruh pada patogenesis infeksi *E. ictaluri* dan tidak untuk komponen ECP, hal ini disebabkan komponen protein pada ECP tidak bersifat toksik dan inang mampu mengeliminasi melalui mekanisme pertahanan tubuh yang ada.

## 6.4 Simpulan

Sel utuh isolat *E. ictaluri* kode PjBH, P dan PBm1G memiliki *outer membrane protein* (OMP) dan *riboflavin biosynthesis protein* (RibD). Sel utuh *E. ictaluri* mengandung komponen faktor virulen yang berperan dalam mekanisme patogenesis infeksi ESC yang menyebabkan kematian tinggi pada ikan patin.

**VII EFIKASI VAKSIN MONOVALEN, BIVALEN, DAN POLIVALEN SEL UTUH *Edwardsiella ictaluri* UNTUK PENCEGAHAN PENYAKIT ENTERIC SEPTICEMIA OF CATFISH PADA IKAN PATIN (*Pangasianodon hypophthalmus*)**

**ABSTRAK**

Vaksinasi diharapkan sebagai salah satu upaya alternatif dalam pengendalian penyakit *Enteric septicemia of catfish* (ESC) pada industri budidaya patin. Karakteristik fenotipe dan genotipe isolat *E. ictaluri* berasal dari berbagai lokasi budidaya di Indonesia dapat menjadi dasar pertimbangan dalam penentuan formulasi vaksin potensial yang memberikan level proteksi optimal terhadap infeksi ESC. Penelitian ini bertujuan menentukan formula jenis vaksin yang mampu memberikan proteksi terbaik terhadap infeksi ESC serta menganalisis sinergitas dan kompetensi berbagai antigen dalam menginduksi imunitas pada ikan patin. Ikan patin divaksinasi dengan vaksin inaktif monovalen, bivalen, dan polivalen bakterin *E. ictaluri* secara intraperitoneal sebanyak 0.1 mL ikan<sup>-1</sup>. Evaluasi parameter keberhasilan vaksinasi meliputi titer antibodi dengan *indirect ELISA*, aktivitas fagositosis, aktivitas lisozim, *respiratory burst* dengan uji *nitro blue tetrazolium* (NBT), diferensial leukosit, *relative percent survival* (RPS), dan *survival rate* (SR). 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. Vaksin monovalen, bivalen, dan polivalen *E. ictaluri* terbukti mampu meningkatkan respons imun spesifik dan non-spesifik setelah 21 hari pascavaksinasi dan pasca uji tantang yaitu peningkatan titer antibodi, aktivitas fagositosis, aktivitas lisozim, nilai NBT, dan jumlah limfosit dibanding kontrol. Vaksin polivalen *E. ictaluri* yang berasal dari bakterin PjBH, P, dan PBM1G memberikan level proteksi terbaik yaitu sebesar 61.02% dibanding vaksin monovalen dan bivalen terhadap multi-infeksi bakteri *E. ictaluri*.

**Kata kunci:** *Edwardsiella ictaluri*, patin (*P. hypophthalmus*), *relative percent survival*, vaksin

**ABSTRACT**

Vaccination is expected as an alternative effort in controlling enteric septicemia of catfish (ESC) disease in the catfish aquaculture industry. The diversity of phenotypic and genotypic characteristics of *E. ictaluri* isolates from various cultivation locations in Indonesia can be a basis for consideration in determining potential vaccine formulations that provide optimal levels of protection against ESC infection. This study aims to determine the type of vaccine formulation that is able to provide the best protection against ESC infection and to analyze the synergy and competence of various antigens in inducing immunity in catfish. The catfish were vaccinated with monovalent, bivalent, and polyvalent inactivated vaccines of *E. ictaluri* bacterin intraperitoneally as much as 0.1 mL fish<sup>-1</sup>. Evaluation of vaccination success parameters included antibody titers with indirect ELISA, phagocytic activity, lysozyme activity, respiratory burst with *nitro blue tetrazolium* (NBT) assay, differential leukocytes, relative percent survival (RPS),

and survival rate (SR). The whole cell monovalent, bivalent, and polyvalent vaccines *E. ictaluri* inactivated 0.3% formalin proved safe to use and did not cause side effects in catfish. The Monovalent, bivalent, and polyvalent vaccines of *E. ictaluri* were shown to be able to increase specific and non-specific immune responses after 21 days post-immune induction and post-challenge test, namely an increase in the antibody titer, phagocytic activity, lysozyme, respiratory burst, and lymphocyte count compared to controls. The *E. ictaluri* polyvalent vaccines derived from PjBH, P, and PBM1G antigen provided the best level of protection, which was 61.02% compared to monovalent and bivalent vaccines against multiple *E. ictaluri* bacterial infections.

**Key words:** catfish (*P. hypophthalmus*), *Edwardsiella ictaluri*, relative percent survival, vaccine

## 7.1 Pendahuluan

Wabah penyakit pada ikan dapat ditanggulangi dengan antibiotik melalui aplikasi pengobatan jangka pendek maupun panjang namun penggunaan antibiotik tersebut dapat menyebabkan implikasi dampak negatif, yaitu resistansi dan virulensi mikroba, transfer plasmid, residu antibiotik pada daging ikan, dan pencemaran lingkungan yang dapat menjadi masalah serius pada budidaya serta secara tidak langsung berpengaruh terhadap kesehatan manusia (Osman *et al.* 2009; Pereira *et al.* 2015). Vaksinasi merupakan salah satu upaya pencegahan melalui stimulasi sistem kekebalan ikan secara spesifik dan non-spesifik untuk menanggulangi penyakit pada budidaya ikan. Efektivitas vaksinasi terlihat dari menurunnya mortalitas ikan budidaya akibat infeksi patogen, menurunnya penggunaan antibiotik pada budidaya ikan, dan menurunnya resistansi beberapa jenis patogen terhadap antibiotik (Sun *et al.* 2014). Vaksinasi pada akuakultur telah berhasil mengurangi secara signifikan penggunaan antibiotik. Jenis vaksin yang sering digunakan dapat mengandung satu strain bakteri (monovalen) atau gabungan beberapa strain (polivalen).

Keragaman karakteristik fenotipe dan genotipe isolat *E. ictaluri* yang berasal dari berbagai lokasi budidaya di Indonesia menjadi pertimbangan dalam menentukan formula vaksin potensial yang mampu memberikan level proteksi optimal. Klesius dan Shoemaker (1997) melaporkan adanya beberapa varian genetik *E. ictaluri* dalam budidaya ikan *catfish* di Asia Tenggara. Sementara mayoritas isolat *E. ictaluri* dari ikan *catfish* yang sakit di Mississippi dan Alabama adalah homogen secara genetik dan antigenik. Isolat *E. ictaluri* dari spesies inang (yaitu *striped catfish*, tilapia, ikan zebra) dan wilayah geografis yang berbeda menunjukkan variasi genetik dan profil antigen (Griffin *et al.* 2016; Hawke *et al.* 2013; Rogge *et al.* 2013; Soto *et al.* 2012). Serangan penyakit ESC pada populasi ikan yang divaksinasi dapat dikaitkan dengan variasi antigenik dari isolat *E. ictaluri* yang berbeda di lokasi budidaya tersebut. Saat ini, tidak jelas apakah spesies ikan lain rentan terhadap infeksi *E. ictaluri* atau jika patogen tersebut beradaptasi dengan inang dan lingkungan baru dapat mengubah profil antigenik dan mempengaruhi program pengembangan vaksinasi yang efektif (Aarattuthodiyil *et al.* 2020).

Penanggulangan penyakit ESC akibat infeksi *E. ictaluri* dengan metode vaksinasi telah banyak dilakukan. Klesius dan Shoemaker (1997) menggunakan

vaksin yang berasal isolat *wild type E. ictaluri*, namun belum mampu memberikan perlindungan terhadap infeksi *E. ictaluri* yang heterolog. Pemberian vaksin LAV *E. ictaluri* meningkatkan respons imun, SR, dan RPS (Wang *et al.* 2016; Chatakondi *et al.* 2018). Zhu *et al.* (2019) menyatakan bahwa vaksin inaktif *E. ictaluri* dengan adjuvant APS, kitosan atau *polyinosinic-polycytidylic acid* (poli (I:C)) menunjukkan efikasi yang baik.

Penelitian tahap ini mengabungkan hasil penelitian tahap 1, 2, dan 3 yaitu pemilihan isolat kandidat vaksin berdasarkan pertimbangan jenis dan jumlah gen virulen, kekuatan aktivitas enzim  $\beta$ -hemolitik, *leucine*, dan *valine arylamidase* serta potensi sel utuh sebagai sediaan vaksin. Komposisi vaksin terdiri dari isolat PJBH, P, dan PBm1G dengan perbandingan 1:1:1 yang merupakan isolat yang mewakili karakter fenotipe dan genotipe tiga wilayah sentra budidaya patin yaitu Sumatera, Jawa, dan Kalimantan. Penelitian pada tahap ini bertujuan untuk memperoleh formula jenis vaksin yang mampu memberikan proteksi terbaik terhadap infeksi ESC pada patin serta menganalisis sinergitas dan kompetensi berbagai antigen dalam menginduksi imunitas pada ikan patin. Vaksin yang efektif harus memenuhi tiga syarat utama, yaitu: 1) bersifat imunogenik, 2) mampu menginduksi imunitas yang tepat, dan 3) stabil dalam penyimpanan. Perbedaan sifat antigenik yang beragam antar patogen sehingga diperlukan strategi formulasi vaksin yang tepat, baik dengan menggunakan vaksin monovalen, bivalen, dan polivalen.

## 7.2 Bahan dan Metode

### 7.2.1 Preparasi Vaksin

Vaksin yang digunakan dalam penelitian ini merupakan vaksin inaktif (*killed vaccine*) sel utuh bakteri *E. ictaluri* dengan mengacu pada metode Zhu *et al.* (2019). Isolat *E. ictaluri* yang digunakan adalah PJBH, P, dan PBm1G yang mewakili tiga wilayah budidaya patin yaitu Sumatera, Jawa, dan Kalimantan. *E. ictaluri* masing-masing dikultur pada media *brain heart infusion broth* (BHIB; Oxoid Ltd, UK) pada suhu 28 °C dan diinkubasi selama 36 jam. Selanjutnya *E. ictaluri* dipanen dan diinaktivasi menggunakan *formaldehyde* 0.3%. Hasil inaktivasi disentrifus pada 3000 g selama 30 menit, pelet sel bakteri dan supernatan dipisahkan, kemudian pelet dicuci sebanyak 3 kali, dan selanjutnya dilarutkan kembali dalam NaCl 0.85% sebanyak volume awal biakan bakteri.

### 7.2.2 Uji Kualitas dan Keamanan Sediaan Vaksin

Mengacu pada Gudding *et al.* (2014) dengan cara membiakkan vaksin dalam media kultur BHIA. Vaksin dinyatakan aman digunakan apabila pada media kultur tersebut tidak tumbuh bakteri *E. ictaluri*. Sifat protektif vaksin diketahui dengan melakukan uji tantang pada ikan uji yang diberi vaksin.

Uji keamanan vaksin menggunakan metode Woodland (2011) dengan melakukan studi overdosis, menginokulasi sel bakteri dari sediaan vaksin pada ikan patin secara *intraperitoneal* (IP) dengan dua kali dosis standar 0.1 mL ikan<sup>-1</sup> dan sebagai kontrol ikan diinjeksi dengan salin fisiologis. Setelah 14 hari pascainjeksi dilakukan reisolasi bakteri *E. ictaluri* dari ikan perlakuan untuk melihat koloni bakteri yang sama. Vaksin dikategorikan aman apabila hasil

reisolasi tidak diperoleh bakteri aktif isolat. Histopatologi untuk melihat dampak secara mikroskopis yang mungkin terjadi pascainjeksi sediaan vaksin ke ikan uji dilakukan dengan membuat sampel preparat organ antara lain hati, ginjal, limpa, usus dan otot daging. Pengambilan sampel dilakukan pada hari ke-15.

Uji kuantitatif untuk melihat residu kadar formalin yang terkandung dalam sediaan vaksin setelah inaktivasi dilakukan dengan menggunakan metode AOAC (1990). Penyerapan warna dilihat dengan alat spektrofotometer pada absorban 415 nm.

### 7.2.3 Vaksinasi, Uji Tantang, dan Sampling

Ikan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah ikan patin ukuran  $12 \pm 2.05$  cm dan berat  $20.4 \pm 3.12$  g yang berasal dari pembudidaya patin daerah Sukamandi, Jawa Barat. Ikan diaklimatisasi selama dua minggu pada kolam beton 1000 L. Selanjutnya 640 ekor ikan divaksinasi dengan komponen perlakuan tertera pada Tabel 14 dan pada hari ke-21 pascavaksinasi dilakukan ujiantang serta diamati hingga hari ke-35. Ujiantang menggunakan dosis  $LD_{50}$  dari masing-masing isolat PJBH, P, dan PBm1G yaitu sebesar  $4.42 \times 10^8$ ,  $5.04 \times 10^6$ , dan  $6.8 \times 10^5$  CFU dengan perbandingan 1:1:1. Pemeliharaan dilakukan dalam wadah plastik dengan ukuran  $70 \times 48 \times 42.5$  cm<sup>3</sup> (volume 80 L) sebanyak 32 buah dengan padat tebar 20 ekor per akuarium.

Tabel 14 Komponen perlakuan vaksin dan ujiantang

Perlakuan	Vaksin (CFU mL <sup>-1</sup> ikan <sup>-1</sup> )	Ujiantang
A	Vaksin monovalen PJBH/ $10^{10}$	Koinfeksi 1+2+3
B	Vaksin monovalen P/ $10^{10}$	Koinfeksi 1+2+3
C	Vaksin monovalen PBm1G / $10^{10}$	Koinfeksi 1+2+3
D	Vaksin bivalen PJBH dan P/ $10^{10}$	Koinfeksi 1+2+3
E	Vaksin bivalen PJBH dan PBm1G/ $10^{10}$	Koinfeksi 1+2+3
F	Vaksin bivalen P dan PBm1G/ $10^{10}$	Koinfeksi 1+2+3
G	Polivalen $10^{10}$	Koinfeksi 1+2+3
H	Kontrol (non vaksinasi)	Koinfeksi 1+2+3

Keterangan: 1= PJBH, 2= P, 3= PBm1G

Pakan yang digunakan dalam penelitian ini berupa pakan komersial Hi Pro Vite 781 dengan kandungan protein 31-33%. Pemberian pakan dilakukan secara satiasi tiga kali dalam sehari yaitu pukul 07.00, 12.00, dan 17.00 WIB. Penyiponan dan pergantian air dilakukan setiap pagi hari sebanyak 10 % dari total volume air per akuariumnya. Kualitas air dijaga mengacu pada SNI 01.6483.3: 2000, kisaran suhu 25 - 30 °C, DO > 4 mg L<sup>-1</sup>, pH 6 - 8, amoniak < 0.02 mg L<sup>-1</sup>, dan nitrit < 1 mg L<sup>-1</sup>.

Sampling dilakukan pada hari ke-7, 14, 21, 28, dan 35. Parameter pengamatan meliputi titer antibodi (*indirect* ELISA), aktivitas fagositosis, aktivitas lisozim, uji *respiratory burst* (NBT Assay), diferensial leukosit, kelangsungan hidup, dan *relative percent survival* (RPS).



### 7.2.3.1 Titer Antibodi (*Indirect ELISA*)

Uji ELISA mengacu pada Griffin *et al.* (2015) diawali dengan persiapan antigen dari masing-masing isolat bakteri yang digunakan. Kultur bakteri pada media BHI broth dipanen pada fase log setelah diinkubasi pada suhu 28 °C selama 36 jam. Selanjutnya bakteri disentrifus dan dicuci setelah itu disonikasi (20 detik, amplitudo 60, diulang sebanyak 7 kali) di atas es. Sediaan *crude* disentrifus 10.000 g dan diambil supernatannya sebagai sediaan antigen *crude* bakteri. Sediaan antigen *crude* diencerkan dengan *borate buffer saline* (BBS) pH 8.4 selanjutnya dimasukkan ke dalam *microplate* 96 well dengan konsentrasi 1 µg mL<sup>-1</sup> dan diinkubasi pada suhu 4 °C. Sebanyak 100 µL antiserum dimasukkan ke dalam sumuran diinkubasikan pada suhu 4 °C selama (1 jam). Pada sumuran dilakukan *blocking*/saturasi dengan menambahkan PBS-Tween-20 (0.05%) dan 1% PBS, inkubasi dilakukan semalaman pada suhu 4 °C. Kemudian *microplate* dicuci sebanyak 3 kali dengan PBS-T. Antiserum terhadap *E. ictaluri* digunakan sebagai antibodi primer. Antibodi primer menggunakan pengenceran 1/6.000 dan diinkubasikan selama 1 jam pada 37 °C. Pencucian dilakukan sebanyak 3 kali dengan PBS-T. Penambahan anti *pangasius* IgM selama 2 jam pada suhu kamar sebelum dicuci kembali sebanyak 3x dengan PBST. *Rabbit anti-mouse IgG* yang telah dikonjugasikan dengan HRP (*horse radish peroxidase*) dengan pengenceran 1/6.000 masing-masing ditambahkan sebanyak 100 µL dan diinkubasikan selama 4 jam pada suhu kamar. Penambahan *substrat o-phenylenediamine dihydrochloride* (OPD) sebanyak 100 µL ke dalam sumuran selama 15-30 menit pada suhu ruang, dilanjutkan pemberian larutan pemberhenti reaksi 25 µL 3M HCl. Pembacaan nilai absorbansi dilakukan menggunakan ELISA reader (*Multiscan go, Thermo Scientific*) pada panjang gelombang 490 nm.

### 7.2.3.2 Uji Aktivitas Fagositosis

Aktivitas fagositosis dievaluasi menggunakan metode Zhang *et al.* (2008). Sebanyak 50 µL darah ikan uji dimasukkan ke dalam eppendorf, ditambahkan 50 µL suspensi *Staphylococcus aureus* dalam PBS (10<sup>7</sup> sel mL<sup>-1</sup>). Homogenisasi dan inkubasi dalam suhu ruang selama 20 menit, diambil 5 µL untuk preparat ulas, difiksasi dengan metanol selama 5 menit, direndam dengan Giemsa selama 15 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat diamati di bawah mikroskop. Persen fagositosis (PP) dan indeks fagositosis (IP) dihitung menggunakan rumus:

$$PP = (N_1/100) \times 100$$

$$IP = N_2/100$$

Keterangan:

N<sub>1</sub> : total jumlah fagosit yang memakan (*engulfing*) bakteri secara acak dari 100 fagosit yang terhitung.

N<sub>2</sub> : total jumlah bakteri yang dimakan oleh fagosit dari 100 fagosit yang terhitung.

### 7.2.3.3 Uji Aktivitas Lisozim

Uji aktivitas lisozim mengacu pada Ellis (1988) yaitu sebanyak 10  $\mu\text{L}$  plasma ditambahkan suspensi cair bakteri *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) sebanyak 190  $\mu\text{L}$  (0.02 g *M. lysodeikticus* ditambah 0.6 g  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$  dalam 100 mL akuades steril pada suhu 25 °C). Pembacaan dilakukan dengan *ELISA reader multiscan Go Thermo Scientific* pada panjang gelombang 530 nm setelah 30 detik dan 4.5 menit. Konsentrasi lisozim dihitung dengan rumus: Konsentrasi lisozim (UI/ml/menit) =  $[(\text{OD}_{30s} - \text{OD}_{4.5m}) \times 1000] \times (1/(t \times s))$

Keterangan:

1000 = konversi hasil absorbansi (OD) menjadi unit internasional (UI)

t = waktu (menit)

s = jumlah plasma (ml)

OD30s = pembacaan optikal densitas detik ke-30

OD4.5s = pembacaan optical densitas menit ke-4.5

### 7.2.3.4 Uji Respiratory Burst (NBT-assay)

Produksi oksigen radikal dari fagositosis dalam darah dapat dilihat dengan pewarnaan *nitro blue tetrazolium* (NBT). Sebanyak 50  $\mu\text{L}$  sampel darah dengan heparin diletakkan pada sumur mikrotiter diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37 °C kemudian dicuci dengan PBS dan ditambahkan 50  $\mu\text{L}$  0.2% NBT, suspensi NBT- sel darah diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. Setelah itu dilakukan fiksasi dengan metanol 100% selama 2-3 menit dilanjutkan dengan metanol 30% sebanyak 3 kali. Setelah dikering anginkan, preparat ditambahkan 60  $\mu\text{L}$  *Kalium hydroxide* dan 70  $\mu\text{L}$  larutan *dimethylsulfoxide*. Analisis produksi radikal oksigen dengan menggunakan NBT (*nitroblue tetrazolium*) dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm (Anderson dan Siwicki 1995).

### 7.2.3.5 Relative Percent Survival (RPS)

Tingkat kelangsungan hidup (*survival rate*, SR) setelah uji tantang kemudian dihitung menjadi nilai *relative percent survival* (RPS) untuk melihat efektifitas vaksinasi dengan menggunakan rumus Gudding *et al.* (2014):

$$\text{RPS} = \left( 1 - \frac{\% \text{ kematian ikan yang divaksin}}{\% \text{ kematian ikan kontrol}} \right) \times 100$$

### 7.2.4 Analisis Data

Uji viabilitas, keamanan, dan uji formalin dianalisis secara deskriptif. Analisis data titer antibodi (*indirect ELISA*), aktivitas fagositosis, aktivitas lisozim, aktivitas *respiratory burst*, diferensial leukosit, SR, dan RPS dianalisis dengan analisa sidik ragam (ANOVA) menggunakan *software SPSS* versi 22. Analisis yang menunjukkan pengaruh nyata, dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf kepercayaan 95%.

### 7.3 Hasil dan Pembahasan

Uji viabilitas terhadap masing-masing sediaan vaksin monovalen, bivalen, maupun polivalen diperoleh hasil tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri pada media kultur hingga hari ke-4 pengamatan, hal tersebut menunjukkan bahwa proses inaktivasi efektif dan tidak ada kontaminasi mikroba selama proses pembuatan vaksin. Uji keamanan sediaan vaksin monovalen, bivalen, dan polivalen *E. ictaluri* dengan dosis ganda menunjukkan tidak terjadi kematian 24 jam pascavaksinasi hingga 14 hari pengamatan. Perubahan secara fisiologis dan anatomis juga tidak ditemukan. Secara histopatologi pada organ hati, ginjal, insang, usus, dan limpa menunjukkan tidak ditemukan perubahan yang mengarah pada abnormalitas jaringan. Hal tersebut menandakan bahwa sediaan vaksin monovalen, bivalen, dan polivalen yang diberikan terbukti aman dan tidak menimbulkan efek samping.

Uji kadar formalin dilakukan berdasarkan metode AOAC (1990) menggunakan spektrofotometer dengan tingkat limit deteksi sebesar 0.0049 ppm. Berdasarkan hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa sediaan vaksin relatif aman untuk digunakan melalui injeksi secara intraperitoneal karena kelangsungan hidup pada berbagai kelompok perlakuan 100 % (Tabel 15).

Tabel 15 Kadar formalin sediaan vaksin *E. ictaluri* yang diinaktivasi dengan formalin 0.3%.

Kode	Sampel	Kadar Formalin (mg L <sup>-1</sup> )
A	Vaksin monovalen sel utuh PJbH	1.61±0.05
B	Vaksin monovalen sel utuh P	2.26±0.06
C	Vaksin monovalen sel utuh PBm1G	1.37±0.03
D	Vaksin bivalen sel utuh PJbH dan P	2.02±0.08
E	Vaksin bivalen sel utuh PJbH dan PBm1G	1.50±0.14
F	Vaksin bivalen sel utuh P dan PBm1G	1.06±0.03
G	Vaksin Polivalen sel utuh	1.45±0.08

Kadar residu formalin dari masing-masing perlakuan ikan patin yang divaksinasi dengan vaksin monovalen, bivalen, dan polivalen sel utuh *E. ictaluri* tidak terdeteksi dari daging urat ikan, kadar residu formalin pada daging ikan patin hal ini dapat dilihat pada Tabel 16.

Sebagian besar vaksin virus dan bakteri pada ikan yang tersedia diinaktivasi dengan formalin (Huang *et al.* 2008; Dumrongphol *et al.* 2008). Beberapa tahun terakhir formalin (formaldehida) diakui sebagai zat beracun yang seharusnya tidak terkandung dalam makanan manusia atau bahan lingkungan. Selain itu, formalin diakui sebagai zat yang tidak aman yang mempengaruhi respons imun sel inang untuk menginduksi respons IgM dan menurunkan antigenisitas bakteri (Bachmann *et al.* 1993; De Paola *et al.* 1995). Terlepas dari hal tersebut, Austin & Austin (1987) menyatakan penggunaan formalin dalam pembuatan vaksin lebih menguntungkan secara komersial dibandingkan zat kimia lain seperti kloroform, fenol, dan sodium hidoksida berdasarkan hasil penggunaannya dalam menginaktivasi *A. hydrophila*, *E. ictaluri*, *Pseudomonas piscicida*, *P. Anguilliseptica*, *Vibrio anguillarum*, dan *V. ordalii*. Formalin membunuh dengan cara mendehidrasi

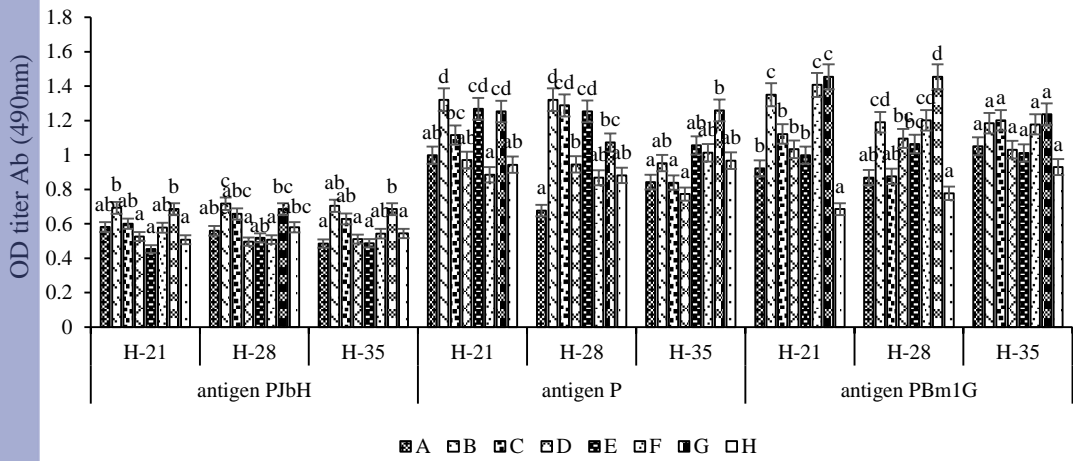
sel bakteri dan mengganti cairan dalam sel dengan komponen yang menyerupai gel. Penambahan formalin menyebabkan protoplasma menjadi kehilangan kelembaban sehingga sel pecah.

Tabel 16 Deteksi kadar residu formalin pada daging ikan patin yang divaksinasi vaksin monovalen, bivalen, dan polivalen *E. ictaluri* yang diinaktivasi formalin 0.3%.

Kode	Sampel ikan yang divaksin dengan	Kadar Formalin (mg kg <sup>-1</sup> )
A	Vaksin monovalen sel utuh PjBH	Tidak terdeteksi
B	Vaksin monovalen sel utuh P	Tidak terdeteksi
C	Vaksin monovalen sel utuh PBm1G	Tidak terdeteksi
D	Vaksin bivalen sel utuh PjBH dan P	Tidak terdeteksi
E	Vaksin bivalen sel utuh PjBH dan PBm1G	Tidak terdeteksi
F	Vaksin bivalen sel utuh P dan PBm1G	Tidak terdeteksi
G	Vaksin Polivalen sel utuh	Tidak terdeteksi
H	Salin 0.85% (kontrol)	Tidak terdeteksi

Vaksinasi merupakan salah satu upaya untuk melindungi tubuh ikan terhadap infeksi patogen tertentu. Pemberian vaksin diharapkan dapat merangsang respons imun spesifik dan non-spesifik pada ikan. Keberhasilan vaksinasi pada ikan dapat dilihat dari beberapa parameter pendukung antara lain titer antibodi, aktivitas fagositosis, aktivitas lisozim, *respiratory burst* (NBT assay), dan diferensial leukosit.

Titer antibodi ikan patin yang divaksin dengan vaksin monovalen, bivalen, dan polivalen menunjukkan nilai titer antibodi yang lebih tinggi dibanding dengan kontrol setelah ditantang dengan multi-infeksi *E. ictaluri* (Gambar 27). Nilai titer antibodi terhadap antigen bakteri *E. ictaluri* PjBH pada perlakuan vaksin polivalen menunjukkan berbeda nyata ( $P < 0.05$ ) pada hari ke-21 masa induksi vaksin dan hari ke-35 (14 hari pasca ujiantang).

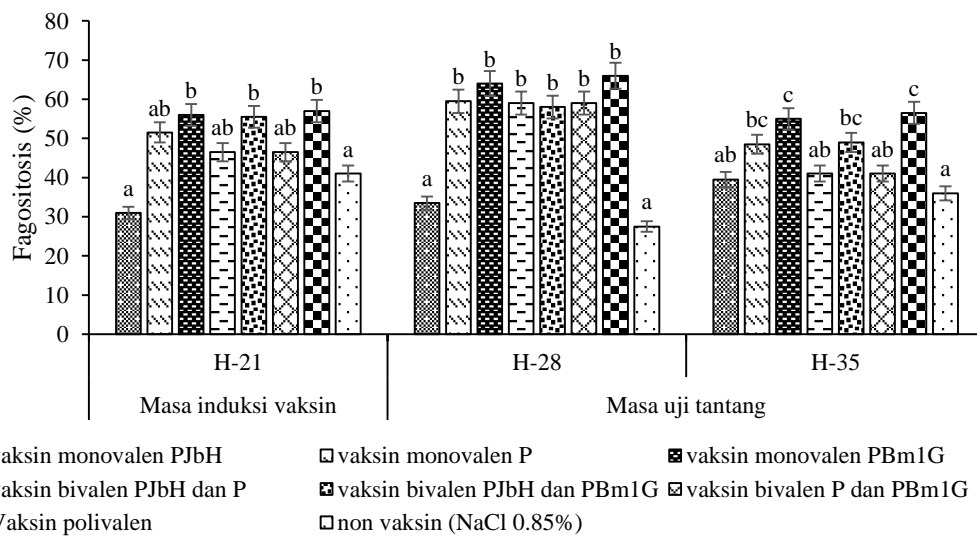


Gambar 27 Nilai titer antibodi serum ikan patin pascavaksinasi dan pasca ujiantang terhadap antigen *E. ictaluri* yang berbeda. Huruf yang berbeda di atas diagram batang dengan pola yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan berbeda nyata (Duncan,  $p < 0.05$ )

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.

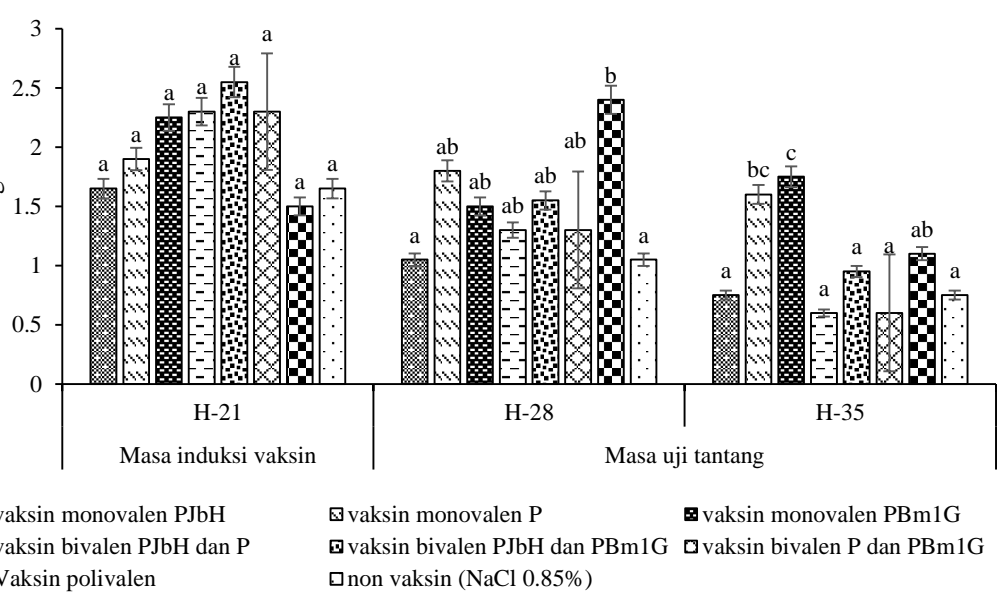
Nilai titer antibodi terhadap antigen bakteri *E. ictaluri* P pada perlakuan vaksin polivalen menunjukkan berbeda nyata ( $P < 0.05$ ) pada hari ke-35 (14 hari pasca ujiantang) sedangkan nilai titer antibodi terhadap antigen bakteri *E. ictaluri* PBM1G pada perlakuan vaksin polivalen menunjukkan berbeda nyata ( $P < 0.05$ ) pada hari ke-21 masa induksi vaksin dan hari ke-28 (7 hari pasca ujiantang). Keberhasilan vaksin polivalen dipengaruhi oleh konsentrasi antigen, reaksi silang, dan kompetisi di antara antigen yang berbeda. Antigen P dan PBM1G memiliki kemampuan afinitas ikatan Ab-Ag yang kuat dan kemampuan bereaksi silang terhadap antigen heterolog lebih baik dibanding antigen PjBH, hal tersebut ditunjukkan dengan nilai titer antibodi yang lebih tinggi pada berbagai sediaan vaksin *E. ictaluri*.

Aktivitas fagositosis diukur dari nilai persentase fagositosis dan indeks fagositik. Persen fagositosis adalah jumlah sel fagosit yang memfagosit bakteri dari 100 sel yang dihitung, sedangkan indeks fagositik adalah jumlah bakteri yang difagosit oleh sel fagosit. Hasil penelitian menunjukkan peningkatan persentase fagositosis setelah 3 minggu pascavaksinasi (Gambar 28 dan 29). Nilai persentase fagositosis pada perlakuan vaksin polivalen menunjukkan persentase yang lebih tinggi dibanding kelompok perlakuan lain dan kontrol ( $P < 0.05$ ). Hasil analisis indeks fagositik dari perlakuan vaksin monovalen, bivalen, dan polivalen berbeda nyata ( $P < 0.05$ ) dibanding dengan kontrol. Aktivitas fagositosis dari perlakuan vaksin polivalen *E. ictaluri* menunjukkan perbedaan nyata ( $P < 0.05$ ), hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian vaksin polivalen mampu meningkatkan kemampuan bakterisidal serum ikan terhadap invasi antigen vaksin.



Gambar 28 Persen fagositosis ikan patin pascavaksinasi dengan berbagai sediaan vaksin monovalen, bivalen, dan polivalen *E. ictaluri* yang diinaktivasi dengan formalin 0.3% dan pasca ujiantang dengan multi-infeksi *E. ictaluri*. Huruf yang berbeda di atas diagram batang dengan pola yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan berbeda nyata (Duncan,  $p < 0.05$ )

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.



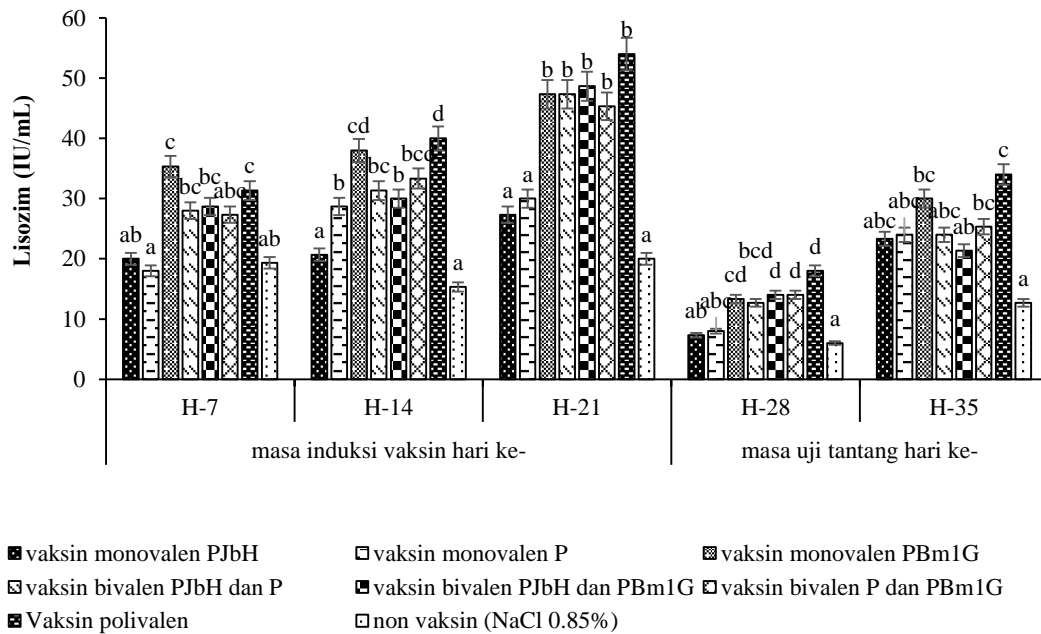
Gambar 29 Indeks fagositik ikan patin pascavaksinasi dengan berbagai sediaan vaksin monovalen, bivalen, dan polivalen *E. ictaluri* yang diinaktivasi dengan formalin 0.3% dan pasca uji tantang dengan multi-infeksi *E. ictaluri*. Huruf yang berbeda di atas diagram batang dengan pola yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan berbeda nyata (Duncan,  $p < 0.05$ )

Menurut Magnad'ottir (2006) pada ikan pertahanan terhadap patogen terutama bergantung pada sistem kekebalan tubuh bawaan yang terdiri dari tiga elemen utama termasuk barrier fisik, komponen humoral, dan seluler. Komponen humoral bawaan meliputi peptida antimikroba, lisozim, komplemen, transferin, pentraxin, lektin, antiprotease, dan antibodi alami, sedangkan peran utama komponen seluler bawaan adalah fagositosis. Aktivitas fagositosis sel-sel leukosit adalah mekanisme pertahanan primitif dan karakteristik penting dari sistem kekebalan bawaan (Whyte 2007). Oleh karena itu, sistem imun bawaan dan mekanisme pertahanan ikan dapat ditingkatkan dengan meningkatkan aktivitas fagositosis leukosit ikan.

Lisozim adalah protein bakterisida yang menghidrolisis ikatan 1.4 glikosidik dari peptidoglikan dinding sel bakteri yang mengakibatkan lisis sel. Li *et al.* (2018) menyatakan bahwa protein total adalah salah satu faktor terpenting dalam darah yang merupakan indikator kesehatan, stres, dan kesejahteraan pada organisme darat dan akuatik. Nilainya biasanya berubah pada kondisi fisiologis dan patologis yang berbeda. Lisozim terutama diproduksi oleh monosit dan granulosit, yang tidak hanya dapat menghancurkan dan menghilangkan agen patogen tetapi juga meningkatkan fungsi pencernaan makrofag dan meningkatkan kekebalan. Peningkatan protein total serum diduga berkorelasi dengan peningkatan protein seperti lisozim serum, komponen komplemen, protein fase akut, sitokin, lektin, dan peptida bakterisida (Zhu *et al.* 2019).

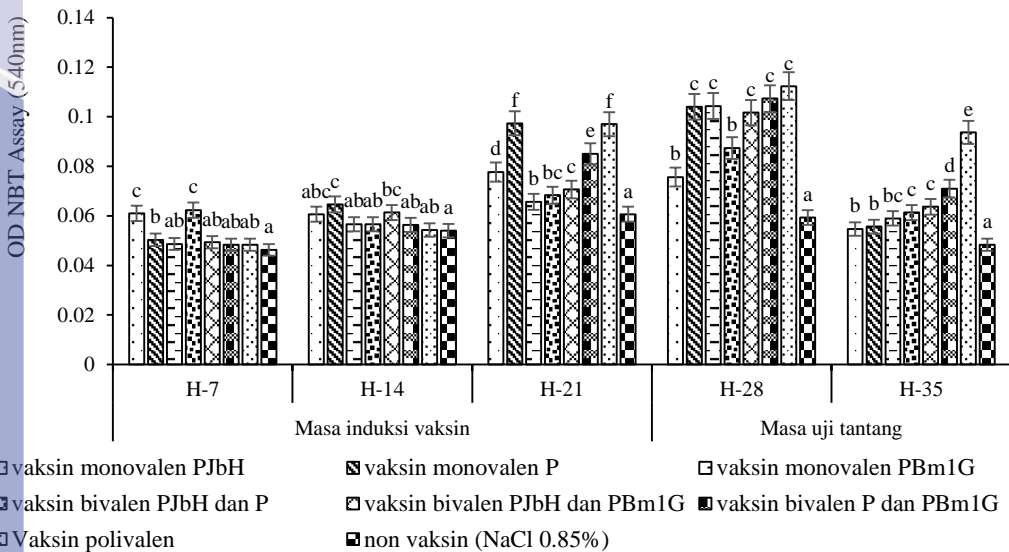
Aktivitas lisozim menunjukkan peningkatan pada hari ke-21 pascavaksinasi, penurunan pada hari ke-28 dan meningkat kembali pada hari ke-35 (Gambar 30). Menurut Sugiani *et al.* (2013) bahwa pemberian vaksin dapat mempengaruhi

respons imun, diduga adanya antibodi akan menginisiasi aksi berantai komplemen sehingga lisozim serum dapat masuk ke dalam lapisan peptidoglikan bakteri dan menyebabkan kematian sel. Perlakuan vaksin polivalen *E. ictaluri* menunjukkan nilai aktivitas lisozim yang lebih tinggi dan signifikan dibanding perlakuan vaksin monovalen, bivalen, dan kontrol ( $P < 0.05$ ).



Gambar 30 Aktivitas lisozim ikan patin pascavaksinasi dengan berbagai sediaan vaksin monovalen, bivalen, dan polivalen *E. ictaluri* yang diinaktivasi dengan formalin 0.3% dan pasca ujiantang dengan multi-infeksi *E. ictaluri*. Huruf yang berbeda di atas diagram batang dengan pola yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan berbeda nyata (Duncan,  $p < 0.05$ )

*Respiratory burst* disebut juga *oksidatif burst* memainkan peranan penting dalam sistem imun di mana merupakan peningkatan laju pengambilan  $O_2$  oleh fagosit teraktivasi (Sunatmo 2012). Hasil penelitian menunjukkan nilai *respiratory burst* belum menunjukkan peningkatan setelah 7 hari pascavaksinasi. Hasil serupa juga dilaporkan oleh Sukenda *et al* (2018) bahwa nilai *respiratory burst* pada ikan nila yang diberikan vaksin *whole-cell* dan LPS *A. hydrophila* belum menunjukkan peningkatan yang signifikan selama minggu pertama pascavaksinasi. Peningkatan nilai NBT terjadi secara signifikan hari ke-21 (3 minggu pascavaksinasi) dan hari ke-28 (7 hari pasca ujiantang) (Gambar 31) di mana masing-masing perlakuan vaksin menunjukkan nilai *optical density* (OD) yang berbeda nyata ( $P < 0.05$ ) dibanding pada perlakuan kontrol. Patin uji yang divaksinasi dengan vaksin polivalen *E. ictaluri* menunjukkan nilai NBT yang lebih tinggi dibanding perlakuan lain dan kontrol ketika masa induksi kekebalan maupun setelah ujiantang. Peningkatan NBT terjadi pada hari ke-28 (7 hari pasca ujiantang) dan kembali mengalami penurunan pada hari ke-35 (14 hari pasca ujiantang) hal tersebut menunjukkan bahwa respons imun non-spesifik terbentuk dalam waktu cepat untuk meningkatkan kemampuan sel fagosit dalam melawan antigen.



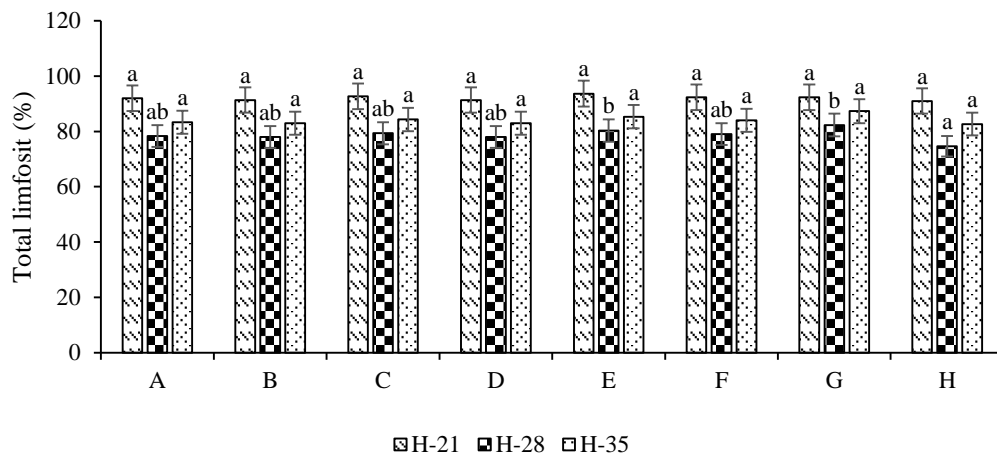
Gambar 31 NBT Assay ikan patin pascavaksinasi dengan berbagai sediaan vaksin monovalen, bivalen, dan polivalen *E. ictaluri* yang dinaktivasi dengan formalin 0.3% dan pasca uji tantang dengan multi-infeksi *E. ictaluri*. Huruf yang berbeda di atas diagram batang dengan pola yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan berbeda nyata (Duncan,  $p < 0.05$ )

Nilai NBT semakin tinggi menunjukkan bahwa produksi radikal oksigen bebas pada aktivitas *respiratory burst* semakin besar. Produksi radikal bebas ini digunakan untuk melawan patogen. Ikan mempunyai mekanisme membunuh sel-sel fagosit melalui oksigen bebas dalam vakuola lisosom yang mampu meningkatkan permeabilitas sel bakteri sehingga bisa menyebabkan masuknya substansi dan cairan dalam sel bakteri yang dapat menyebabkan plasmolisis. Radikal oksigen toksik ini dengan cepat dikonversi menjadi hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) yang memiliki sifat bakterisidal yang kuat. Karakter radikal oksigen yang bersifat toksik terhadap patogen ini diduga pula dikonversi menjadi radikal hidroksi ( $OH\cdot$ ) yang memiliki kemampuan mendegradasi membran lipid antigen. Penurunan aktivitas NBT mengindikasikan adanya kontaminan dan infeksi yang kronis atau ikan sedang dalam kondisi stres. Peningkatan NBT dapat mengindikasikan bahwa perlakuan penyuntikan vaksin telah efektif merangsang sistem kekebalan tubuh ikan (Anderson 2004).

Persentase total limfosit pada perlakuan vaksin monovalen, bivalen, maupun polivalen pasca uji tantang dengan bakteri *E. ictaluri* menunjukkan nilai yang berbeda nyata ( $P < 0.05$ ) dengan kontrol (Gambar 32). Persentase limfosit mengalami penurunan pada hari ke-28 dan meningkat kembali pada hari ke-35, hal tersebut menandakan bahwa pemberian vaksin dapat meningkatkan jumlah limfosit untuk menghasilkan antibodi. Vaksin polivalen mampu menginduksi peningkatan nilai limfosit pasca uji tantang lebih tinggi dibanding vaksin monovalen, bivalen, dan kontrol. Proporsi komponen sel darah putih yaitu limfosit, monosit, dan neutrofil merupakan indikator respons imun non-spesifik. Limfosit tidak bersifat fagositik namun memegang peranan penting dalam pembentukan antibodi. Kekurangan jumlah limfosit dapat menurunkan konsentrasi antibodi dan menyebabkan meningkatnya serangan penyakit.

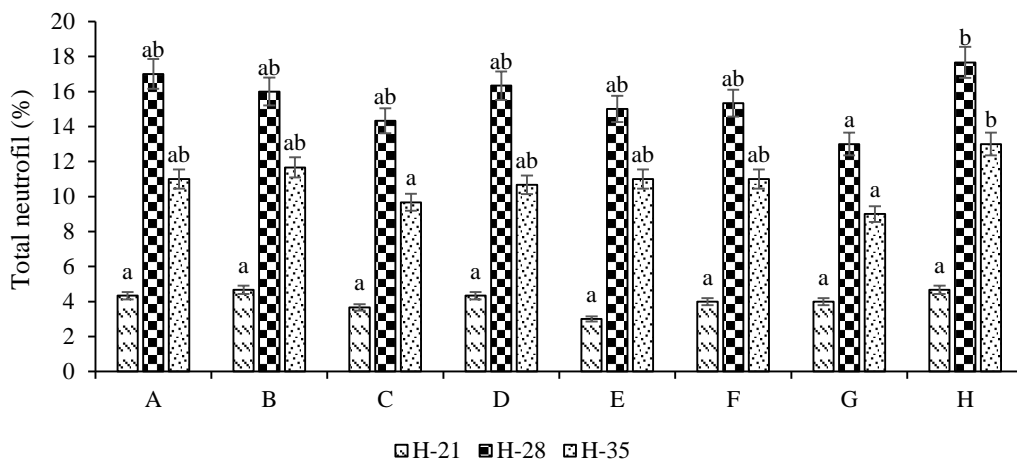
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang  
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :  
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah  
b. Pengutipan 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.



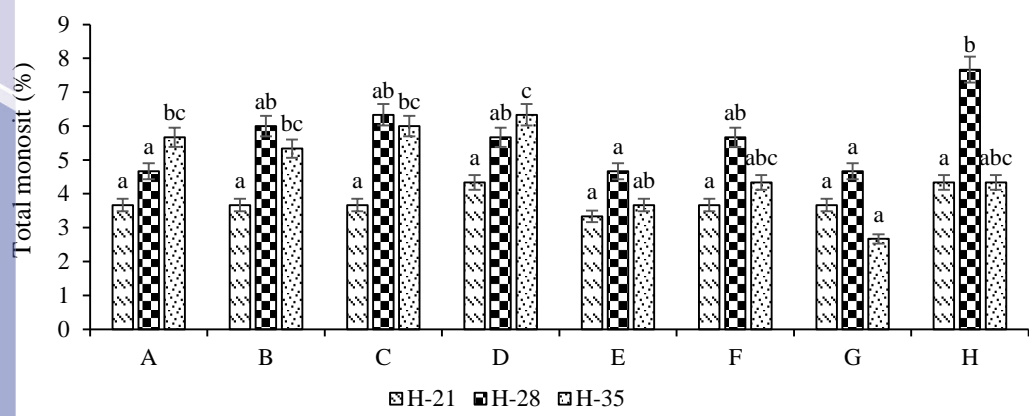


Gambar 32 Persentase total limfosit ikan patin pascavaksinasi dengan berbagai sediaan vaksin monovalen, bivalen, dan polivalen *E. ictaluri* yang diinaktivasi dengan formalin 0.3% dan pasca ujiantang dengan multiinfeksi *E. ictaluri*. Huruf yang berbeda di atas diagram batang dengan pola yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan berbeda nyata (Duncan,  $p < 0.05$ )

Neutrofil berperan pada aktivitas fagositik dan sitotoksik, bermigrasi ke tempat inflamasi dan infeksi atas pengaruh faktor kemotaktik. Peran utama neutrofil adalah sebagai pertahanan awal imun non-spesifik terhadap infeksi bakteri *E. ictaluri*. *Edwardsiella ictaluri* adalah tipe bakteri yang menghasilkan produk ekstraselular berupa endotoksin, dimana toksin yang dihasilkan akan dinetralkan dan dieliminasi oleh sel fagosit yaitu neutrofil, monosit, dan makrofag. Neutrofil dan monosit mengalami peningkatan hari ke-28 pasca ujiantang berbeda nyata dibanding kontrol ( $P < 0.05$ ) (Gambar 33 dan 34).



Gambar 33 Persentase total neutrofil ikan patin pascavaksinasi dengan berbagai sediaan vaksin monovalen, bivalen, dan polivalen *E. ictaluri* yang diinaktivasi dengan formalin 0.3% dan pasca ujiantang dengan multiinfeksi *E. ictaluri*. Huruf yang berbeda di atas diagram batang dengan pola yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan berbeda nyata (Duncan,  $p < 0.05$ )



Gambar 34 Persentase total monosit ikan patin pascavaksinasi dengan berbagai sediaan vaksin monovalen, bivalen, dan polivalen *E. ictaluri* yang diinaktivasi dengan formalin 0.3% dan pasca uji tantang dengan multi-infeksi *E. ictaluri*. Huruf yang berbeda di atas diagram batang dengan pola yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan berbeda nyata (Duncan,  $p < 0.05$ )

Vaksin yang diberikan merupakan komponen bakteri yang telah diinaktivasi akan masuk ke dalam aliran darah dan dikenali sebagai antigen yang merangsang respons imun spesifik dan apabila terpapar dalam jangka lama maka akan membentuk memori. Menurut skinner *et al.* (2010) bahwa respons imun non-spesifik mengalami fluktuasi sesaat setelah invasi antigen dalam hitungan hari, sedangkan respons imun spesifik terbentuk dalam hitungan minggu. Kedua respons imun tersebut berperan penting dalam mekanisme tanggap kebal ikan terhadap serangan patogen.

Nilai SR dan RPS perlakuan vaksin monovalen, bivalen, dan polivalen setelah diuji tantang dengan multi-infeksi *E. ictaluri* terlihat pada Tabel 17. Vaksin monovalen *E. ictaluri* menunjukkan nilai RPS sebesar 37.29-47.46% lebih rendah dari vaksin bivalen dan polivalen.

Tabel 17 Tingkat SR dan RPS ikan patin pasca uji tantang bakteri *E. ictaluri*

Perlakuan	survival rate (SR)	relative percent survival (RPS)
A	38.33±4.41 <sup>b</sup>	37.29±4.48 <sup>b</sup>
B	48.33±1.67 <sup>cd</sup>	47.46±1.69 <sup>cd</sup>
C	45.00±2.89 <sup>bc</sup>	44.07±2.94 <sup>bc</sup>
D	53.33±1.67 <sup>d</sup>	52.54±1.69 <sup>d</sup>
E	53.33±1.67 <sup>d</sup>	52.54±1.69 <sup>d</sup>
F	53.33±1.67 <sup>d</sup>	52.54±1.69 <sup>d</sup>
G	61.67±1.67 <sup>e</sup>	61.02±1.69 <sup>e</sup>
H	1.67±1.67 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata pada taraf uji (Duncan,  $p < 0.05$ )

Vaksin monovalen *E. ictaluri* menunjukkan nilai RPS yang rendah dan berbeda nyata ( $P < 0.05$ ) dengan perlakuan vaksin lain setelah diuji tantang dengan multi-infeksi *E. ictaluri*, hal ini diduga disebabkan jumlah antibodi terhadap *E.*

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.

*ictaluri* yang terbentuk tidak cukup untuk mengantisipasi multi-infeksi *E. ictaluri*. Vaksin polivalen *E.ictaluri* menunjukkan nilai RPS terbaik terhadap multi-infeksi dibanding vaksin monovalen dan bivalen. Walaupun menurut Ellis (1988) vaksin dikatakan efektif apabila nilai RPS  $\geq 50\%$ , tingkat kematian pada kontrol paling sedikit 60%. Perlakuan vaksin polivalen dalam penelitian ini memberikan level proteksi terhadap multi-infeksi *E. ictaluri* dengan tingkat kelangsungan hidup tertinggi sebesar 61.67%.

Penelitian yang dilakukan oleh Abu-Elala *et al.* (2019) menunjukkan bahwa vaksin polivalen aplikasi injeksi memberikan memberikan proteksi melawan *Streptococcosis*, *Lactococcosis*, dan *Enterococcosis* pada ikan nila. Dalam penelitian ini diperoleh hasil bahwa vaksin monovalen *E. ictaluri* tidak memberikan proteksi silang sebaliknya vaksin polivalen mampu memberikan proteksi silang terhadap multi-infeksi lebih baik dari vaksin monovalen dan bivalen.

Faktor pendukung keberhasilan efikasi selama masa induksi dan setelah uji tantang dipengaruhi oleh kondisi lingkungan perairan yang sesuai untuk pertumbuhan ikan patin. Nilai kualitas air selama penelitian disajikan pada Tabel 18. Berdasarkan hasil pengamatan terhadap kualitas air media pemeliharaan ikan uji menunjukkan bahwa kisaran kualitas air media pemeliharaan dari tiga parameter yaitu suhu, pH dan DO tersebut sesuai untuk pemeliharaan ikan patin. Hal ini menunjukkan bahwa hasil penelitian yang diperoleh disebabkan adanya perbedaan perlakuan dan bukan merupakan pengaruh dari kualitas air.

**Tabel 18 Parameter kualitas air selama pemeliharaan ikan patin**

Parameter	Nilai ukur	Kualitas air (SNI)	Satuan
Suhu	28.70 – 29.00	25.00-33.00	°C
pH	6.45 – 6.83	6.00-8.00	
DO	4.98 – 5.17	3.00-7.00	ppm

## 7.4 Simpulan

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. Vaksin 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.



## VIII EFIKASI DAN PROTEKSI VAKSIN POLIVALEN INAKTIF SEL UTUH *Edwardsiella ictaluri* UNTUK PENCEGAHAN PENYAKIT *ENTERIC SEPTICEMIA OF CATFISH* PADA IKAN PATIN (*Pangasianodon hypophthalmus*)

### ABSTRAK

Strategi pengembangan vaksin polivalen yang potensial diharapkan memberi perlindungan terhadap variasi strain isolat *Edwardsiella ictaluri* yang heterolog. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efikasi dan proteksi vaksin polivalen inaktif sel utuh *E. ictaluri* dengan dan tanpa *booster* pada 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>. Keberhasilan vaksinasi diukur dari nilai parameter respons imun spesifik dan non-spesifik serta *relative percent survival* (RPS). Hasil pemeriksaan respons imun menunjukkan peningkatan yang lebih tinggi dari titer antibodi, aktivitas fagositosis, aktivitas lisozim, aktivitas *respiratory burst*, total limfosit, dan ekspresi gen MHC *class II* dan IL-1 $\beta$  pada perlakuan vaksin polivalen konsentrasi  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> dengan *booster* dibanding perlakuan  $10^9$  CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> dengan maupun tanpa *booster* dan kontrol. Vaksin polivalen sel utuh *E. ictaluri* konsentrasi  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> dengan *booster* terbukti mampu memberikan proteksi nilai RPS terbaik yaitu sebesar 90.47, 55, dan 60% sedangkan tanpa *booster* menunjukkan nilai RPS sebesar 61.90, 42.85, dan 44,64% ketika diuji tantang dengan isolat *E. ictaluri* patogen PjBH, P, dan PBm1G. Kesimpulannya, vaksin polivalen inaktif sel utuh konsentrasi  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> dengan *booster* mampu secara efektif meningkatkan respons imun dan memberikan proteksi terbaik pada ikan patin.

Kata kunci: *booster*, *Edwardsiella ictaluri*, gen imun, RPS, vaksin polivalen

### ABSTRACT

A potential polyvalent vaccine development strategies are expected to provide protection against a variety of heterologous isolate strains of *Edwardsiella ictaluri*. The aim of this study was to determine the effication and protection of the inactivated whole cell polyvalent vaccine of *E. ictaluri* with and without a booster in patin. The patin were vaccinated with the inactivated polyvalent bacterin *E. ictaluri* at concentrations of  $10^{10}$  and  $10^9$  CFU mL<sup>-1</sup> fish<sup>-1</sup>. The success of vaccination was evaluated by specific and non-specific immune response parameters and the value of relative percent survival (RPS). The results of the immune response examination showed an increase in antibody titer values, phagocytic activity, lysozyme, respiratory burst, and MHC class II and IL-1 $\beta$  gene expression in the  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> fish<sup>-1</sup> polyvalent vaccine treatment with a booster compared to  $10^9$  CFU mL<sup>-1</sup> fish<sup>-1</sup> treatment with or without booster and control. The polyvalent vaccine protection for *E. ictaluri* with a concentration of  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> fish<sup>-1</sup> with a booster showed RPS values of 90.47, 55, and 60%, while without a booster it showed RPS values of 61.90, 42.85, and 44.64% when challenged with pathogenic *E. ictaluri* PjBH, P, and PBm1G isolate respectively. In conclusion, the inactivated polyvalent vaccine of whole cell *E. ictaluri* with a concentration of

$10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> fish<sup>-1</sup> with a booster was able to effectively increase the immune response and provide the best protection in patin.

Key words: booster, *Edwardsiella ictaluri*, immune gene, polyvalent vaccine, RPS

## 8.1 Pendahuluan

Ikan patin, *P. hypophthalmus* merupakan salah satu komoditas utama industri akuakultur di dunia. *Pangasianodon hypophthalmus* adalah ikan omnivor dan telah dikenal karena rasanya yang lembut dan gurih, nilai gizi, ukurannya besar, pertumbuhan yang cepat, toleransi stress, dan bernilai investasi ekonomi tinggi (Chowdhury *et al.* 2020). Industri patin telah berkembang secara produksi dan perdagangan lebih dari 100 negara di seluruh dunia (Rathod *et al.* 2018).

Intensifikasi budidaya dengan manajemen budidaya yang kurang baik memicu terjadinya wabah penyakit *enteric septicemia of catfish* (ESC) oleh bakteri Gram-negatif *E. ictaluri* sebagai agen etiologi utama penyebab kematian pada budidaya ikan patin di dunia termasuk Indonesia dengan kerugian ekonomi yang besar (Crumlish *et al.* 2002; Petermen dan Posadas 2019; Purwaningsih *et al.* 2019; Triet *et al.* 2019). *Edwardsiella ictaluri* menjadi ancaman utama bagi industri budidaya *catfish* selama lebih dari empat dekade dengan ditemukan variasi isolat *E. ictaluri* yang berbeda yaitu sembilan genom sekuens dari tilapia serta dua genom sekuens dari nila merah hibrida (*Oreochromis* sp.) dan *stripped catfish* sakit (*P. hypophthalmus*) dari Asia Tenggara (Machimbirike *et al.* 2021).

Menurut Schar *et al.* (2020) peningkatan kasus penyakit akuatik mendorong penggunaan antibiotik yang menyebabkan resistansi antimikroba dan resiko pencemaran ekosistem. Penolakan pasar internasional terkait keamanan pangan akibat banyaknya penggunaan antibiotik dalam produksi *Pangasius* di Delta Mekong wilayah Vietnam dan kurangnya peraturan pembuangan cemaran antibiotik ke lingkungan menjadi masalah serius dalam budidaya (Andrieu *et al.* 2015). Vaksinasi merupakan salah satu upaya pencegahan yang efektif dan ramah lingkungan melalui stimulasi sistem kekebalan ikan secara spesifik dan non-spesifik untuk menanggulangi penyakit pada budidaya ikan di Indonesia. Efektifitas vaksinasi terlihat dari menurunnya mortalitas ikan budidaya akibat infeksi patogen, menurunnya penggunaan antibiotik pada budidaya ikan, dan menurunnya resistansi beberapa jenis patogen terhadap antibiotik (Sun *et al.* 2014).

Kendala penting dalam vaksinasi dilapangan adalah variasi genetik dan antigenik, di mana vaksinasi dengan vaksin yang berasal dari satu strain bakteri mungkin tidak memberikan perlindungan terhadap varian intraspesifik. Strategi pengembangan vaksin yang potensial memberi perlindungan secara periodik terhadap isolat yang heterolog menjadi pertimbangan dalam riset vaksin polivalen (Rao *et al.* 2020). Kontruksi vaksin polivalen harus mempertimbangkan empat faktor yaitu reaksi silang antigen, kompetisi antigen, waktu pematangan, dan penghilangan sifat antigenik yang akan mempengaruhi efektifitas, kemampuan menghasilkan respons imun, dan level antibodi. Formula vaksin polivalen harus dibuat dengan teliti karena masalah kompetisi antigen dapat muncul terutama ketika vaksin tersebut diaplikasikan melalui injeksi (Toranzo *et al.* 2009).

Penelitian tahap sebelumnya diperoleh hasil bahwa sediaan vaksin inaktif polivalen sel utuh merupakan sediaan terbaik yang mampu meningkatkan respons



imun spesifik dan non-spesifik secara signifikan dengan memberikan nilai RPS sebesar 61.02%. Selanjutnya penelitian tahap ini bertujuan untuk mengetahui efikasi dan proteksi vaksin polivalen sel utuh inaktif *E. ictaluri* dengan *booster* maupun tidak pada ikan patin. Vaksin yang paling umum digunakan dalam budidaya adalah vaksin inaktif karena terbukti secara empiris efektif pada ikan (Munang'andu *et al.* 2016). Strategi kunci dalam mengembangkan vaksin inaktif yang efektif adalah mengidentifikasi antigen/strain yang sesuai yang dapat menginduksi respons imun, protektif terhadap patogen, aman bagi lingkungan, dan layak secara ekonomi untuk ikan yang murah (Pulpipat *et al.* 2020). Vaksin inaktif menjadi solusi alternatif terhadap penggunaan vaksin *live* berbasis *genetically modified organism* (GMO) untuk ikan pada perairan umum yang sangat terbatas dan masih tidak diperbolehkan dalam akuakultur di seluruh dunia (Adam 2019; Ramírez-Paredes *et al.* 2019).

## 8.2 Bahan dan Metode

### 8.2.1 Preparasi Vaksin

Vaksin yang digunakan dalam penelitian ini merupakan vaksin inaktif (*killed vaccine*) sel utuh bakteri *E. ictaluri* dengan mengacu pada metode Zhu *et al.* (2019). Isolat *E. ictaluri* yang digunakan adalah PjBH, P, dan PBm1G yang mewakili tiga wilayah budidaya patin yaitu Sumatera, Jawa, dan Kalimantan. *E. ictaluri* masing-masing dikultur pada media *brain heart infusion broth* (BHIB; Oxoid Ltd, UK) pada suhu 28 °C dan diinkubasi selama 36 jam. Selanjutnya *E. ictaluri* dipanen dan diinaktivasi menggunakan *formaldehyde* 0.3%. Hasil inaktivasi disentrifus pada 3000 g selama 30 menit, pelet sel bakteri dan supernatan dipisahkan, kemudian pelet dicuci sebanyak 3 kali, dan selanjutnya dilarutkan kembali dalam NaCl 0.85% sebanyak volume awal biakan bakteri. Formulasi vaksin polivalen dengan komposisi 1:1:1.

### 8.2.2 Vaksinasi, Uji Tantang, dan Sampling

Ikan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah ikan patin ukuran  $12.3 \pm 1.75$  cm dan berat  $20.4 \pm 3.26$  g yang berasal dari pembudidaya patin daerah Sukamandi, Jawa Barat. Ikan diaklimatisasi selama dua minggu pada kolam beton 1.000 L. Sebanyak 3.000 ekor ikan divaksinasi sesuai komponen perlakuan Tabel 19 dan diperlihara menggunakan tiga kolam beton 1.000 L selanjutnya disebut sebagai perlakuan stok, selanjutnya pada hari ke-21 pascavaksinasi sebanyak 720 ekor diambil dari tiga perlakuan stok dan dilakukan ujiantang pertama dimana diamati hingga hari ke-35. Perlakuan *booster* dilakukan pada hari ke-42 pascavaksinasi pada perlakuan stok dan ujiantang ke-2 dilakukan pada hari ke-63 pemeliharaan dan diamati hingga hari ke-77.

Tabel 19 Komponen perlakuan vaksin dan ujiantang

Perlakuan	Vaksin (CFU mL <sup>-1</sup> ikan <sup>-1</sup> )	Ujiantang
A	Vaksin polivalen/ 10 <sup>10</sup>	1,2 dan 3
B	Vaksin polivalen/ 10 <sup>9</sup>	1,2 dan 3
K	Non vaksinasi/kontrol	1,2 dan 3

Keterangan: 1= PjBH, 2= P, 3= PBm1G

Ujiantang menggunakan dosis LD<sub>50</sub> dari masing-masing isolat PjBH, P, dan Pbm1G yaitu sebesar 4.42x10<sup>8</sup>, 5.04x10<sup>6</sup>, dan 6.8x10<sup>5</sup> CFU. Masing-masing ujiantang pertama dan kedua menggunakan wadah pemeliharaan berupa wadah *container* plastik ukuran 70x48x42.5 cm<sup>3</sup> (volume 80 L) sebanyak 36 buah dengan padat tebar 20 ekor per akuarium. Pakan yang digunakan dalam penelitian ini berupa pakan komersial Hi Pro Vite 781 dengan kandungan protein 31-33%. Pemberian pakan dilakukan secara satiasi tiga kali dalam sehari yaitu pukul 07.00, 12.00, dan 17.00 WIB. Penyiponan dan pergantian air dilakukan setiap pagi hari sebanyak 10 % dari total volume air per akuariumnya. Kualitas air dijaga mengacu pada SNI 01.6483.3: 2000, kisaran suhu 25 - 30 °C, DO > 4 mg L<sup>-1</sup>, pH 6 - 8, amoniak < 0.02 mg L<sup>-1</sup>, dan nitrit < 1 mg L<sup>-1</sup>.

Parameter pengamatan meliputi titer antibodi (*indirect* ELISA), aktivitas fagositosis, aktivitas lisozim, uji *respiratory burst* (NBT Assay), diferensial leukosit, kelangsungan hidup, dan *relative percent survival* (RPS) dengan metode sama seperti yang telah dijelaskan pada subbab 4.4 serta ekspresi gen imun,. Penentuan perlakuan terbaik berdasarkan indikator parameter utama yaitu RPS melalui skoring (Tabel 20) (Suhermanto 2019).

Tabel 20 Pembobotan skor berdasarkan nilai RPS

	Skor pembobotan nilai RPS									
RPS	90-100	80-89.99	70-79.99	60-69.99	50-59.99	40-49.99	30-39.99	20-29.99	10-19.99	0-9.99
Skor	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1

### 8.2.3 Ekspresi Gen Imun Terkait Respons Imunitas

Total RNA diisolasi dari sampel ginjal anterior dan limpa yang diambil pada hari ke-21 (pascavaksinasi), hari ke-22 (24 jam/ 1 hari pasca ujiantang) dan hari ke-24 (72 jam/ 3 hari pasca ujiantang) menggunakan reagen GENEzol (Geneaid, Taiwan), disimpan pada -80°C sebelum dilakukan analisis ekspresi gen mengikuti instruksi pabrik. Konsentrasi dan kemurnian RNA diukur menggunakan metode spektrofotometri pada 260 dan 280 nm. Sintesis cDNA dilakukan dari 100 ng L<sup>-1</sup> RNA menggunakan Revertra® Ace qPCR RT Mastermix dengan gDNA removalkit (Toyobo, Jepang) mengikuti prosedur manual. Ekspresi gen yang diukur adalah MHC *class* II dan IL-1β menggunakan *Quantitative real-time* PCR (qRT-PCR). Primer yang digunakan mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Sirimanapong *et al.* (2015) sebagaimana tertera pada Tabel 21.

Reaksi qPCR dilakukan dalam mesin Rotor-Gene 6000 (Corbett, USA) menggunakan 2x SensiFAST SYBR® NO-ROX (Bioline, UK) dari 50 ng L<sup>-1</sup> xcNA dalam volume total 20 µL. Reaksi terdiri dari 10 µL campuran enzim qPCR, 0.8 µL masing-masing primer qPCR (10 mMol), 4 µL cDNA, dan 14.4 µL air bebas nuklease. Program amplifikasi diatur pada 95 °C selama dua menit, dan 40 siklus 95 °C selama 10 detik, 60 °C selama 15 detik, dan 72 °C selama 10 detik. Tingkat ekspresi semua gen dianalisis menurut metode 2<sup>-ΔΔCT</sup> (Livak & Schmittgen, 2001) setelah dinormalisasi dengan gen β-aktin dan dibandingkan dengan kontrol PBS sebagai kalibrator ekspresi dengan rumus sebagai berikut:

$$\Delta\Delta Ct = Ct(\text{target}) - Ct(\beta\text{-aktin}) \text{ perlakuan} - (Ct(\text{target}) - Ct(\beta\text{-aktin kontrol}))$$

Tabel 21 Urutan primer yang digunakan dalam analisis respons imun dengan RT-qPCR pada ikan patin pascavaksinasi dengan vaksin polivalen *E. ictaluri* dan pasca ujiantang

Gen	Sekuen primer	Ukuran (bp)	Referensi
MHC II	F: GAGCTCAACTCAGCCAGT R: CACACCAGGAAGCTCCACAT	172	Sirimanapong <i>et al.</i> 2015
IL-1 $\beta$	F: CAGAGGCTGAAGCACACTCA R: CCTTGTCTCCTGCCTGCTGTAA	148	Sirimanapong <i>et al.</i> 2015
qACTB (B-aktin)	F: ACCGGAGTCCATCACAATACC AGT R: GAGCTGCGTGTGCCCCCTGAG	200 (cDNA) 500 (DNA)	Nasrullah <i>et al.</i> 2020

### 8.2.4 Analisis Data

Analisis data titer antibodi (*indirect* ELISA), aktivitas fagositosis, lisozim, aktivitas *respiratory burst*, diferensial leukosit, dan SR dianalisis dengan analisa sidik ragam (ANOVA) menggunakan *software* SPSS versi 22. Analisis yang menunjukkan pengaruh nyata, dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf kepercayaan 95%. Ekspresi gen dianalisis secara deskriptif, sedangkan RPS dengan skoring.

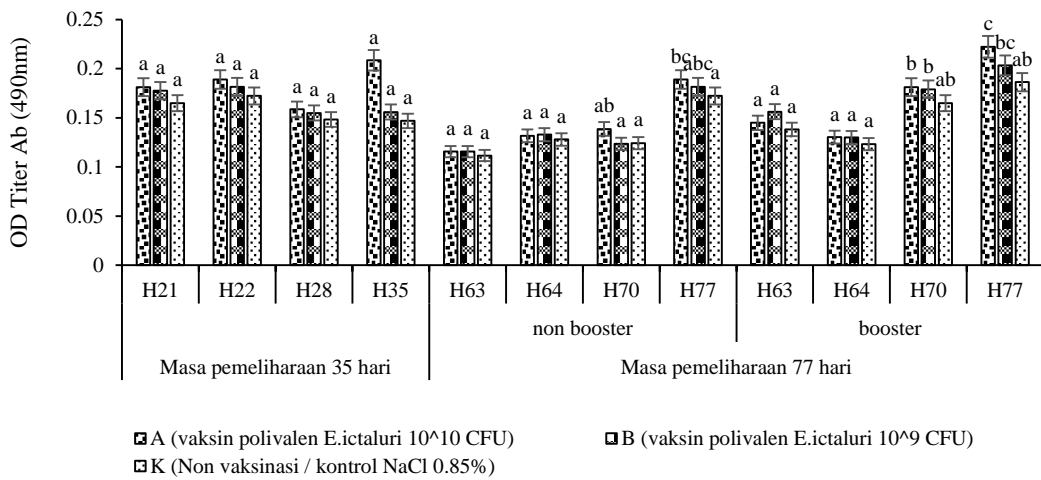
## 8.3 Hasil dan Pembahasan

Perbedaan genetik dan antigenik bakteri *E. ictaluri* yang berasal dari berbagai lokasi sentra budidaya patin di Indonesia menjadi alasan kuat dalam pengembangan vaksin polivalen yang diharapkan mampu memberi perlindungan terhadap serangan ESC pada budidaya patin. Evaluasi keberhasilan vaksinasi pada ikan dapat dilihat dari beberapa parameter respons imun yaitu titer antibodi, aktivitas fagositosis, aktivitas lisozim, *respiratory burst* (NBT assay), diferensial leukosit dan ekspresi gen imun serta nilai RPS.

Titer antibodi adalah parameter utama untuk mengevaluasi respons imun spesifik. Nilai titer antibodi ikan patin yang divaksin dengan vaksin polivalen  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> menunjukkan nilai titer antibodi yang berbeda nyata ( $P < 0.05$ ) dibanding dengan perlakuan vaksin polivalen  $10^9$  CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> dan kontrol hari ke-77 setelah ditantang dengan infeksi *E. ictaluri* (Gambar 35).

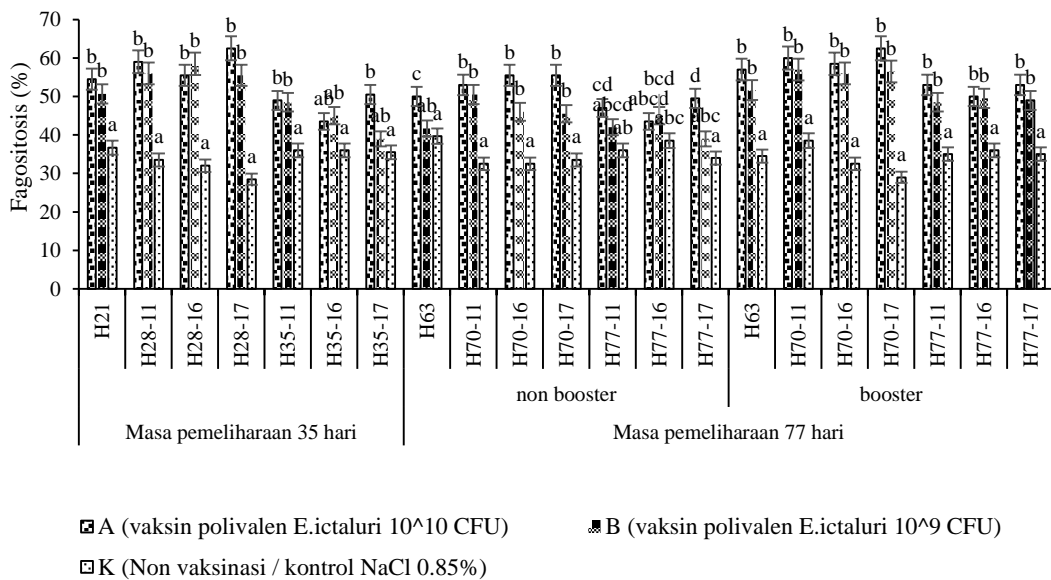
Perlakuan vaksin polivalen  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> dengan *booster* menghasilkan nilai titer antibodi lebih tinggi dibanding perlakuan *non-booster* pada hari ke-77. Vaksin polivalen inaktif *E. ictaluri* masuk ke dalam tubuh dikenali sebagai antigen yang akan merangsang terbentuknya antibodi dan akan memberi perlindungan jangka waktu tertentu terhadap infeksi ESC karena telah memiliki sel memori. Madigan *et al.* (2016) menyatakan paparan kedua terhadap antigen yang sama mengaktifkan klon sel reaktif antigen dan menghasilkan respons imun adaptif sekunder lebih cepat serta lebih kuat dan memuncak dalam beberapa hari.



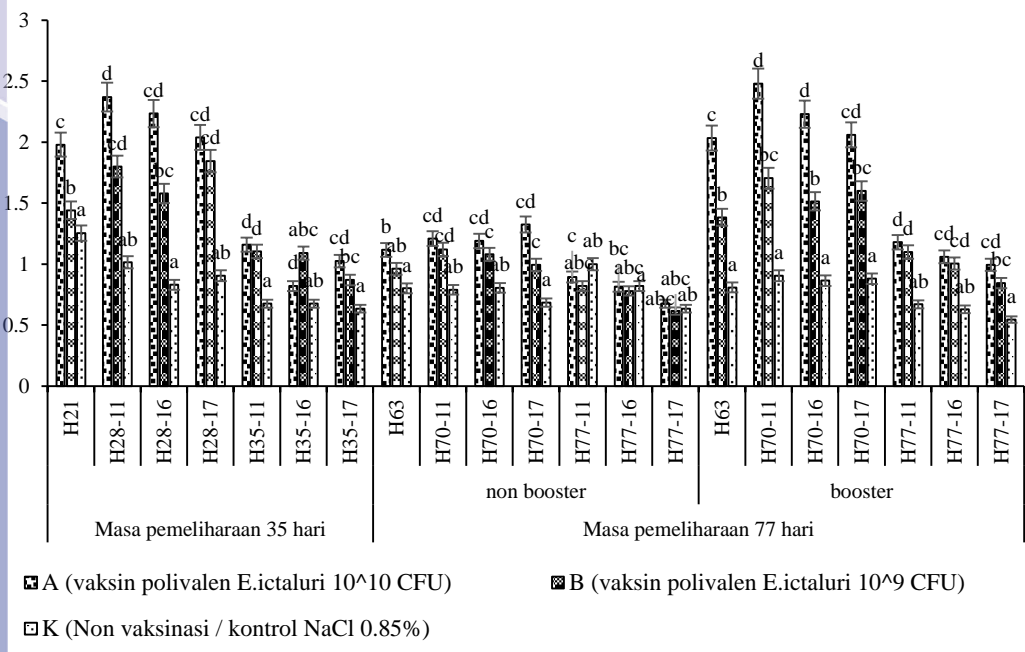


Gambar 35 Nilai titer antibodi serum ikan patin yang divaksin dengan vaksin polivalen *E. ictaluri*. Huruf yang berbeda di atas diagram batang dengan pola yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan berbeda nyata (Duncan,  $p < 0.05$ )

Fagositosis merupakan pertahanan penting terhadap infeksi patogen pada imunitas bawaan, merupakan jembatan yang menghubungkan antara imunitas bawaan dan juga imunitas adaptif (Kawamoto 2006). Aktivitas fagositosis diukur dari nilai persentase fagositosis dan indeks fagosit. Aktivitas fagositosis pada perlakuan vaksin polivalen  $10^{10}$  CFU  $mL^{-1}$  ikan $^{-1}$  menunjukkan nilai yang lebih tinggi dibanding vaksin polivalen  $10^9$  CFU  $mL^{-1}$  ikan $^{-1}$  dan kontrol (Gambar 36 dan 37).



Gambar 36 Persen fagositosis ikan patin pascavaksinasi vaksin polivalen *E. ictaluri* yang diinaktivasi dengan formalin 0.3% hingga 77 hari pemeliharaan. Huruf yang berbeda di atas diagram batang dengan pola yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan berbeda nyata (Duncan,  $p < 0.05$ )

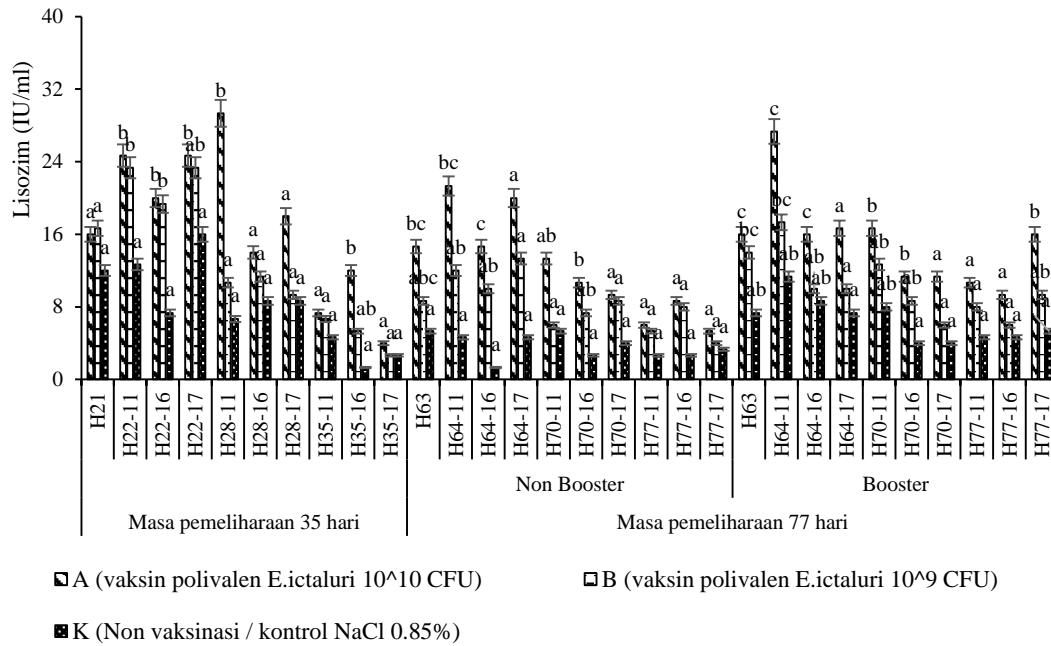


Gambar 37 Indeks fagositosis ikan patin pascavaksinasi vaksin polivalen *E. ictaluri* yang diinaktivasi dengan formalin 0.3% hingga 77 hari pemeliharaan. Huruf yang berbeda di atas diagram batang dengan pola yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan berbeda nyata (Duncan,  $p < 0.05$ )

Persentase fagositosis dan indeks fagositik dari perlakuan vaksin polivalen *E. ictaluri*  $10^{10}$  CFU  $mL^{-1}$  ikan $^{-1}$  dengan *booster* menunjukkan lebih tinggi dibanding perlakuan *non-booster* setelah diuji tantang, hal tersebut menunjukkan bahwa serum ikan yang divaksinasi memiliki aktivitas fagositosis yang memainkan peran penting dalam respons awal imun bawaan. Fungsi fagosit adalah menelan dan menghancurkan patogen dengan terlebih dahulu melekatkan patogen pada sel fagosit. Fagosit bertindak sebagai *antigen presenting cell* (APC) dan menghasilkan antigen peptida yang mengaktifkan respons imun adaptif. Fagosit umumnya bergerak secara *amoeboid*, mempunyai inklusi granular berupa lisosom yang mengandung substansi bakterisidal seperti  $H_2O_2$ , lisozim, protease, fosfatase, nuclease dan lipase (Sunatmo 2012).

Aktivitas lisozim merupakan parameter penting untuk mengevaluasi respons imun bawaan dengan mengaktifkan sistem komplemen dan untuk meningkatkan aktivitas kemotaktik sebagai opsonin (Saurabh & Sahoo 2008). Lisozim adalah protein bakterisida yang menghidrolisis ikatan 1.4 glikosidik dari peptidoglikan dinding sel bakteri sehingga mengakibatkan lisis sel yang dihasilkan ketika ada paparan antigen pada makrofag. Peningkatan protein total serum mungkin berkorelasi dengan peningkatan protein seperti lisozim serum, komponen komplemen, protein fase akut, sitokin, lektin, dan peptida bakterisida (Zhu *et al.* 2019). Aktivitas lisozim menunjukkan peningkatan signifikan 24 jam pasca uji tantang ( $P < 0.05$ ) (Gambar 38).

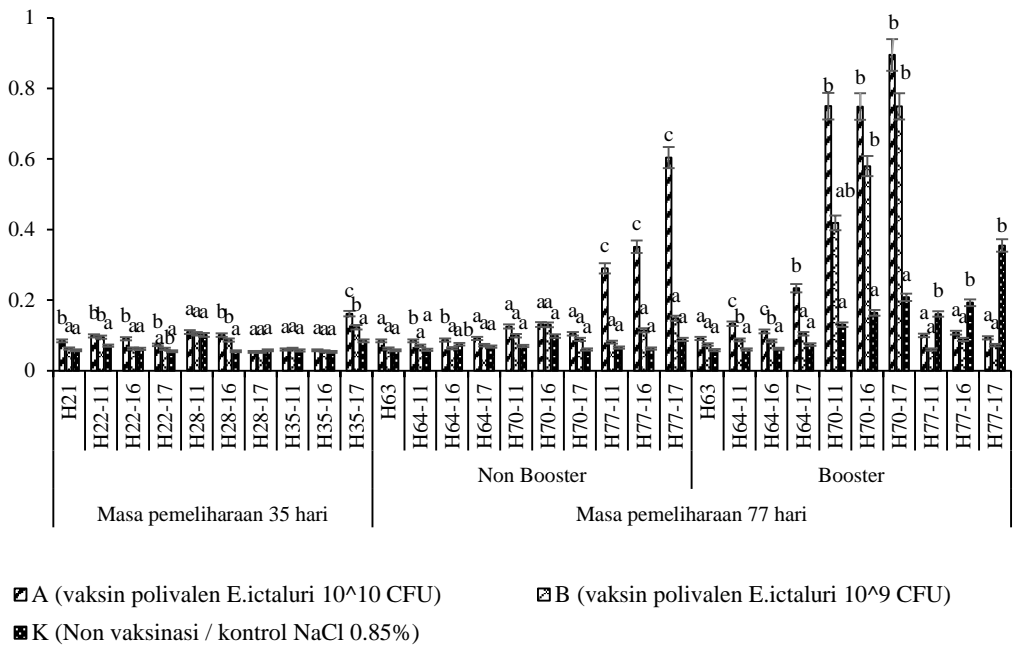
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang  
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :  
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah  
b. Pengutipan 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.



Gambar 38 Lisozim ikan patin pascavaksinasi vaksin polivalen *E. ictaluri* yang diinaktivasi dengan formalin 0.3% hingga 77 hari pemeliharaan. Huruf yang berbeda di atas diagram batang dengan pola yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan berbeda nyata (Duncan,  $p < 0.05$ )

Perlakuan vaksin polivalen *E. ictaluri*  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> dengan *booster* menunjukkan nilai aktivitas lisozim yang lebih tinggi dan signifikan dibanding perlakuan *non-booster*. Menurut Monir *et al* (2020) bahwa pemberian vaksin bivalen *S. agalactiae* dan *A. hydrophila* meningkatkan aktivitas lisozim 96 jam pasca ujiantang. Demikian juga penelitian Sukenda *et al* (2018) pada nila induk yang divaksinasi menghasilkan aktivitas lisozim yang signifikan pada induk, telur, dan benih dibandingkan dengan yang tidak divaksinasi. Hal tersebut membuktikan bahwa peningkatan respons imun pada ikan yang divaksinasi berkorelasi terhadap peningkatan aktivitas lisozim.

Produksi spesies oksigen reaktif (ROS) yaitu ledakan oksidatif atau *respiratory burst* merupakan mekanisme antimikroba yang kuat dan komponen utama pertahanan kekebalan bawaan terhadap infeksi bakteri dan jamur. Pelepasan konsentrasi tinggi oksigen radikal superoksida membantu dalam mengeliminasi bakteri yang menyerang. Lokalisasi pelepasan oksigen radikal superoksida ke fagosom yang mengandung patogen membatasi kerusakan jaringan. Sel imun inang, seperti neutrofil, juga dikenal sebagai *polymorphonuclear cell* (PMN), akan melepaskan sejumlah besar oksigen radikal superoksida di tempat infeksi setelah aktivasi reseptor permukaan (Nguyen *et al.* 2017). Menurut Thomas (2017) *respiratory burst* dihasilkan oleh kompleks multi-protein NADPH oksidase yang memiliki inti katalitik terikat membrane pada sub-unit gp91phox (CYBB) dan p22phox (CYBA) serta komponen sitosolik p47phox (NCF1), p67phox (NCF2) dan p40phox (NCF4). Hasil penelitian menunjukkan peningkatan nilai *respiratory burst* setelah 24 jam pasca ujiantang. Peningkatan nilai NBT pada perlakuan *booster* lebih tinggi dibanding *non-booster* (Gambar 39).



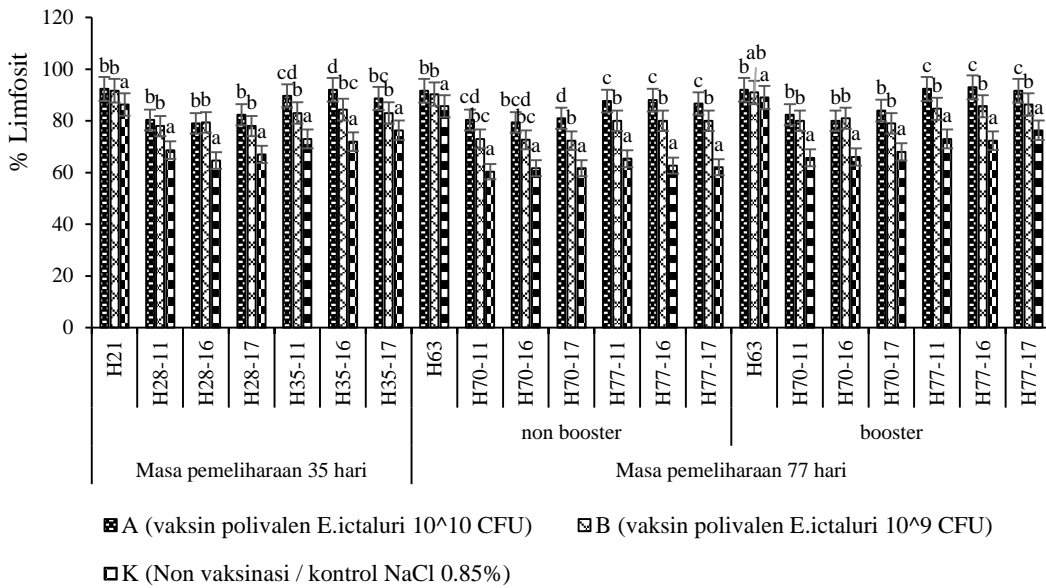
Gambar 39 NBT Assay ikan patin pascavaksinasi dengan vaksin polivalen *E. ictaluri* yang diinaktivasi dengan formalin 0.3% hingga 77 hari pemeliharaan. Huruf yang berbeda di atas diagram batang dengan pola yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan berbeda nyata (Duncan,  $p < 0.05$ )

Perlakuan vaksin polivalen *E. ictaluri*  $10^{10}$  CFU  $mL^{-1}$  ikan $^{-1}$  menunjukkan nilai *optical density* (OD) yang berbeda nyata ( $P < 0.05$ ) dibanding pada perlakuan lain dan kontrol hingga masa pemeliharaan 77 hari, hal tersebut menunjukkan bahwa perlakuan vaksin polivalen lebih optimal dalam menginduksi respons seluler non-spesifik dalam meningkatkan kemampuan sel fagosit dalam melawan antigen pada proses inflamasi. Penelitian beberapa tahun terakhir juga menunjukkan peran oksigen reaktif tidak hanya sebagai agen anti-mikroba tetapi sebagai pengatur sistem kekebalan yang dapat mempengaruhi reaksi redoks pada sistem imun seluler terutama dalam proses inflamasi (Holmdahl *et al.* 2013; Holmdahl *et al.* 2016).

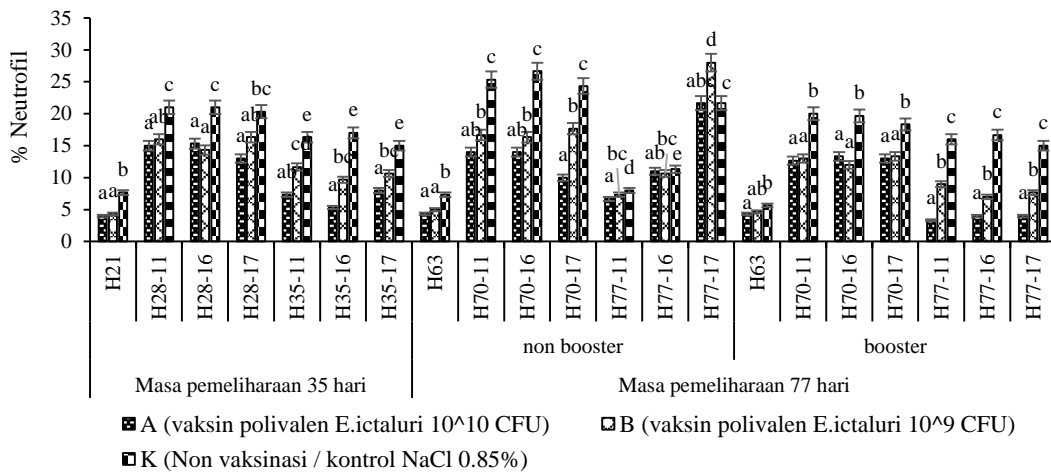
Persentase total limfosit pada perlakuan vaksin polivalen  $10^{10}$  CFU  $mL^{-1}$  ikan $^{-1}$  pasca ujiantang menunjukkan nilai yang lebih tinggi dibanding perlakuan vaksin polivalen  $10^9$  CFU  $mL^{-1}$  ikan $^{-1}$  dan berbeda nyata ( $P < 0.05$ ) dengan perlakuan kontrol (Gambar 40). Persentase limfosit mengalami penurunan pada hari ke-70 dan meningkat kembali hari ke-77, hal tersebut menandakan bahwa pemberian vaksin dapat meningkatkan jumlah limfosit untuk menghasilkan antibodi. Limfosit berperan dalam respons imun spesifik yang akan berinteraksi dengan antigen dalam proses pembentukan antibodi.

Persentase sel neutrofil dan monosit pada perlakuan vaksin polivalen  $10^{10}$  CFU  $mL^{-1}$  ikan $^{-1}$  dengan *booster* lebih rendah dibanding *non-booster* dan kontrol pasca ujiantang (Gambar 41 dan 42), hal ini menunjukkan bahwa pemberian vaksin dengan *booster* efektif menginduksi respons imun seluler baik spesifik maupun non-spesifik untuk mengeliminasi patogen.

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.

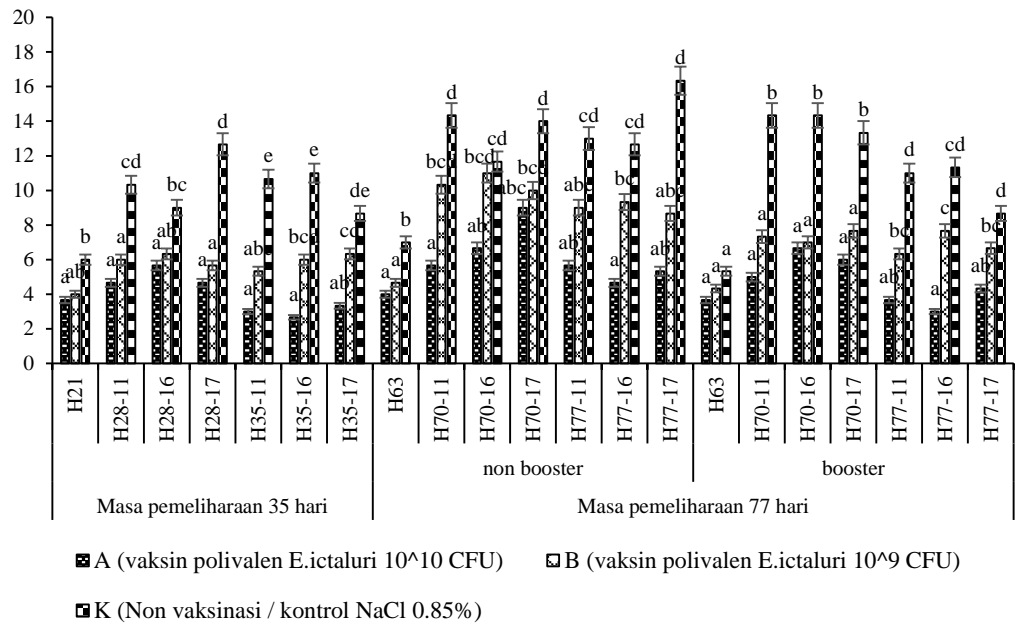


Gambar 40 Total limfosit ikan patin pascavaksinasi vaksin polivalen *E. ictaluri* yang diinaktivasi dengan formalin 0.3% hingga 77 hari pemeliharaan. Huruf yang berbeda di atas diagram batang dengan pola yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan berbeda nyata (Duncan, p<0.05)



Gambar 41 Total neutrofil ikan patin pascavaksinasi vaksin polivalen *E. ictaluri* yang diinaktivasi dengan formalin 0.3% hingga 77 hari pemeliharaan. Huruf yang berbeda di atas diagram batang dengan pola yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan berbeda nyata (Duncan, p<0.05)

Neutrofil merupakan sel granulosit fagosit, yang merupakan pertahanan seluler alami yang pertama kali bekerja yaitu 24-48 jam pascainfeksi karena neutrofil banyak dijumpai dalam sirkulasi. Monosit merupakan sel khusus yang disebut makrofag dan dendritik yang banyak terdapat dalam jaringan, limfa dan limfonodus (Sunatmo, 2012). Peran utama neutrofil adalah sebagai pertahanan awal imun non-spesifik terhadap infeksi bakteri *E. ictaluri* yang menghasilkan produk ekstraseluler berupa endotoksin, dimana toksin yang dihasilkan akan dinetralkan dan dieliminasi oleh sel fagosit yaitu neutrofil, monosit, dan makrofag.

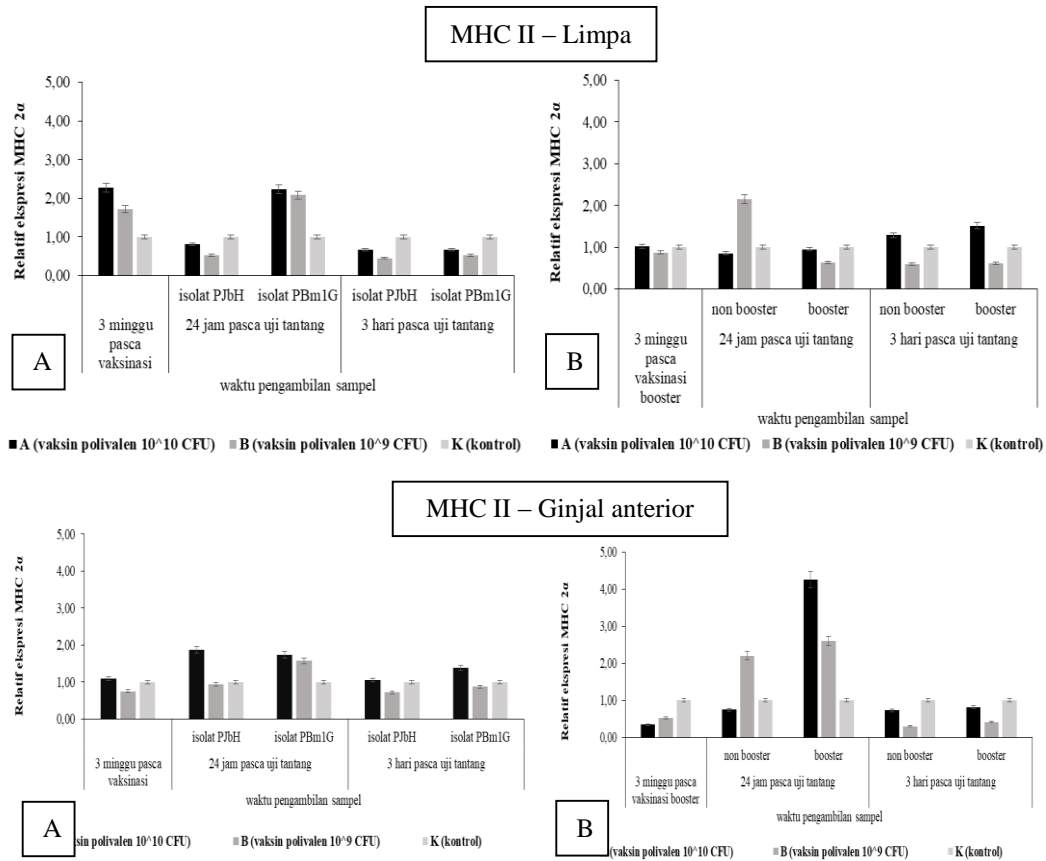


Gambar 42 Total monosit ikan patin pascavaksinasi vaksin polivalen *E. ictaluri* yang diinaktivasi dengan formalin 0.3% hingga 77 hari pemeliharaan. Huruf yang berbeda di atas diagram batang dengan pola yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan berbeda nyata (Duncan,  $p < 0.05$ )

Ginjal anterior dan limpa ikan merupakan organ target infeksi *E. ictaluri*. Pada ikan limpa berfungsi sebagai jaringan limfoid sekunder di mana presentasi antigen terjadi, dan respons imun adaptif diaktifkan (Kordon *et al.* 2019). Peningkatan ekspresi gen MHC *class II* pada pemeliharaan 35 hari dari organ limpa dan ginjal terjadi 24 jam pasca uji tantang pada perlakuan ikan yang divaksin dengan vaksin polivalen  $10^{10}$  CFU  $mL^{-1}$  ikan $^{-1}$ , sedangkan pemeliharaan hingga 77 hari peningkatan terjadi 3 hari pasca uji tantang pada perlakuan vaksin polivalen  $10^{10}$  CFU  $mL^{-1}$  ikan $^{-1}$  dengan *booster* lebih tinggi dibanding perlakuan  $10^9$  CFU  $mL^{-1}$  ikan $^{-1}$  dengan maupun tanpa *booster* dan kontrol (Gambar 43). Molekul MHC *class II* berfungsi sebagai molekul referensi yang memungkinkan sel T mengidentifikasi antigen asing untuk menstimulasi produksi sitokin yang akan akan menstimulasi sel B-spesifik antigen yang berdekatan, mengaktifasi, memproduksi serta mensekresi antibodi spesifik-antigen (Sunatmo 2012). Penelitian yang dilakukan oleh Kordon *et al.* (2019) menunjukkan penurunan MHC *class II* pada hari ke-3 pasca uji tantang dan meningkat kembali pada hari ke-7 pasca uji tantang.

Madigan *et al.* (2016) menyatakan bahwa protein *major histocompatibility complex* (MHC) II merupakan protein penyaji antigen pada lintasan kedua. Peptida asing umumnya mempunyai panjang 11-15 asam amino, berikatan pada situs pengikatan antigen MHC II yang baru terbuka. Kompleks tersebut kemudian dibawa ke membran sitoplasma, tempat kompleks dipajankan pada permukaan sel T pembantu khusus (*T helper*, Th). Sel Th, melalui TCR, mengenali kompleks peptida-MHC II. Interaksi ini mengaktifkan sel Th untuk mensekresikan sitokin yang menstimulasi produksi antibodi oleh sel B. Sel B di semua vertebrata adalah sel yang mensekresi antibodi fungsional untuk produksi antibodi spesifik sebagai respons terhadap invasi benda asing (Wu *et al.* 2020).

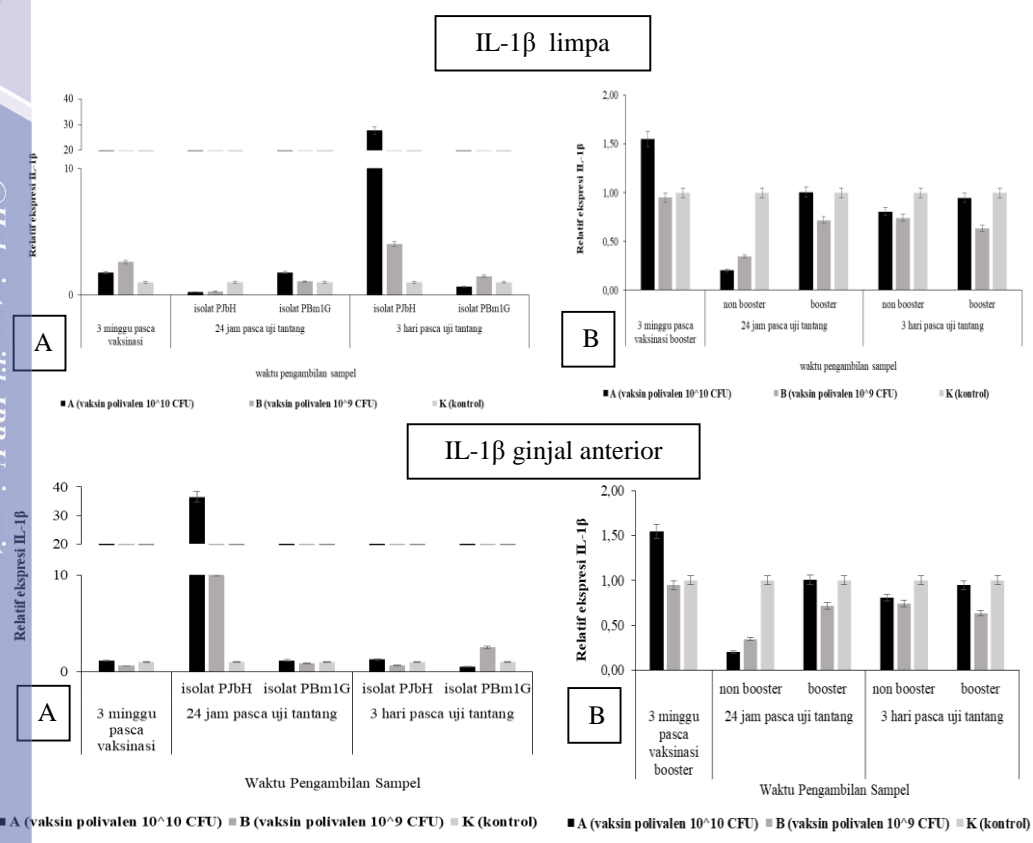
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang  
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :  
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah  
b. Pengutipan 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.



Gambar 43 Tingkat ekspresi mRNA MHC II ikan patin pascavaksinasi dan pasca uji tantang dengan *E. ictaluri*. A: pemeliharaan 35 hari, B: pemeliharaan 77 hari

Gen IL-1 $\beta$  adalah sitokin pro-inflamasi merupakan respons awal pada ikan yang penting dalam sistem imun bawaan maupun adaptif dan memainkan peran penting sebagai mediator kunci dalam peradangan, invasi mikroba, reaksi imunologis, dan cedera jaringan (Secombes *et al.* 2011; Huising *et al.* 2004). IL-1 $\beta$  lebih potensial dalam mengaktifkan respons imun humoral (Nakae *et al.* 2001) dan merupakan sitokin immunoregulator yang memiliki potensi untuk meningkatkan respons imun yang diinduksi oleh vaksin (Nash *et al.* 1993).

Peningkatan regulasi ekspresi gen IL-1 $\beta$  pada ginjal anterior terjadi 24 jam pasca uji tantang, sedangkan pada limpa 3 hari pasca uji tantang untuk pemeliharaan 35 hari. Pada pemeliharaan 77 hari menunjukkan peningkatan yang tidak berbeda antara *booster* dan *non-booster*, namun perlakuan vaksin polivalen 10<sup>10</sup> CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> dengan *booster* pada hari ke-21 (3 minggu pascavaksinasi *booster*) menunjukkan nilai lebih tinggi dibanding perlakuan lain (Gambar 44). Hal yang sama terjadi pada penelitian yang dilakukan oleh Kordon *et al.* (2019) efikasi vaksin *Live Attenuated E. ictaluri* meningkatkan regulasi gen IL-1 $\beta$  mulai 24 jam pasca uji tantang. Peningkatan ekspresi gen MHC *class* II dan IL-1 $\beta$  membuktikan bahwa pemberian vaksin polivalen 10<sup>10</sup> CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> mampu menstimulasi respons imun adaptif pada ikan patin dalam peningkatan produksi antibodi untuk melawan antigen asing.



Gambar 44 Tingkat ekspresi mRNA IL-1β ikan patin pascavaksinasi dan pasca uji tantang dengan *E. ictaluri*. A: pemeliharaan 35 hari, B: pemeliharaan 77 hari

Nilai RPS perlakuan vaksin polivalen *E. ictaluri* setelah diuji tantang dengan infeksi *E. ictaluri* terlihat pada Tabel 22. Proteksi vaksin polivalen *E. ictaluri* konsentrasi 10<sup>10</sup> CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> dengan *booster* menunjukkan nilai RPS 90.47%, 55% dan 60%, sedangkan vaksin polivalen *E. ictaluri non-booster* menunjukkan nilai RPS 61.90%, 42.85% dan 44.64% ketika diuji tantang dengan isolat *E. ictaluri* patogenik PjBH, P, dan PBm1G. Hasil analisis menunjukkan bahwa pemberian vaksin polivalen *E. ictaluri* 10<sup>10</sup> CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> dengan *booster* mampu meningkatkan nilai SR sebesar 10% dan RPS sebesar 18.89 % dibanding *non-booster*. Vaksin polivalen *E. ictaluri* 10<sup>10</sup> CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> dengan *booster* lebih optimal meningkatkan kembali respons imun dibanding pada perlakuan *non-booster*, hal ini tidak terlepas dari peran sel memori yang menstimuli sel B untuk menghasilkan antibodi dalam mengeliminasi patogen.

Vaksin polivalen yang berasal dari strain geografis berbeda merupakan formulasi ideal yang dapat memproteksi dari infeksi *E. ictaluri* heterolog yang memiliki variasi antigenik dan genetik. Vaksin polivalen inaktif sel utuh *E. ictaluri* pada penelitian ini menunjukkan nilai RPS pada kisaran 55-90.47% yang cukup potensial, menjanjikan dan dapat menjadi opsi pada budidaya patin dalam mencegah penyakit ESC, seperti halnya vaksin *live-attenuated E. ictaluri* dosis tunggal yang memberikan proteksi 68-100% pada *channel catfish* terhadap 23 isolat lapang *E. ictaluri* yang dikoleksi dari budidaya *catfish* di Amerika Serikat bagian tenggara sejak 1993 hingga 2016 (Aarattuthodiyil *et al.* 2020).

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.



Tabel 22 RPS ikan patin perlakuan *booster* dan *non-booster* pasca uji tantang bakteri *E. ictaluri*

Perlakuan	Kode bakteri uji tantang	Mortalitas ikan kontrol (%)	Mortalitas ikan yang divaksin (%)	RPS (%)	Skor	Total skor
A	PJbH	40	3.33	91.67	10	21
	P	45	18.33	59.25	6	
	PBm1G	90	51.67	42.59	5	
B	PJbH	40	6.67	83.73	9	17
	P	45	28.33	37.03	4	
	PBm1G	90	60	33.33	4	
<i>Non-booster</i>						
A	PJbH	30	13.33	61.90	7	17
	P	35	20	42.85	5	
	PBm1G	93.33	51.67	44.64	5	
B	PJbH	30	16.67	52.38	6	12
	P	35	28.33	19.05	2	
	PBm1G	93.33	60	35.71	4	
<i>Booster</i>						
A	PJbH	30	3.33	90.47	10	23
	P	35	15	55	6	
	PBm1G	93.33	36.67	60	7	
B	PJbH	30	6.67	80.95	9	18
	P	35	18.33	45	5	
	PBm1G	93.33	58.33	36.36	4	

Faktor pendukung keberhasilan efikasi selama masa induksi dan setelah uji tantang dipengaruhi oleh kondisi lingkungan perairan yang sesuai untuk pertumbuhan ikan patin. Nilai kualitas air selama penelitian disajikan pada Tabel 23. Berdasarkan hasil pengamatan terhadap kualitas air media pemeliharaan ikan uji menunjukkan bahwa kisaran kualitas air media pemeliharaan dari tiga parameter yaitu suhu, pH dan DO tersebut sesuai untuk pemeliharaan ikan patin. Hal ini menunjukkan bahwa hasil penelitian yang diperoleh disebabkan adanya perbedaan perlakuan dan bukan merupakan pengaruh dari kualitas air.

Tabel 23 Parameter kualitas air selama pemeliharaan ikan patin

Parameter	Nilai ukur	Kualitas air (SNI)	Satuan
Suhu	27.80-28.79	25.00-33.00	°C
pH	6.03 –7.01	6.00-8.00	
DO	4.36 – 5.41	3.00-7.00	ppm

## 8.4 Simpulan

Vaksin polivalen *E. ictaluri* konsentrasi  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> dengan *booster* pada hari ke-42 mampu menginduksi respons imun spesifik dan non-spesifik serta memberikan proteksi terbaik dengan nilai RPS tertinggi yaitu 90.47, 55, dan 60% terhadap infeksi *E. ictaluri* patogenik PJbH, P, dan PBm1G.

## IX PEMBAHASAN UMUM

Kasus kematian akibat penyakit ESC yang disebabkan oleh bakteri *E. ictaluri* menjadi kendala utama pada budidaya ikan patin di Indonesia. Insidensi dan prevalensi penyakit ini masih terus terjadi di berbagai lokasi sentra budidaya patin di Indonesia dengan tingkat keparahan kasus ringan hingga berat. Vaksin polivalen diharapkan menjadi solusi terbaik untuk penanggulangan ESC di Indonesia. Vaksin monovalen Caprivac Icta® produksi PT. Caprifarmindo Laboratoris yang telah ada merupakan vaksin inaktif monovalen yang kemungkinan hanya proteksi terhadap strain yang homolog. Variasi genetik dan antigenik *E. ictaluri* telah dilaporkan pada budidaya *catfish* di Asia dan Amerika (Klesius dan Shoemaker 1997; Griffin *et al.* 2016; Hawke *et al.* 2013; Rogge *et al.* 2013; Soto *et al.* 2012). Perbedaan kondisi geografis antar wilayah di Indonesia diduga menjadi faktor penyebab variasi isolat *E. ictaluri* dengan karakteristik spesifik yang dapat menjadi dasar pertimbangan dalam pengembangan riset vaksin polivalen *E. ictaluri* yang dapat memproteksi terhadap variasi antigen heterolog dan meningkatkan nilai RPS.

Karakteristik terhadap tujuh belas 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 umum, isolat-isolat pada penelitian ini merupakan bakteri Gram-negatif berbentuk batang pleomorfik dengan karakteristik biokimia dan API 20E pada semua isolat menunjukkan oksidatif, fermentatif, motil, tidak memproduksi H<sub>2</sub>S, menghasilkan gas dari glukosa, tumbuh pada media *mac conkey agar*, *rimler shott agar*, *Edwardsiella ictaluri agar*, tidak menghasilkan  $\beta$ -galaktosidase dan *arginine dihydrolase*, positif *ornithine decarboxylase*, citrat negatif, *urease* negatif, negatif indol, *voges-Proskauer* negatif, memfermentasi glukosa namun tidak terhadap *mannose*, inositol, sorbitol, *rhamnose* dan *mellibiose*. Namun pada sebagian isolat menunjukkan perbedaan pada kemampuan dalam menghidrolisa gelatin, *saccharose* dan *amylase*.

Semua isolat memiliki aktivitas  $\beta$ -hemolitik pada media agar darah dengan zona hemolisis paling terang ditunjukkan pada isolat PSb1G, PJbH, A2, P dan PBm1G. Isolat bakteri asal Indonesia menunjukkan citrat negatif dan motil identik dengan isolat *E. ictaluri* yang berasal dari *striped catfish* Vietnam dan *channel catfish* Amerika (Rogge *et al.* 2013). Seluruh isolat memiliki aktivitas enzim yaitu *alkaline phosphatase*, *acid phosphatase*, *esterase (C4)*, *leucine arylamidase*, *valine arylamidase*, *Naphthol AS BI Phosphohydrolase*, dan *N-acetyl  $\beta$ -glucosaminidase*. Aktivitas enzim tersebut diduga berperan dalam patogenesis infeksi ESC. Isolat PJbH, P, dan PBm1G memiliki aktivitas enzim *leucine dan valine arylamidase* lebih kuat dari isolat lainnya. Enzim *leucine dan valine arylamidase* merupakan jenis enzim protease yang disekresikan oleh beberapa strain bakteri dapat mendegradasi beberapa protein penting termasuk imunoglobulin dari inang, dan juga secara tidak langsung memproses banyak faktor virulensi toksik lainnya.

Profil antibiotik pada semua isolat menunjukkan sebagian besar antibiotik masih efektif digunakan untuk terapi ESC yaitu sensitif terhadap *chloramphenicol*, *oxytetracycline*, *tetracycline*, *chephalotine*, *ciprofloxacin*, *norfloxacin*, *amphicillin*,

*gentamycin*, *enrofloxacin* dan *nalidixid acid*. Upaya pengendalian penyakit ESC dengan antibiotik tersebut perlu pengawasan secara ketat terkait berbagai implikasi negatif yang dapat ditimbulkan yaitu bahaya residu antibiotik yang terakumulasi pada jaringan ikan, resistansi mikroba terhadap antibiotik, dan resiko pencemaran lingkungan. Kinetik pertumbuhan pada media *brilliant heart infusion* (BHI) menunjukkan sebagian besar isolat mencapai fase log berada pada 36 jam kecuali untuk isolat PSb3G dan PBm1G berada pada 48 jam. Isolat yang mencapai fase log pada 48 jam tumbuh lebih lambat, tebal dan lebih keruh dan sebaliknya untuk isolat yang lain. Analisa PCR semua isolat dengan primer spesifik *E. ictaluri* terdeteksi pada 129 bp yang merupakan fragmen protein *putative transposon* yang dimiliki oleh *E. ictaluri* virulen.

*Repetitive* PCR menunjukkan pola spesifik dari masing-masing isolat, pola spesifik wilayah tidak ditemukan namun pola yang sama terdeteksi pada isolat yang berasal dari lokasi yang berbeda. Isolat *E. ictaluri* asal Indonesia menunjukkan variasi genotipe yaitu tiga genotipe dengan primer ERIC I dan II, dua genotipe dengan primer GTG<sub>5</sub> dan empat genotipe dengan primer ERIC II dan BOX. Kenyataan ini menunjukkan bahwa letak geografis tidak mempengaruhi karakter spesifik isolat *E. ictaluri* namun perbedaan diduga akibat kondisi geografis wilayah yang berbeda. Tingkat kedekatan dihitung dengan menggunakan metode *neighbour-joining*. *Edwardsiella ictaluri* asal patin dari berbagai lokasi budidaya di Indonesia memiliki kemiripan 99.56-100% dengan strain *E. ictaluri* 93-146 *complete genom* (CP.001600.2). Pohon filogenetik menunjukkan isolat *E. ictaluri* terbagi menjadi 2 klad utama yaitu klad pertama terdiri dari 16 isolat yang terbagi menjadi 13 sub klad dan klad kedua yang terdiri dari 1 isolat.

Salah satu faktor virulensi pada *E. ictaluri* adalah peran gen virulen dalam mekanisme patogenesis penyakit ESC. Identifikasi gen virulen menunjukkan hasil yang variatif yaitu sebanyak tiga isolat (PJ1G, PSb5G, S.935G) memiliki 6 gen virulen; empat isolat (PR1G, PjBH, A2, PBm1G) memiliki 5 gen virulen; dua isolat memiliki 3 gen (BSRH, PSmH) dan 4 gen (PBm2G, P) serta enam isolat (PCjG, B1, B2, PSb3G, PTaH, PSb1G) memiliki 2 gen virulen. Secara umum pada semua isolat *E. ictaluri* asal berbagai lokasi di Indonesia memiliki gen T6SS (evpC) dan urease. Derajat keasaman mempunyai peran penting dalam mengaktifasi gen-gen virulen yang ada, di mana pH media budidaya patin pada kondisi di bawah enam mengakibatkan kematian yang tinggi akibat infeksi *E. ictaluri* seperti yang terjadi pada penelitian yang dilakukan oleh Phuoc (2014). Isolat *E. ictaluri* PjBH, A2, dan PBm1G berasal dari lokasi yang memiliki pH di bawah enam yaitu lahan gambut sehingga memiliki tingkat virulensi yang lebih tinggi dengan pola kematian yang akut dari isolat lainnya. Sementara pada isolat PSb1G dan P kemungkinan merupakan isolat yang diperoleh pada saat terjadi wabah ESC dimusim penghujan. Rogge dan Thune (2011) menyatakan bahwa sensor kinase mendeteksi pH rendah dan memfosforilasi EsrB, aktivasi EsrB akan meningkatkan ekspresi *pathogenicity islands* gen T3SS termasuk EsrC. Peningkatan ekspresi EsrC akan mengaktifasi gen T6SS EvpC. Kombinasi fosfat rendah dan pH rendah akan meningkatkan regulasi *putative E. ictaluri* T3SS efektor Esei. Variasi *E. ictaluri* yang ditemukan di Indonesia memiliki perbedaan fenotipe dan genotipe yang diduga dipengaruhi oleh kondisi geografis asal wilayah isolat.

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 *E. ictaluri* tidak dipengaruhi oleh jumlah gen virulen yang dimiliki. Infeksi berbagai isolat *E. ictaluri* menyebabkan perubahan abnormalitas patologi klinik, gambaran darah dan kerusakan jaringan. *Edwardsiella ictaluri* memiliki enzim  $\beta$ -hemolisin mampu melisis sel darah merah dan menginfeksi pada organ hematopoetik yaitu ginjal, hati, dan limpa di mana menyebabkan abnormalitas morfologi dan fungsi yang mempengaruhi dalam kemampuan memproduksi sel darah merah sehingga secara langsung berpengaruh terhadap kadar hematokrit, hemoglobin, dan jumlah sel darah merah. Infeksi *E. ictaluri* menyebabkan peningkatan jumlah sel darah putih sebagai respons darurat terhadap invasi patogen, peningkatan glukosa darah akibat ikan mengalami stress karena infeksi, limfosit mengalami penurunan (limfopenia) sebaliknya neutrofil (neutrofilia) dan monosit mengalami peningkatan (monositosis).

Perubahan patologis organ internal yaitu hati, ginjal, dan limpa mulai teramati 48 jam pascainfeksi. Organ hati, ginjal, dan limpa mengalami pembengkakan, pendarahan, dan disertai nodul keputihan. Secara rinci gejala klinis yang terjadi akibat infeksi ESC antara lain melanosis mulai terjadi 24 jam pascainfeksi; kemerahan sirip dan ekor, lesi pada permukaan tubuh, luka sekitar kepala, bercak putih di daerah mata mulai terjadi 48 jam pascainfeksi; nafsu makan menurun signifikan, berenang lemah dan menyendiri mulai terjadi pada hari ke-4 pascainfeksi; perut membesar/dropsy, lubang pada bagian kepala, bengkak anus mulai terjadi pada hari ke-6 pascainfeksi, hari ke-7 pascainfeksi menunjukkan mata menonjol serta berenang *erratic* dan spiral. Hasil penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa paparan infeksi *E. ictaluri* secara eksperimental dalam waktu singkat mampu menimbulkan penyakit dengan gejala khas ESC pada ikan patin. Perubahan histopatologi dari organ hati, ginjal, usus, limpa, dan insang ikan patin yang terinfeksi *E. ictaluri* menunjukkan perubahan antara lain kongesti, vakuolisasi, nekrosis pada hati; peradangan, hemoragik, nekrosis, dan *melanomacrophage center* (MMC) pada ginjal; hemoragik dan nekrosis pada usus serta peradangan, nekrosis, dan hemosiderosis pada limpa. Sedangkan insang mengalami kongesti dan proliferasi lamella sekunder. *Enteric septicemia of catfish* menyebabkan pendarahan akut dan nekrosis berhubungan dengan  $\beta$ -hemolisin dan endotoksin yang dihasilkan *E. ictaluri*. Enzim  $\beta$ -hemolisin menyebabkan hemolisis di dalam tubuh ikan diikuti oleh pengendapan hemosiderin pada jaringan.

Karakteristik 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. Jenis protein *E. ictaluri* yang teridentifikasi pada penelitian ini yaitu *aconitate hydratase protein* (AcnB) yang berukuran 90.93 kDa, *type VI secretion system protein* (EvpB) yang berukuran 55.53 kDa, *pentapeptide repeat family protein* yang berukuran 49.08 kDa, *phosphopyruvate decarboxylase* (Ppd) yang berukuran 43.39 kDa, *riboflavin biosynthesis protein* (RibD) yang berukuran 38.36 kDa, *opacity family porin* (LomR) yang berukuran 23.42 kDa dan *type III secretion system translocon component* (EseD) pada 20.70 kDa. Protein dengan ukuran 71.06 dan 26.50 kDa merupakan jenis *outer membrane protein sel* (OMPs) sedangkan protein 140,

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.

123.76, 109.40, 14.30, dan 11.18 kDa yang belum teridentifikasi dengan protein tertentu.

*Aconitate hydratase protein* (AcnB) merupakan protein *iron-sulfur* yang terlibat dalam siklus asam trikarboksilat dan mengontrol homeostasis besi pada tingkat pasca transkripsi. Protein type III (T3SS) dan VI *secretion system* (T6SS) terlibat dalam faktor virulensi. Protein RibD berperan adhesi pada mukosa olfaktorius dan LomR berperan sebagai faktor adhesi yang berada pada protein *outer membrane*. Mortalitas tertinggi terjadi pada perlakuan sel utuh P dan PBm1G sebesar 97.78% dan 100% sedangkan pada PJBH menunjukkan kematian rendah sebesar 15.56%. Kematian akibat toksisitas sel utuh mulai terjadi setelah 48 jam pascainjeksi. Patologi anatomi organ pada perlakuan sel utuh menunjukkan adanya akumulasi cairan yang bercampur darah pada rongga perut, pembengkakan hati, ginjal dan limpa sedangkan pada perlakuan ECP terlihat normal. Gejala klinis pada perlakuan sel utuh antara lain keputihan pada lensa mata (*ocular opacity*), lesi pada permukaan tubuh, lubang pada kepala (*hole in the head*), bengkak pada anus, ikan bernafas terengah-engah (*gaspings*), berenang tidak menentu (*erratic*), berenang spiral, dan akhirnya mengalami kematian. Histopatologi menunjukkan kongesti, vakuolisasi, dan nekrosis pada hati; peradangan, hemoragik, nekrosis, hemosideriosis, dan *melanomacrophage center* pada ginjal; peradangan, hemoragik, hemosiderosis, dan nekrosis pada limpa. Tingginya kematian pada kelompok perlakuan sel utuh disebabkan faktor virulen yang berperan dalam adhesi dan invasi bakteri *E. ictaluri* hanya ditemukan pada sel utuh. Komponen protein dari sel utuh *E. ictaluri* terbukti bersifat virulen yang berperan dalam patogenesis infeksi *E. ictaluri* pada ikan patin.

Riset mengenai vaksin *E. ictaluri* telah banyak dilakukan dalam bentuk vaksin monovalen inaktif maupun *live* dengan menghilangkan gen-gen virulen tertentu. Vaksin monovalen inaktif yang telah dikembangkan belum mampu memberikan proteksi secara optimal, begitupun vaksin *live* juga masih memberikan hasil yang variatif tidak stabil ketika diaplikasikan secara lapang. Pengembangan riset vaksin *live E. ictaluri* beberapa tahun belakangan ini riset memberikan harapan namun menjadi kendala terkait *genetically modified organism* (GMO) yang masih terbatas dan dilarang digunakan dalam industri akuakultur di seluruh dunia serta *unpromising* jika diaplikasikan pada ikan yang murah harganya. Pemilihan isolat kandidat vaksin dilakukan dengan teliti dan hati-hati dengan mempertimbangkan faktor virulensi yaitu gen virulen (T3SS, T4SS, T6SS, dan urease) dan juga enzim ( $\beta$ -hemolitik, *leucine*, dan *valine arylamidase*) yang diduga dominan berperan dalam patogenisitas infeksi ESC pada patin serta potensi sel utuh sebagai sediaan vaksin. Komposisi penyusun vaksin inaktif polivalen *E. ictaluri* terdiri dari isolat PJBH, P, dan PBm1G dengan perbandingan 1:1:1.

Uji viabilitas terhadap masing-masing sediaan vaksin monovalen, bivalen, maupun polivalen *E. ictaluri* diperoleh hasil tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri pada media kultur hingga hari ke-4 pengamatan, hal tersebut menunjukkan bahwa proses inaktivasi efektif dan tidak ada kontaminasi mikroba selama proses pembuatan vaksin. Uji keamanan sediaan vaksin monovalen, bivalen, dan polivalen *E. ictaluri* dengan dosis ganda tidak terjadi kematian 24 jam pascavaksinasi hingga 14 hari pengamatan. Perubahan secara fisiologis dan anatomis juga tidak ditemukan. Secara histopatologi pada organ hati, ginjal, insang, usus, dan limpa menunjukkan tidak ditemukan perubahan abnormalitas jaringan. Hal tersebut membuktikan



bahwa sediaan vaksin inaktif monovalen, bivalen, dan polivalen *E. ictaluri* yang diberikan terbukti aman dan tidak menimbulkan efek samping. Uji kadar formalin menunjukkan bahwa sediaan vaksin inaktif monovalen, bivalen, dan polivalen *E. ictaluri* inaktivasi formalin 0.3% aman untuk digunakan melalui injeksi secara intraperitoneal karena kelangsungan hidup pada berbagai kelompok perlakuan 100 % dan tidak terdeteksi adanya residu formalin pada daging ikan uji setelah pemeliharaan selama 14 hari.

Efikasi vaksin inaktif monovalen, bivalen, dan polivalen *E. ictaluri* pada ikan patin dilakukan dengan menginjeksikan secara intraperitoneal dengan konsentrasi  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup>. Evaluasi parameter keberhasilan vaksinasi meliputi titer antibodi dengan *indirect* ELISA, aktivitas fagositosis, aktivitas lisozim, *respiratory burst* dengan uji NBT, diferensial leukosit, SR, dan RPS. Vaksin inaktif monovalen, bivalen, dan polivalen *E. ictaluri* terbukti mampu meningkatkan respons imun spesifik dan non-spesifik setelah 21 hari pascavaksinasi dan pasca ujiantang yaitu peningkatan titer antibodi, aktivitas fagositosis, aktivitas lisozim, nilai *respiratory burst*, dan jumlah limfosit dibanding kontrol.

Titer antibodi ikan patin yang divaksin dengan vaksin inaktif monovalen, bivalen dan polivalen *E. ictaluri* menunjukkan nilai titer antibodi yang lebih tinggi dibanding dengan kontrol setelah ditantang dengan multi-infeksi *E. ictaluri*. Nilai titer antibodi terhadap antigen bakteri *E. ictaluri* PjBH pada perlakuan vaksin polivalen menunjukkan berbeda nyata ( $P < 0.05$ ) pada hari ke-21 masa induksi vaksin dan hari ke-35 (14 hari pasca ujiantang). Nilai titer antibodi terhadap antigen bakteri *E. ictaluri* P pada perlakuan vaksin polivalen menunjukkan berbeda nyata ( $P < 0.05$ ) pada hari ke-35 sedangkan nilai titer antibodi terhadap antigen bakteri *E. ictaluri* PBm1G pada perlakuan vaksin polivalen menunjukkan berbeda nyata ( $P < 0.05$ ) pada hari ke-21 dan hari ke-28. Antigen P dan PBm1G memiliki kemampuan afinitas yang kuat dan kemampuan bereaksi silang terhadap antigen heterolog yang lebih baik dibanding antigen PjBH, hal tersebut ditunjukkan dengan nilai titer antibodi yang lebih tinggi pada berbagai sediaan vaksin *E. ictaluri*.

Aktivitas fagositosis hari ke-21 dan hari ke-28 menunjukkan peningkatan pada ikan yang divaksin dengan berbagai sediaan vaksin dibanding kontrol. Nilai aktivitas fagositosis pada perlakuan vaksin polivalen menunjukkan nilai yang lebih tinggi dan berbeda nyata dibanding kelompok perlakuan lain dan kontrol ( $P < 0.05$ ), hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian vaksin polivalen mampu meningkatkan kemampuan bakterisidal serum ikan terhadap invasi antigen vaksin. Aktivitas lisozim menunjukkan peningkatan pada hari ke-21, penurunan pada hari ke-28 dan meningkat kembali pada hari ke-35. Menurut Sugiani *et al.* (2013) bahwa pemberian vaksin dapat mempengaruhi respons imun, diduga adanya antibodi akan menginisiasi aksi berantai komplemen sehingga lisozim serum dapat masuk ke dalam lapisan peptidoglikan bakteri dan menyebabkan kematian sel. Perlakuan vaksin polivalen *E. ictaluri* menunjukkan nilai aktivitas lisozim yang lebih tinggi dan signifikan dibanding perlakuan vaksin monovalen, bivalen, dan kontrol ( $P < 0.05$ ).

Peningkatan nilai *respiratory burst*/NBT pada serum ikan patin yang divaksin dengan berbagai sediaan vaksin terjadi secara signifikan hari ke-21 (3 minggu pascavaksinasi) dan hari ke-28 (7 hari pasca ujiantang) dan lebih tinggi pada perlakuan ikan yang divaksin dengan vaksin polivalen *E. ictaluri*, hal tersebut

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.

menunjukkan bahwa perlakuan pemberian vaksin pada patin uji mampu meningkatkan kemampuan sel fagosit dalam melawan antigen. Total limfosit juga mengalami peningkatan pada kelompok vaksin dibanding kontrol dimana peningkatan tertinggi pada perlakuan vaksin polivalen. Persentase total limfosit mengalami penurunan pada hari ke-28 dan meningkat kembali pada hari ke-35, hal tersebut menandakan bahwa pemberian vaksin dapat meningkatkan jumlah limfosit untuk menghasilkan antibodi. Total neutrofil dan monosit juga mengalami peningkatan pasca ujiantang, hal ini karena kedua sel tersebut sebagai respons darurat terhadap invasi antigen yang masuk ke dalam tubuh ikan. Vaksin polivalen *E. ictaluri* yang berasal dari bakterin PJBH, P, dan PBm1G memberikan level proteksi terbaik yaitu sebesar 61.02% dibanding vaksin monovalen dan bivalen terhadap multi-infeksi bakteri *E. ictaluri*.

Diversitas genetik dan antigenik bakteri *E. ictaluri* asal berbagai lokasi di Indonesia menjadi pertimbangan utama dalam pengembangan vaksin polivalen untuk pengendalian penyakit ESC pada budidaya patin. Strategi pengembangan vaksin polivalen yang potensial diharapkan memberi perlindungan secara periodik terhadap isolat yang heterolog, hal ini berlawanan dengan penelitian Klesius dan Shoemaker (1997) yang menyatakan bahwa vaksinasi dengan beberapa antigen *E. ictaluri* tidak memberikan perlindungan terhadap semua isolat heterolog. Konstruksi vaksin polivalen harus mempertimbangkan empat faktor yaitu reaksi silang antigen, kompetisi antigen, waktu pematangan, dan penghilangan sifat antigenik yang akan mempengaruhi efektivitas, kemampuan menghasilkan respons imun dan level antibodi. Pengujian lanjutan tahap akhir adalah untuk mengetahui efektivitas proteksi vaksin inaktif polivalen *E. ictaluri* dengan dan tanpa *booster* pada 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>. Keberhasilan vaksinasi diukur dari parameter respons imun spesifik dan non-spesifik serta nilai RPS.

Titer antibodi adalah parameter utama untuk mengevaluasi respons imun spesifik. Nilai titer antibodi ikan Patin yang divaksin dengan vaksin polivalen  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> menunjukkan nilai titer antibodi yang berbeda nyata ( $P < 0.05$ ) dibanding dengan perlakuan vaksin polivalen  $10^9$  CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> dan kontrol hari ke-77 setelah ditantang dengan infeksi *E. ictaluri*. Perlakuan vaksin polivalen  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> dengan *booster* memberikan respon nilai titer antibodi lebih tinggi dibanding perlakuan *non-booster* pada hari ke-77, hal ini tidak terlepas dari peran sel memori yang menstimuli sel B untuk menghasilkan antibodi dalam mengeliminasi patogen. Madigan *et al.* (2016) menyatakan paparan kedua terhadap antigen yang sama mengaktifkan klon sel reaktif antigen dan menghasilkan respons imun adaptif sekunder lebih cepat serta lebih kuat dan memuncak dalam beberapa hari.

Aktivitas fagositosis dari perlakuan vaksin polivalen *E. ictaluri*  $10^{10}$  CFU dengan *booster* lebih tinggi dibanding perlakuan *non-booster* setelah diujiantang, hal tersebut menunjukkan bahwa serum ikan yang divaksinasi memiliki aktivitas fagositosis yang memainkan peran penting dalam respons awal imun bawaan. Aktivitas lisozim menunjukkan peningkatan signifikan 24 jam pasca ujiantang ( $P < 0.05$ ). Perlakuan vaksin polivalen *E. ictaluri*  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> dengan *booster* menunjukkan nilai aktivitas lisozim yang lebih tinggi dan signifikan dibanding perlakuan *non-booster*. Menurut Monir *et al.* (2020) bahwa pemberian vaksin bivalen *S. agalactiae* dan *A. hydrophilla* akan meningkatkan aktivitas



lisozim 96 jam pasca ujiantang. Demikian juga pada penelitian yang dilakukan Sukenda *et al.* (2018) diperoleh hasil bahwa nilai induk yang divaksinasi menghasilkan aktivitas lisozim yang signifikan pada induk, telur, dan benih dibandingkan dengan yang tidak divaksinasi. Hal tersebut membuktikan bahwa peningkatan respons imun pada ikan yang divaksinasi berkorelasi terhadap peningkatan aktivitas lisozim.

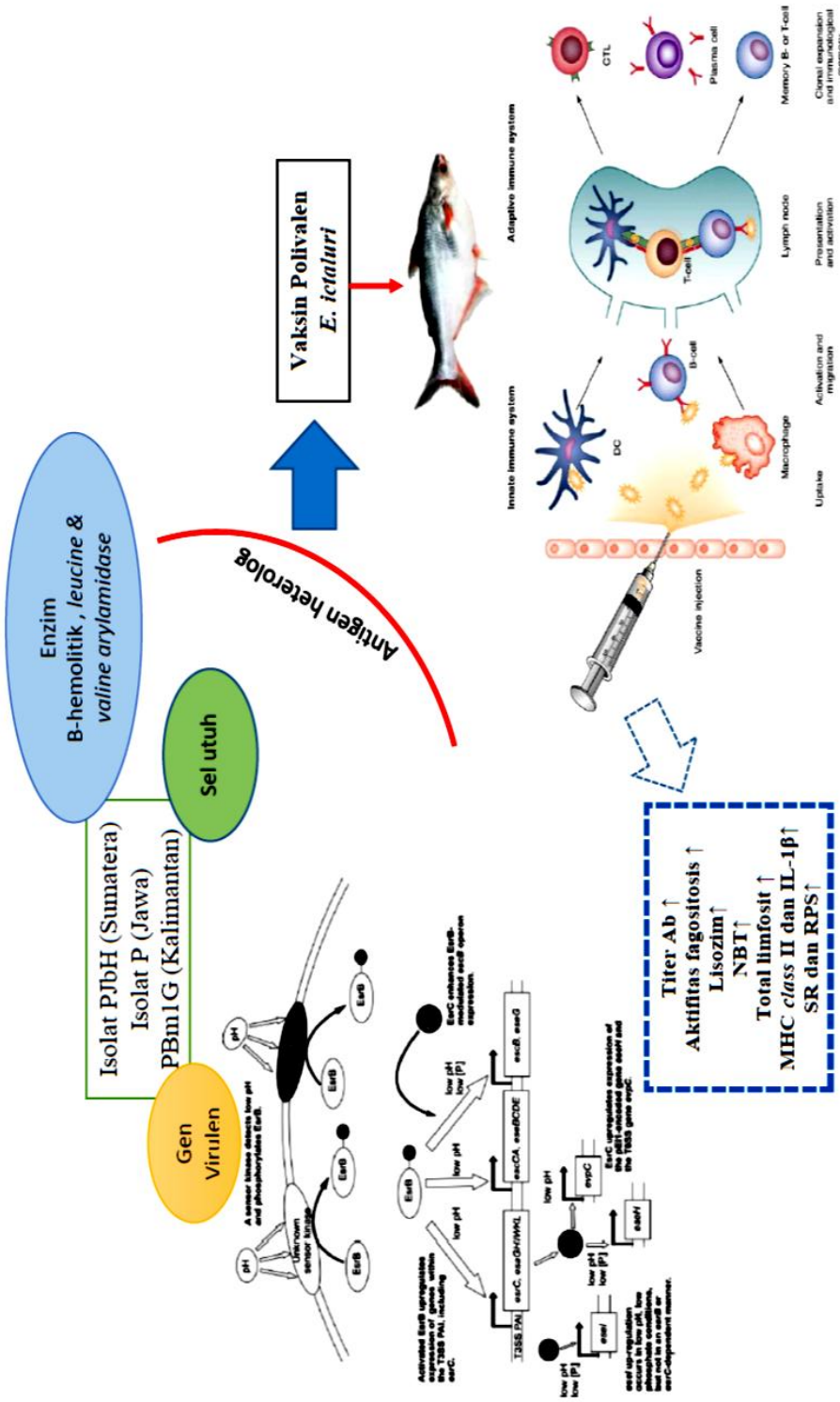
Nilai *respiratory burst*/NBT menunjukkan peningkatan setelah 24 jam pasca ujiantang. Peningkatan nilai pada perlakuan *booster* lebih tinggi dibanding *non-booster*. Perlakuan vaksin polivalen *E. ictaluri*  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> menunjukkan nilai *optical density* (OD) yang berbeda nyata ( $P < 0.05$ ) dibanding perlakuan lain kontrol hingga masa pemeliharaan 77 hari, hal tersebut menunjukkan bahwa perlakuan vaksin polivalen lebih optimal dalam menginduksi respons seluler non-spesifik dalam meningkatkan kemampuan sel fagosit dalam melawan antigen pada proses inflamasi.

Persentase total limfosit pada perlakuan vaksin polivalen *E. ictaluri*  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> pasca ujiantang menunjukkan nilai yang lebih tinggi dibanding perlakuan vaksin polivalen  $10^9$  CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> dan berbeda nyata ( $P < 0.05$ ) dengan perlakuan kontrol. Persentase limfosit mengalami penurunan pada hari ke-70 dan meningkat kembali pada hari ke-77, hal tersebut menandakan bahwa pemberian vaksin dapat meningkatkan jumlah limfosit untuk menghasilkan antibodi. Persentase sel neutrofil dan monosit pada perlakuan vaksin inaktif polivalen *E. ictaluri*  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> dengan *booster* lebih rendah dibanding *non-booster* pasca ujiantang, hal ini menunjukkan bahwa pemberian vaksin dengan *booster* efektif menginduksi respons imun seluler baik spesifik maupun non-spesifik untuk mengeliminasi patogen.

Peningkatan ekspresi gen MHC *class II* pada pemeliharaan 35 hari dari organ limpa dan ginjal terjadi 24 jam pasca ujiantang pada perlakuan ikan yang divaksin dengan vaksin polivalen  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup>, sedangkan pemeliharaan hingga 77 hari peningkatan terjadi 3 hari pasca ujiantang pada perlakuan vaksin polivalen  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> dengan *booster* lebih tinggi dibanding perlakuan  $10^9$  CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> dengan maupun *non-booster* dan kontrol. Peningkatan regulasi ekspresi gen IL-1 $\beta$  pada ginjal anterior terjadi 24 jam pasca ujiantang, sedangkan pada limpa 3 hari pasca ujiantang untuk pemeliharaan 35 hari. Pada pemeliharaan 77 hari menunjukkan peningkatan yang tidak signifikan antara *booster* dan *non-booster*, namun perlakuan vaksin polivalen  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> dengan *booster* pada hari ke-21 (3 minggu pascavaksinasi *booster*) menunjukkan nilai lebih tinggi dibanding perlakuan lain. Penurunan MHC *class II* pada hari ke-3 pasca ujiantang dan meningkat kembali pada hari ke-7 pasca ujiantang. Hal yang sama terjadi pada penelitian yang dilakukan oleh Kordon *et al.* (2019) efikasi vaksin *live E. ictaluri* menunjukkan penurunan regulasi gen MHC *class II* pada hari ke-3 pasca ujiantang dan peningkatan regulasi gen IL-1 $\beta$  mulai 24 jam pasca ujiantang. Peningkatan ekspresi gen MHC *class II* dan IL-1 $\beta$  membuktikan bahwa pemberian vaksin polivalen  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> mampu menstimulasi respons imun adaptif pada ikan patin dalam peningkatan produksi antibodi untuk melawan antigen asing.



- 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.



Gambar 45 Mekanisme kerja vaksin polivalen *E. ictaluri* terhadap kelangsungan hidup. RPS dan respons imun spesifik dan non spesifik (modifikasi dari Rogge dan Thune (2011); Crommelin *et al.* (2013))

Vaksin 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 dan 60% ketika diuji tantang dengan bakteri PJbH, P, dan PBm1G. Vaksin polivalen *E. ictaluri*  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> dengan *booster* lebih optimal meningkatkan kembali respons imun dibanding pada perlakuan *non-booster*. Vaksin polivalen inaktif sel utuh *E. ictaluri* pada penelitian ini menunjukkan nilai RPS pada kisaran 55-90.47% dapat sebagai opsi pada budidaya patin dalam mencegah penyakit ESC, seperti halnya vaksin *live-attenuated E. ictaluri* dosis tunggal yang memberikan proteksi 68-100% pada *channel catfish* terhadap 23 isolat lapang *E. ictaluri* yang dikoleksi dari budidaya *catfish* di Amerika Serikat bagian tenggara sejak 1993 hingga 2016 (Aarattuthodiyil *et al.* 2020). Vaksin polivalen yang berasal dari strain geografis berbeda merupakan formulasi ideal yang dapat memproteksi dari infeksi *E. ictaluri* heterolog yang memiliki variasi antigenik dan genetik.

Berdasarkan uraian di atas secara keseluruhan diperoleh gambaran bahwa penggunaan vaksin inaktif polivalen *E. ictaluri* berasal dari antigen heterolog yaitu bakteri PJbH, P, dan PBm1G yang berasal dari lokasi dan kondisi geografis yang berbeda dengan perbandingan 1:1:1 efektif, bermanfaat, dan *promising* secara ekonomi pada budidaya patin untuk memberi perlindungan terhadap serangan penyakit ESC dengan meningkatkan respons imun spesifik dan non-spesifik yang secara langsung akan meningkatkan nilai RPS. Penelitian vaksin inaktif polivalen *E. ictaluri* sebagai kontrol penyakit ESC masih memerlukan penelitian lebih lanjut dalam pengujian efektivitas diantaranya: metode aplikasi vaksin, penambahan adjuvant, uji skala lapangan, uji multilokasi serta uji multistrain ikan patin sebagai dasar untuk data dukung evaluasi analisis ekonomi aplikasi vaksin dalam budidaya patin.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

- Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
- 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.

## X SIMPULAN DAN SARAN UMUM

### 10.1 Simpulan

Hasil keseluruhan dari penelitian ini menunjukkan bahwa vaksin polivalen inaktif sel utuh *E. ictaluri* yang berasal dari bakterin PjB<sub>H</sub>, P, dan PBm1G perbandingan 1:1:1 pada konsentrasi  $10^{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> ikan<sup>-1</sup> dengan *booster* merupakan dosis terbaik yang mampu meningkatkan titer antibodi, aktivitas fagositosis, lisozim, *respiratory burst*, total limfosit, dan ekspresi gen MHC class IIa dan IL-1 $\beta$  pascavaksinasi maupun pasca ujiantang terhadap isolat *E. ictaluri* patogenik serta memberikan proteksi terbaik dengan skor nilai RPS tertinggi.

### 10.2 Saran

Vaksin pada penelitian ini masih tahap pengembangan sehingga masih diperlukan penelitian lebih lanjut skala laboratorium untuk penyempurnaan terkait efektivitas vaksin polivalen aplikasi oral pakan dan perendaman serta penggunaan adjuvant untuk meningkatkan efektivitas vaksin. Hasil yang diperoleh skala laboratorium selanjutnya dapat digunakan sebagai acuan dalam pengujian skala lapang, multi lokasi dan multi strain ikan patin.

@Hak cipta milik IPB University

IPB University



## DAFTAR PUSTAKA

- Aarattuthodiyil S, Griffin MJ, Greenway TE, Khoo LH, Byars TS, Lewis M, Steadman J, Wise DJ. 2020. An orally delivered, live-attenuated *Edwardsiella ictaluri* vaccine efficiently protects channel catfish fingerlings against multiple *Edwardsiella ictaluri* field isolates. *J World Aquacult Soc.* 1–19. <http://doi.org/10.1111/jwas.12693>.
- Abdelhamed H, Lawrence ML, Karsi A. 2018. The Role of TonB Gene in *Edwardsiella ictaluri* Virulence. *Journal of Frontiers in Physiology* 8:1066. <http://doi.org/10.3389/fphys.2017.01066>.
- Abdelhamed H, Ibrahim I, Baumgartner W, Lawrence ML, Karsi A. 2018. The virulence and immune protection of *Edwardsiella ictaluri* HemR mutants in catfish. *Fish and Shellfish Immunology* 72: 153-160. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.10.041>.
- Abu-Elala NM, Samir A, Wasfy M, Elsayed M. 2019. Efficacy of injectable and immersion vaccines against streptococcal infections in broodstock and offspring of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol.* 88: 293-300.
- Adams A. 2019. Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development. *Fish Shellfish Immunol.* 90: 210–214.
- Afifi SH, Al-Thobiati S, Hazaa MS. 2000. Bacteriological and histopathological studies on *Aeromonas hydrophila* infection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from fish farms in Saudi Arabia. *Assiut Vet Med J.* 84:195-205.
- Akgul A, Lawrence ML, Karsi A. 2018. Stress-related genes promote *Edwardsiella ictaluri* pathogenesis. *PloS one* 13(3): 194-669.
- Almendras FE, Fuentealba IC. 1997. Salmonid rickettsial septicemia caused by *Piscirickettsia salmonis*: A review. *Dis. Aquat. Org.* 29(2): 137-144
- Amanu, S. 2007. Komunikasi Pribadi. Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan UGM. Yogyakarta. [2 – 07 – 2007, Yogyakarta].
- Anderson DP. 1974. *Fish Immunology*. T.F.H. Publication, Inc. Ltd. Hongkong. Hlm 239.
- Anderson DP, Siwicki AK. 1995. Basic hematology and serology for fish health programs. Di dalam: Shariff M, Arthur JR, Subasinghe RP, editor. *Fish Health Section. Asia Fisheries Society* (eds). *Disease in Asian Aquaculture II*. Manila, Philippines. hlm 185-202.
- Anderson DP. 2004. Immunostimulants, vaccines, and environmental stressors in aquaculture: NBT assays to show neutrofil activity by these immunomodulators. Di dalam: Suarez C *et al.*, editor. *Avances en nutricion acuicola VII. Memorias del Simposium Internacional de Nutricion Acuicola*. 16-19 Nov 2004, Sonora Mexico.
- Andrieu M, Rico A, Phu TM., Huong DTT, Phuong NT, Van den Brink PJ. 2015. Ecological risk assessment of the antibiotic *enrofloxacin* applied to *Pangasius* catfish farms in the Mekong Delta, Vietnam. *Chemosphere* 119: 407–414. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06>.
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official methods of analysis. 15th Ed *Association of Official Analytical Chemists Inc.* Virginia, USA.

- Arias CR, Shoemaker CA, Evans JJ dan Klesius PH. 2003. A comparative study of *Edwardsiella ictaluri* parent (EILO) and *E. ictaluri* rifampicin-mutant (RE-33) isolates using lipopolysaccharides, outer membrane proteins, fatty acids, Biolog, API 20E and genomic analyses. *Journal of Fish Diseases* 26: 415–421
- Austin B dan Austin DA. 1987. Bacterial Fish Pathogens : Disease in Farmed and Wild Fish. *John Willy and Sons Ltd*. England.
- Baldwin TJ, Collins LA, Newton JC. 1997. Antigens of *Edwardsiella ictaluri* recognized by serum antibodies from naturally infected channel catfish. *Fish & Shellfish Immunology* 7:261–71.
- Bao Y, Cao X. 2011. Revisiting the protective and pathogenic roles of neutrophils: Ly-6G is key. *Eur J Immunol* 41(9): 2535-2548.
- Bartie KL, Austin FW, Diab A, Dickson C, Dung TT, Giacomini M, Crumlist M. 2012. Intraspecific diversity of *Edwardsiella ictaluri* isolates from diseased freshwater catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (sauvage), cultured in the Mekong Delta. *Journal of Fish Diseases*. <http://doi.org/10.1111/jfd.1365-2761.01376>.
- Bilodeau AL and Waldbieser GC. 2005. Activation of TLR3 and TLR5 in channel catfish exposed to virulent *Edwardsiella ictaluri*. *Dev. Comp. Immunol* 29:713–721.
- Blaxhall PC, Daisley KW 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology* (5): 771–781. <http://doi.org/10.1111/j.10958649.1973.tb04510.x>.
- Booth NJ, Beekman JB, Thune RL. 2009. *Edwardsiella ictaluri* encodes an acid-activated urease that is required for intracellular replication in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) macrophages. *Appl Environ Microbiol* 75:6712-6720.
- Booth NJ, Elkamel A, Thune RL. 2015. Intracellular Replication of *Edwardsiella ictaluri* in Channel catfish Macrophages. *Journal of Aquatic Animal Health* 18(2):101-108. <http://doi.org/10.1577/H05-025.1>.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytic Biochem.* 72: 248-254.
- Burns RG. 1982. Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology. *J Soil Biology Biochemistry* 14, 423-427.
- Chatakondi N, Peterson BC, Greenway TE, Byars TS, Wise DJ. 2018. Efficacy of a Live-attenuated *Edwardsiella ictaluri* Oral Vaccine in Channel and Hybrid Catfish. *Journal of The World Aquaculture Society*. <http://doi.org/10.1111/j.was.12515>.
- Chen H, Yang D, Han F, Tan J, Zhang L, Xiao J, Zhang Y dan Liu Q. 2017. The bacterial T6SS effector evpP prevents NLRP3 inflammasome activation by inhibiting the Ca<sup>2+</sup>-dependent MAPK-Jnk pathway. *Cell Host Microbe* 21: 47–58.
- Chen H, Yuan G, Su J, Liu X. 2019. Hematological and immune genes responses in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) with septicemia induced by *Edwardsiella ictaluri*. *J Fish and Shellfish Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.11.071>.

- Chowdhury MA, Roy NC, Chowdhury A. 2020. Growth, yield and economic returns of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) at different stocking densities under floodplain cage culture system. *Egypt. J. Aquat. Res.* 46: 91–95.
- Cooper R., Shotts E.B. and Nolan L. 1996. Use of a mini-transposon to study chondroitinase activity associated with *Edwardsiella ictaluri*. *J. Aquat. Anim. Health.* 8: 319-324.
- Crommelin DJA, Sindelar RD, and Meibohm B. 2013. Pharmaceutical Biotechnology. *Springer Science*. [http://doi.org/10.1007/978-1-4614-6486-0\\_22](http://doi.org/10.1007/978-1-4614-6486-0_22).
- Crumlish M, Dung T, Turnbull J, Ngoc N, Ferguson H. 2002. Identification of *Edwardsiella ictaluri* from diseased freshwater catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), cultured in the Mekong Delta, Vietnam. *J. Fish Dis.* 25 (12): 733–736. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00412.x>
- Cunningham FL, Jack SW, Hardin D, Wills RW. 2014. Risk Factors Associated with Enteric Septicemia of Catfish on Mississippi Commercial Catfish Farms. *Journal of Aquatic Animal Health* 26(2): 84–90. <http://doi.org/10.1080/08997659.2014.886635>.
- Dahal N, Abdelhamed H, Lu J, Karsi A, Lawrence ML. 2013. Tricarboxylic acid cycle and one-carbon metabolism pathways are important in *Edwardsiella ictaluri* virulence. *PLoS ONE* 8:e65973.
- Danilova N, Bussmann J, Jekosch K, Steiner LA. 2005. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nat Immunol* 6(3):295-302.
- Dean P. 2011. Functional domains and motifs of bacterial type III effector proteins and their roles in infection. *FEMS Microbiol Rev* 35: 1100 –1125. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00271.x>.
- Dong X, Ye Z, Song L, Su B, Zhao H, Peatman E, Li C. 2015. Expression profile analysis of two Cathepsin S in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) mucosal tissues following bacterial challenge. *Fish and Shellfish Immunology*. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.030>.
- Dubey S, Maiti B, Kim SH, Sivadasan SM, Kannimuthu D, Pandey PK, Girisha S, Mutoloki S, Chen SC, Evensen O, Karunasagar I, Munang'andu HM. 2019. Genotypic and phenotypic characterization of *Edwardsiella* isolates from different fish species and geographical areas in Asia: Implications for vaccine development, *Journal of Fish Diseases*. <http://doi.org/10.1111/jfd.12984>.
- Dumpala PR, Peterson BC, Lawrence ML, dan Karsi A. 2015. Identification of differentially abundant proteins of *Edwardsiella ictaluri* during iron restriction. *PLoS ONE* 10:e0132504. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0132504>.
- Dung TT, Haesebrouck F, Tuan NA, Sorgeloos P, Baele M, Decostere A. 2008. Antimicrobial Susceptibility Pattern of *Edwardsiella ictaluri* Isolates from Natural Outbreaks of *Bacillary Necrosis* of *Pangasianodon hypophthalmus* in Vietnam. *Journal of Microbial Drug Resistance* 14(4): 311-316. <http://doi.org/10.1089/mdr.2008.0848>.

- [DJBP] Direktorat Jendral Perikanan Budidaya. 2019. Laporan Monitoring dan Surveillance Hama Penyakit Ikan.
- Dubyska LP, Rogge ML, Thune RL. 2016. Identification and Characterization of Putative Translocated Effector Proteins of the *Edwardsiella ictaluri* Type III Secretion System. *mSphere* 1(3):e00039-16. <http://doi.org/10.1128/mSphere.00039-16>.
- Eissa N and Wang HP. 2016. Transcriptional stress responses to environmental and husbandry stressors in aquaculture species. *Rev. Aquacult.* 8(1): 61-88.
- Ellis AE. 1988. General principles of fish vaccination. Di dalam: Ellis AE, editor. *Fish vaccination*. Academic Press, London, hlm 1- 19.
- Ellis AE. 1998. Fish Vaccination. Department of Agriculture and Fisheries for Scotland Marine Laboratory. No. 4, 1–8.
- Ellis AE. 1999. Immunity to bacteria in fish. *Fish Shellfish Immunol* 9:291– 308. <http://doi.org/10.1006/fsim.1998.0192>.
- Fagan RP and Smith SG. 2007. The Hek outer membrane protein of *Escherichia coli* is an auto-aggregating adhesin and invasin. *FEMS Microbiol. Lett.*, 269, 248–255.
- [FAO] Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations. 2020. The state of world fisheries and aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>.
- Gao L, He C, Liu X, Su H, Gao X, Li Y, Liu W. 2012. Review : The Innate Immune – Related Genes in Catfish. *International Journal of Molecular Sciences* 13 : 14172-14202. <http://doi.org/10.3390/ijms131114722>.
- Griffin MJ, Mauel MJ, Greenway TE, Khoo LH, Wise DJ. 2011. A real-time polymerase chain reaction assay for quantification of *Edwardsiella ictaluri* in catfish pond water and genetic homogeneity of diagnostic case isolates from Mississippi. *J. Aquat. Anim. Health.* 23: 178–188.
- Griffin MJ, Quiniou SM, Cody T, Tabuchi M, Ware C. 2013. Comparative Analysis of *Edwardsiella* isolates from fish in the Eastern United States Identifies Two Distinct Genetic Taxa Amongst Organisms Phenotypically Classified as *E.tarda*. Publications from USDA-ARS/UNL faculty.1338. <http://digitalcommons.unl.edu/usdaarsfacpub>.
- Griffin MJ, Reichley SR, Greenway TE, Quiniou SM, Ware C, Gao DX, Gaunt PS, Yanong RPE, Pouder DB, Hawke JP, Soto E. 2015. Comparison of *Edwardsiella ictaluri* isolates from different host and geographic origins. *Journal of Fish Diseases.* <http://doi.org/10.1111/jfd.12431>.
- Gudding R, Lillehaug A, Evensen Ø. 2014. Fish vaccination. *Wiley Blackwell* (Vol.53). <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- Hansen JD, Landis ED, Phillips RB. 2005. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in *rainbow trout*: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proc Natl Acad Sci* 102(19):6919-24.
- Hardjamulia, Djajadiredja AR, Atmawinata S dan Idris D. 1981. Pembenuhan jambal siam (*Pangasius sutchi*) dengan suntikan ekstrak kelenjar hipofisa ikan mas (*Cyprinus carpio*). *Buletin Penelitian Perikanan* 1(2): 183-190.
- Hawke JP, McWhorter AC, Steigerwalt AG, Brenner DJ. 1981. *Edwardsiella ictaluri* sp. nov. the causative agent of enteric septicemia of catfish. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 31(4): 396-400.

- Hawke, J.P., Durborow, R., Thune, R., and Camus, A. 1998. *ESC: enteric septicemia of catfish*. Southern Regional Aquaculture Center Stoneville, Mississippi.
- Hawke JP dan Khoo LH. 2004. "Infectious diseases," in *Biology and Culture of Channel Catfish*, eds C. S. Tucker and J. A. Hargreaves (Amsterdam: Elsevier): 387–443.
- Hawke JP, Kent M, Rogge M, Baumgartner W, Wiles J, Shelley J, Savolainen LC, Wagner R, Murray K, Peterson TS. 2013. Edwardsiellosis Caused by *Edwardsiella ictaluri* in Laboratory Populations of Zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Aquatic Animal Health* 25(3): 171-183. <http://doi.org/10.1018/08997659.2013.782226>.
- He Y, Xu T, Fossheim LE, Zhang XH. 2012. FliC, a Flagellin Protein, Is Essential for the Growth and Virulence of Fish Pathogen *Edwardsiella tarda*. *PLoS ONE* (7): e45070.
- Holmdahl R, Sareila O, Pizzolla A, Winter S, Hagert C, Jaakkola N, Kelkka T, Olsson LM, Wing K, Backdahl L. 2013. Hydrogen peroxide as an immunological transmitter regulating autoreactive T cells. *Antioxidants & redox signaling* 18(12): 1463-74.
- Holmdahl R, Sareila O, Olsson LM, Backdahl L, Wing K. 2016. Ncf1 polymorphism reveals oxidative regulation of autoimmune chronic inflammation. *Immunological reviews* 269(1): 228-47.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth Edition. *Williams & Wilkins*. Baltimore. Hal. 175 – 289.
- Hu YH, Dang W, Sun L. 2012. A TonB-dependent outer membrane receptor of *Pseudomonas fluorescens*: virulence and vaccine potential. *Arch. Microbiol.* 194, 795–802. <http://doi.org/10.1007/s00203-012-0812-3>.
- Huising MO, Stet RJ, Savelkoul HF, Verburg-van Kemenade BM. 2004. The molecular evolution of the interleukin-1 family of cytokines: IL-18 in teleost fish. *Dev. Comp. Immunol.* 28: 395–413.
- Jatt AN, Tunio SA, Memon SB, Qureshi AS, Bhutto MA. 2018. API-ZYM Enzymatic Profile of *Shigella dysenteriae* IM Isolated from Drinking Water. *Pakistan J. Zool.* 50(3): 977-981. <http://doi.org/10.17582/journal.pjz/2018.50.3.977.981>.
- Irianto A. 2005. *Patologi ikan teleostei*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. Hal. 256.
- Kaattari S, Evans D, Klemer J. 1998. Varied redox forms of teleost IgM: an alternative to isotypic diversity. *Immunol Rev* 166:133-42.
- Karsi A, Gulsoy N, Corb E, Dumpala PR, Lawrence ML. 2009. A high throughput bioluminescence mutant screening strategy for identification of bacterial virulence genes. *Applied Environmental Microbiology* 75: 2166–2175.
- Kawamoto HA. 2006. Close developmental relationship between the lymphoid and myeloid lineages. *Trends Immunol* 27:169–75. <http://doi.org/10.1016/j.it.2006.02.004>
- Keskin O, Secer S, Izgur M, Turkyilmaz S, Mkakosya RS. 2004. *Edwardsiella ictaluri* Infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turk Journal Veterinary Animal Science* 28 : 649-653.



- Klesius PH, Shoemaker CA. 1997. Heterologous isolates challenge of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, immune to *Edwardsiella ictaluri*. *Aquaculture* 157: 147–155.
- Kordon AO, Abdelhamed H, Ahmed H, Park JY, Karsi A, Pinchuk LM. 2018. Phagocytic and bactericidal properties of channel catfish peritoneal macrophages exposed to *Edwardsiella ictaluri* live attenuated vaccine and wild-type strains. *Front. Microbiol.* 8:2638. [http://doi.org/ 10.3389/fmicb.2017.02638](http://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02638)
- Kordon AO, Abdelhaned H, Ahmed H, Baumgartner W, Karsi A, Pinchuk LM. 2019. Assessment of the Live Attenuated and Wild-Type *Edwardsiella ictaluri*- Induced Immune Gene Expression and *Langerhans-Like Cell* Profiles in the Immune-Related organs of Catfish. *Frontiers Immunology.* 10:392. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00392>.
- Kovacic F, Babic N, Krauss U, and Jaeger K. 2019. Classification of Lipolytic Enzymes from Bacteria. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.* Springer Nature Switzerland AG. [http://doi.org/10.1007/978-3-319-39782-5\\_39-1](http://doi.org/10.1007/978-3-319-39782-5_39-1).
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lawrence ML, Banes MM dan Williams ML. 2001. Phenotype and virulence of a transposon-derived lipopolysaccharide O side-chain mutant strain of *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Aquatic Animal Health* 13, 291–299.
- Li H, Lu L, Li X, Buffet PA, Dao M, Karniadakis GE, Suresh S. 2018. Mechanics of diseased red blood cells in human spleen and consequences for hereditary blood disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(38): 9574-9579.
- Lin J, Chang YJ, Yang WB, Yu AL, Wong CH . 2014. The multifaceted effects of polysaccharides isolated from *Dendrobium huoshanense* on immune functions with the induction of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) in monocytes. *PloS one* 9(4): 940-40
- Li W, Pan XH, Cheng WX, Cheng YB, Yin YL, Chen JT, Xu GH, Xie LW. 2018. Serum biochemistry, histology and transcriptomic profile analysis reflect liver inflammation and damage following dietary histamine supplementation in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*), *J.Fish Shellfish Immunol.* 77: 83–90.
- Liu JY, Li AH, Zhou DR, Wen ZR, Ye XP. 2010. Isolation and characterization of *Edwardsiella ictaluri* strains as pathogens from diseased yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* (Richardson) cultured in China. *Journal of Aquaculture Research* 41: 1835-1844. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02571.x>.
- Liu Y, Gao Y, Liu X, Liu Q, Zhang Y, *et al.* 2017. Transposon insertion sequencing reveals T4SS as the major genetic trait for conjugation transfer of multi-drug resistance pEIB202 from *Edwardsiella*. *BMC Microbiology* 17: 112
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods.* 25: 402-408.
- Lobb CJ, Ghaffari SH, Hayman JR, dan Thompson DT. 1993. Plasmid and serological differences between *Edwardsiella ictaluri* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2830–2836.

- Machimbirike VI, Uthaipaisanwong P, Khunrae P, Dong HT, Senapin S, Rattanaojpong T, Sutheworapong S. 2021. Comparative genomics of *Edwardsiella ictaluri* revealed four distinct host-specific genotypes and thirteen potential vaccine candidates. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.04.016>.
- Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl DA. 2016. Brock Biology of Microorganisms. Edition 14<sup>th</sup>. Pearson Education Inc.
- Masse E. and Arguin M. 2005. Ironing out the problem: new mechanisms of iron homeostasis. *Biochem. Sci.* 30, 462–468. <http://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.06.005>.
- Magnadottir B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *J. Fish & Shellfish Immunology* 20 (2): 137–151.
- Magnadottir B. 2010. Immunological control of fish diseases. *Marine Biotechnology*, 12, 361–379. <http://doi.org/10.1007/s10126-010-9279-x>.
- Mahyuddin 2010. Pemeliharaan Ikan Patin. Gramedia. Jakarta. Hal 44.
- Maqsood S, Samoon MH, Singh P. 2009. Immunomodulatory and Growth Promoting Effect of Dietary Levamisole in *Cyprinus carpio* Fingerlings Against the Challenge of *Aeromonas hydrophila*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 9: 111-120.
- Mawardi M, Jaelani, Zainun Z, Mundayana Y, Chilora BS, Hardi EH. 2018. Identification and Characterization of *Edwardsiella ictaluri* from diseased *Pangasius pangasius*, cultured in Cirata Lake, Indonesia. *Biodiversitas* vol.19 No.3. <http://doi.org/10.13057/biodiv/d190309>.
- Men LT, Thanh Y, Hirata, Yamasaki S. 2004. Evaluation of the genetic and the nutritional values of the Tra (*Pangasius hypophthalmus*) and the Basa (*Pangasius bocourti*) catfish cultivated in the mekong river delta of Vietnam. *Asian–Australasian Journal of Animal Sciences*. 18(5): 671-676.
- Menanteau-Ledouble S, Karsi A, Lawrence ML. 2011. Importance of skin abrasion as a primary site of adhesion for *Edwardsiella ictaluri* and impact on invasion and systematic infection in channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Vet Microbiol* 148:425-430.
- Miyazaki T, and Kaige N. 1985. A histopathological study on motile aeromonad disease of Crucian carp. *Fish Pathol* 21:181–185. <http://doi.org/10.3147/jsfp.21.181>
- Miyazaki T and Plumb J. 1985. Histopathology of *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish Dis.* 8(4): 389-392.
- Mohanty BR, Sahoo PK. 2007. Edwardsiellosis in fish : a brief review. *Journal of Bioscience* 32: 1331-1344.
- Monir MS, Yusoff SBM, Zulperil ZBM, Hassim HBA, Mohamad A, Ngoo MSBMH, Ina-Salwany MY. 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>
- Morrison EE, Plumb JA. 1994. Olfactory organ of channel catfish as a site of experimental infection. *J Aquat Anim Health* 6 (2):101-109
- Mudryk ZJ, Podgórska B. 2006. Enzymatic Activity of Bacterial Strains Isolated from Marine Beach Sediments. *Polish J. of Environ. Stud.* 15(3): 441-448.

- Munang'andu HM, Paul J, & Evensen O. 2016. An overview of vaccination strategies and antigen delivery systems for *streptococcus agalactiae* vaccines in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vaccines* 4(4), <https://doi.org/10.3390/vaccines4040048>.
- Nakae S, Asano M, Horai R, Iwakura Y. 2001. Interleukin-1 beta, but not interleukin-1 alpha, is required for T-cell-dependent antibody production. *Immunology* 104: 402–409.
- Nash AD, Lofthouse SA, Barcham GJ, Jacobs HJ, Ashman K, Meeusen EN, Brandon MR, Andrews AE. 1993. Recombinant cytokines as immunological adjuvants. *Immunol. Cell. Biol.* 71: 367–379.
- Nasrullah H, Nababani YI, Safitri I, Yanti DH, Nuryatu S, Junior MZ, Alimuddin A. 2020. Single nucleotide polymorphism in C-type lysozyme gene and its correlation with *Aeromonas hydrophila* resistance in African catfish *Clarias gariepinus*. *Biodiversitas* 21(1): 311-317. <http://doi.org/10.13057/biodiv/d210138>.
- Nelson DL, Cox MM. 2005. Lehninger Principles of Biochemistry. 4th ed. WH Freeman and Co. New York. 1013p
- Newton JC, Bird RC, Blevins WT, Wilt GR, Wolfe LG. 1989. Isolation, characterization, and molecular cloning of cryptic plasmids from *Edwardsiella ictaluri*. *American Journal of Veterinary Research* 49:1856-1860.
- Newton JC, Blevins WT, Wilt GR, Wolfe LG. 1990. Outer membrane protein profiles of *Edwardsiella ictaluri* from fish. *Am J Vet Res* 51(2):211-5.
- Newton JC, dan Triche PL. 1993. Isolation and characterization of flagella from *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Aquatic Animal Health* 5(1):16-22.
- Nguyen GT, Green ER and Meccas J. 2017. Neutrofiles to the ROScUE: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7:373. <http://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00373>.
- Nigam PS. 2013. Review: Microbial Enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications. *Biomolecules* 3: 597-611. <http://doi.org/10.3390/biom3030597>.
- Nitimulyo KH, Isnansetyo A, Triyanto T, Murdjani M, Sholichah L. 2005. Efektivitas vaksin polivalen untuk pengendalian vibriosis pada kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*). *J Perikanan UGM* 7(1): 95-100.
- Nho SW, Abdelhamed H, Karsi A, Lawrence ML. 2017. Improving safety of a live attenuated *Edwardsiella ictaluri* vaccine against enteric septicemia of catfish and evaluation of efficacy. *Vet Microbiol.* 210:83–90. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.09.004>.
- Noinaj N, Guillier M, Barnard TJ, and Buchanan SK. 2010. TonB dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 43–60. <http://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134247>.
- Noor M, Masganti, Agus F. 2016. Pembentukan dan karakteristik gambut tropika Indonesia, dalam buku Lahan gambut Indonesia: Pembentukan, Karakteristik, dan Potensi Mendukung Ketahanan Pangan (Penyunting: Fahmuddin Agus, Markus Anda, Ali Jamil, Masganti). Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Kementerian Pertanian. *IAARD Press*-Jakarta.
- Okuda J et al. 2006. Intracellular replication of *Edwardsiella tarda* in murine macrophage is dependent on the type III secretion system and induces an

up-regulation of anti-apoptotic NF- $\kappa$ B target genes protecting the macrophage from staurosporine-induced apoptosis. *Microb. Pathog.* 41:226–240.

- Osman KM, Mohamed LA, Rahman EHA, Soliman WS. 2009. Trials for vaccination of Tilapia fish against *Aeromonas* and *Pseudomonas* infections using monovalent, bivalent and polyvalent vaccines. *World Journal of Fish and Marine Sciences* 1 (4): 297-304.
- Panangala VS, Shoemaker CA, McNulty ST, Arias CR. dan Klesius PH. 2006. Intra- and interspecific phenotypic characteristics of fish-pathogenic *Edwardsiella ictaluri* and *E. tarda*. *Aquaculture Research* 37(1): 49–60.
- Panigoro N, Bahnan M, Kholidin EB dan Yuasa K. 2005. Pathogenicity of *Edwardsiella ictaluri* [http://www.was.org/meetings/-sessionAbstract.asp?MeetingCode=WA2005 & Session =55–24k](http://www.was.org/meetings/-sessionAbstract.asp?MeetingCode=WA2005&Session=55-24k) [11-08-2006].
- Parvez N, Mudarris MSA. 2014. Investigation on the Bacterial Haemorrhagic Septicemia Disease of *Cyprinus carpio* and *Channa striatus*. *Poult Fish Wildl Sci* 2: 116. <http://doi.org/10.4172/2375-446X.1000116>.
- Pasnik DJ, Evans JJ and Klesius PH. 2007. Experimental *Edwardsiella ictaluri* Infection Causes Mortality in White Perch (*Morone americana*). *Journal of Animal and Veterinary Advances* 6: 646-649.
- Pereira AMPT, Silva LJG, Meisel LM, Pena A. 2015. Fluoroquinolones and tetracycline antibiotics in a portuguese aquaculture system and aquatic surroundings: occurrence and environmental impact. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A-Current Issues*, 78, 959–975. <http://doi.org/10.1080/15287394.2015.1036185>.
- Peterman MA and Posadas BC. 2019. Direct economic impact of fish diseases on the East Mississippi catfish industry. *N. Am. J. Aquac.* 81 (3): 222–229. <https://doi.org/10.1002/naaq.10090>.
- Peterson BC, Flora C, Wood M, Bosworth BG, Quiniou SM, Greenway TE. 2016. Vaccination of full-sib channel catfish families against enteric septicemia of catfish with an oral live attenuated *Edwardsiella ictaluri* vaccine. *J. World Aquacult. Soc.* 47(2), 207-211.
- Phillips ACN, Reichley SR, Ware C, Griffin MJ. 2016. *Edwardsiella ictaluri* infection in Pangasius catfish imported from West Bengal into the southern Caribbean. *Journal of Fish Diseases*. <http://doi.org/10.1111/jfd.12552>.
- Phuoc NN. 2014. Environmental factors affecting the pathogenesis of *Edwardsiella ictaluri* in striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage) [dissertation]. University of Stirling
- Potempa J, Dubin A, Korzus G dan Travis J. 1988. Degradation of elastin by a cysteine proteinase from *Staphylococcus aureus*. *J. biol. Chem* 263: 2664-2667.
- Pridgeon JW, Shoemaker CA, Klesius PH. 2010. Identification and expression profile of multiple genes in the anterior kidney of channel catfish induced by modified live *Edwardsiella ictaluri* vaccination. *Journal Veterinary Immunology and Immunopathology* 134:184-198. <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.09.006>
- Pridgeon JW, Yeh HY, Shoemaker CA, Klesius PH. 2012. Global transcription analysis of vaccinated channel catfish following challenge with virulent *Edwardsiella ictaluri*. *Journal Veterinary Immunology and*

*Immunopathology* 146:53-61. [http://doi.org/ 10.1016/j.vetimm.2012.01.022](http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.01.022).

- Press CM, Evensen O. 1999. The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish and Shellfish Immunology* 9: 309-18.
- Pukatzki S, Ma AT, Sturtevant D, Krastins B, Sarracino D, Nelson WC, et al. 2006. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc. Natl. Acad. Sci* 103:1528–1533. <http://doi.org/10.1073/pnas.0510322103>.
- Pulpipat T, Maekawa S, Wang PC, Chen SC. 2020. Immune Responses and Protective Efficacy of a Formalin-Killed *Francisella Noatunensis* Subsp. Orientalis Vaccine Evaluated through Intraperitoneal and Immersion Challenge Methods in *Oreochromis Niloticus*. *Vaccines* 8: 163. <http://doi.org/10.3390/vaccines8020163>.
- Purwaningsih U, Novita H, Sugiani D, Andriyanto S. 2019. Identifikasi dan karakterisasi bakteri *Edwardsiella ictaluri* penyebab penyakit Enteric Septicemia of Catfish (ESC) pada ikan patin (*Pangasius* sp.). *Jurnal Riset Akuakultur* 14 (1): 47-57.
- Ramírez-Paredes JG, Mendoza-Roldan MA, Lopez-Jimena B, Shahin K, Metselaar M, Thompson KD, Penman DJ, Richards RH, Adam A. 2019. Whole cell inactivated autogenous vaccine effectively protects red Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *francisellosis* via intraperitoneal injection. *J. Fish Dis.* 42: 1191–1200.
- Rao S, Byadgil O, Pulpipat T, Wang PC, Chen SC. 2020. Efficacy of a formalin-inactivated *Lactococcus garvieae* vaccine in farmed grey mullet (Mugil cephalus). *J Fish Dis*: 1–11. [http://doi.org/ 10.1111/jfd.13260](http://doi.org/10.1111/jfd.13260).
- Rathod NB, Pagarkar AU, Pujari KH, Shingare PE, Satam SB, Phadke GG, Gaikwad BV. 2018. Status of Valuable Components from Pangasius: A Review. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 7(4): 2106-2120. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.704.241>.
- Reyes-Cerpa S, Maisey K, Reyes-Lopez F, Toro-Ascuy D, Sandino AM, Imarai M. 2012. Fish Cytokines and Immune Response. <http://doi.org/10.5772.53504>.
- Ritung S, Wahyunto, Nugroho K, Sukarman, Hikmatullah, Suparto dan Tafakresnanto C. 2011. Peta Lahan Gambut Indonesia Skala 1:250.000 (Indonesian peatland map at the scale 1:250,000). Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Sumberdaya Lahan Pertanian. Bogor. Indonesia.
- Rogge ML dan Thune RL. 2011. Regulation of the *Edwardsiella ictaluri* type III secretion system by pH and phosphate concentration through EsrA, EsrB, and EsrC. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 4293–4302.
- Rogge ML, Dubytska L, Jung TS, Wiles J, Elkamel AA, Rennhoff A, Oanh DTH, Thune RL. 2013. Comparison of Vietnamese and US isolates of *Edwardsiella ictaluri*. *Diseases of Aquatic Organisms* 106:17-29. <http://doi.org/10.3354/dao02620>.
- Russo R, Shoemaker CA, Panangala VS, Klesius PH. 2009. In vitro and in vivo interaction of macrophages from vaccinated and non-vaccinated channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Fish and Shellfish Immunology* 26:543-552. [http://doi.org/ 10.1016/j.fsi.2009.02.011](http://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.02.011).
- Saanin, H. 1984. Taksonomi dan Kunci Identifikasi Ikan. Jakarta. Bina Cipta.

- Sakai T, Kuwada T, Muto Y, Takano T, Yuasa K, Oseko N. 2018. Comparative Proteomic Analysis Between Virulent and Less Virulent Strains of *Edwardsiella ictaluri* Isolated from Ayu *Plecoglossus altivelis*. *Journal of Fish Pathology* 53(1):29-35.
- Santander J, Mitra A, Curtiss R. 2011. Phenotype, virulence and immunogenicity of *Edwardsiella ictaluri* cyclic adenosin 3',5'-monophosphate receptor protein (Crp) mutants in catfish host. *Journal of Fish and Shellfish Immunology* 31: 1142-1153. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.10.009>.
- Santander J, Martin T, Loh A, Pohlenz C, Gatlin DM 3rd, Curtiss R. 2013. Mechanisms of intrinsic resistance to antimicrobial peptides of *Edwardsiella ictaluri* and its influence on fish gut inflammation and virulence. *Microbiology* (159 (Pt 7):1471–86. Epub 2013/05/17. <https://doi.org/10.1099/mic.0.066639-0>.
- Santander J, Kilbourne J, Park J, Martin T, Loh A, Diaz I, Rojas R, Segovia C, DeNardo D, Curtis R. 2014. Inflammatory Effects of *Edwardsiella ictaluri* Lipopolysaccharide Modifications in Catfish Gut. *Journal of Infection and Immunity* : 3394-3404. <http://doi.org/10.1128/IAI.01697-14>.
- Saurabh S & Sahoo PK. 2008. Lysozyme: An important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research* 39: 223–239. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01883.x>
- Schar D, Klein EY, Laxminarayan R, Gilbert M, Van Boeckel TP. 2020. Global trends in antimicrobial use in aquaculture. *Scientific Reports* 10:21878. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78849-3>.
- Secombes CJ, Wang T and Bird S. 2011. The interleukins of fish. *Dev Comp Immunol* 35: 1336–1345.
- Shoemaker CA, Klesius PH, Evans JJ. 2007. Immunization of eyed channel catfish, *Ictalurus punctatus*, eggs with monovalent *Flavobacterium columnare* vaccine and bivalent *F. Columnare* and *Edwardsiella ictaluri* vaccine. *Journal of Vaccine*. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.09.055>.
- Shoemaker CA, Klesius PH, Bricker JM. 1999. Efficacy of a modified live *Edwardsiella ictaluri* vaccine in channel catfish as young as seven days post hatch. *Aquaculture* 176(3-4), 189-193.
- Shotts EB, Blazer VS, Waltman WD. 1986. Pathogenesis of experimental *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 43:36-42.
- Sirimanapong W, Thompson KD, Ei Lin Ooi EL, Bekaert M, Collet B, Taggart JB, Bron JE, Green DM, Shinn AP, Adams A, Michael J, Leaver MJ. 2015. The effects of feeding  $\beta$ -glucan to *Pangasianodon hypophthalmus* on immune gene expression and resistance to *Edwardsiella ictaluri*. *Fish Shellfish Immunol* 47(1):595-605. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.09.042>.
- Skinner LA, Schulte PM, Balfry SK, McKinley RS, LaPatra SE. 2010. The association between metabolic rate, immune parameters, and growth performance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following the injection of DNA vaccine alone and concurrently with a polyvalent, oil-adjuvanted vaccine. *Fish & Shellfish Immunology* 28: 387 – 393.
- Slauson DO, Cooper BJ. 2002. Mechanisms of disease: A Textbook of Comparative General Pathology. Third edition. Mosby united states.

- [SNI] Standar Nasional Indonesia. 01-6483.3-2000. 2000. Produksi induk ikan patin siam (*Pangasius hypophthalmus*) kelas induk pokok (Parent Stock). Badan Standardisasi Nasional Indonesia.
- [SNI] Standar Nasional Indonesia. 01-2332.3-2006. 2006. Metode uji mikrobiologi – bagian 3: Penentuan jumlah angka lempeng total (ALT) pada produk perikanan. Badan Standardisasi Nasional Indonesia.
- [SNI] Standar Nasional Indonesia. 7545.1. 2009. Metode identifikasi bakteri pada ikan secara konvensional – Bagian 1: *Edwardsiella ictaluri*.
- Song M, Kang Y, Zhang D, Chen L, Bi J, Zhang H, Zhang L, Qian A, Shan X. 2018. Immunogenicity of extracellular products from an inactivated vaccine against *Aeromonas veronii* TH0426 in koi, *Cyprinus carpio*. *Fish and Shellfish Immunology*. 81:176–181. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.07.004>.
- Soto E, Griffin M, Arauz M, Riofrio A, Martinez A, Cabrejos ME. 2012. *Edwardsiella ictaluri* as the causative agent of mortality in cultured Nile Tilapia. *Journal of Aquatic Animal Health* (24):81–90.
- Srinivasa Rao PS, Yamada Y, Tan YP dan Leung KY. 2004. Use of proteomics to identify novel virulence determinants that are required for *Edwardsiella tarda* pathogenesis. *Mol. Microbiol* 53:573–586.
- Stanley LA, Hudson JS, Schwedler TE dan Hayasaka SS. 1994. Extracellular products associated with virulent and avirulent strains of *Edwardsiella ictaluri* from channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health* 6:36-43.
- Stenvik J, Jorgensen TO. 2000. Immunoglobulin D (IgD) of Atlantic cod has a unique structure. *Immunogenetics*. 51(6):452-461.
- Suanyuk N, Rogge M, Thune R, Watthanaphiromsakul M, Champhat N, Wiangkum W. 2014. Mortality and pathology of hybrid catfish, *Clarias macrocephalus* (Gunther) x *Clarias gariepinus* (Burchell), associated with *Edwardsiella ictaluri* infection in southern Thailand. *Journal of Fish Diseases* 37: 385-395. <http://doi.org/10.1111/jfd.12127>.
- Subagja J, Slembrouck J, Hung LT dan Legendre M. 1999. Larval rearing of an Asian catfish *Pangasius hypophthalmus* (Siluroidei, Pangasiidae): Analysis of precocious mortality and proposition of appropriate treatments. *Aquatic Living Resources* 12(1): 37-44.
- Sugiani D. 2012. Vaksin Bivalen untuk pencegahan penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* dan *Streptococcosis* pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) [disertasi]. Bogor. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Sugiani D, Sukenda S, Harris E, Lusiastuti AM. 2013. Vaksinasi pada ikan nila (*O. niloticus*) menggunakan vaksin monovalen dan bivalen untuk penyakit motile aeromonas septicemia dan streptococcosis. *Jurnal Riset Akuakultur* 8(2):230-239.
- Suhermanto A. 2019. Vaksin polivalen *Streptococcus agalactiae* untuk pencegahan penyakit Streptococcosis pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*). [disertasi]. Bogor. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Supriyadi, H., Widiyati, A., Sunarto, A., & Prihadi, T.H. 2005. Keragaan penyakit bacterial ikan nila (*Oreochromis niloticus*) pada keramba jaring apung (KJA) di Lokasi Berbeda, *J. Pen. Perik. Indonesia* 11(7): 35–41.
- Sunatmo TI. 2012. Mikrobiologi Esensial. Percetakan Ardy Agency. Bogor.



- Sun L, Liu S, Wang R, Li C, Zhang J, Liu Z. 2014. Pathogen recognition receptors in channel catfish: Identification, phylogeny and expression analysis of peptidoglycan recognition proteins. *Dev. Comp. Immunol.* 46(2), 291-299.
- Sukenda S, Romadhona EI, Yuhana M, Pasaribu W, Hidayatullah D. 2018. Efficacy of whole-cell and lipopolysaccharide vaccine of *Aeromonas hydrophila* on juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* against motile aeromonad septicemia. *AAFL Bioflux* 11 issue 5. <http://www.bioflux.com.ro/aafl>.
- Tahapari E, Ariyanto D, Gunadi B. 2008. Optimasi pemberian pakan buatan pada pendederan ikan patin (*Pangasius hypophthalmus*) dikolam yang dipupuk. *Jurnal perikanan* 10(1): 45-52.
- Takedar HC, Blom J, Kalindamar S, Nho S, Karsi A, Lawrence ML. 2020. Comparative genomics of the fish pathogens *Edwardsiella ictaluri* 93-146 and *Edwardsiella piscicida* C07-087. *Microbial Genomics* 6. <http://doi.org/10.1099/mgen.0.000322>.
- Thin NH, Kuo TY, Hung LT, Loc TH, Chen SC, Evensen O, Schuurman HJ. 2009. Combined immersion and oral vaccination of Vietnamese catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) confers protection against mortality caused by *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Fish and Shellfish Immunology* 227: 773-776. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.08.012>.
- Thomas DC. 2017. The Phagocyte Respiratory Burst: Historical Perspectives and Recent Advances. *Immunology Letters*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2017.08.016>.
- Thune RL, Plumb JA. 1982. Effect of delivery method and antigen preparation on the production of antibodies against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish. *Progressive Fish-Culturist* 44: 53 - 54.
- Thune RL, Fernandez DH, Benoit JL, Kelly-Smith M, Rongge ML, Booth NJ, Landry CA, Bologna RA. 2007. Signature-Tagged Mutagenesis of *Edwardsiella ictaluri* Identifies Virulence-Related Genes, Including a *Salmonella* Pathogenicity Island 2 Class of Type III Secretion Systems. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 7934-7946 p.
- Toranzo AE, Romalde JL, Magarinos B, Barja JL. 2009. Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases. The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture. *Options Mediterraneennes A* 86: 155 – 176.
- Triet TH, Tinh BT, Hau LV, Huong TV, Binh NQ. 2019. Development and potential use of an *Edwardsiella ictaluri* wzz mutant as a live attenuated vaccine against enteric septicemia in *Pangasius hypophthalmus* (Tra catfish). *Fish Shellfish Immunol.* 87: 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.01.005>.
- Trujillo M, Alvarez B, Souza JM, Natalia R, Castro L, Thomson L dan Rafael Radi R. 2010. Mechanisms and Biological Consequences of Peroxynitrite-Dependent Protein Oxidation and Nitration. Nitric Oxide: Biology and Pathobiology. second edition .Academic Press. Inc. 76p.
- Vivas J, Razquin B, Lopez-Fierro P, Villena AJ. 2005. Modulation of the immune response to an *Aeromonas hydrophila* aroA live vaccine in rainbow trout: effect of culture media on the humoral immune response and complement consumption. *Fish and Shellfish Immunology* 18: 223-233.



- Wang Q, Yang M, Xiao J, Wu H, Wang X, Lv Y, et al. 2009. Genome Sequence of the Versatile Fish Pathogen *Edwardsiella tarda* Provides Insights into its Adaptation to Broad Host Ranges and Intracellular Niches. *PLoS ONE* 4(10): e7646. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007646>.
- Wang X, Wang Q, Xiao J, Liu Q, Wu H, et al. 2010. Hemolysin EthA in *Edwardsiella tarda* is essential for fish invasion in vivo and in vitro and regulated by two-component system EsrA-EsrB and nucleoid protein HhaEt. *Fish and Shellfish Immunology* 29: 1082-1091.
- Wang T, Huang W, Costa MM, Secombes CJ. 2011. The gamma-chain cytokine/receptor system in fish: more ligands and receptors. *Fish Shellfish Immunol.* 31(5):673-687.
- Wang R, Xiao T, Zeng L, Liu X, Zhou Y, Ma J. 2016. Generation and use of *Edwardsiella ictaluri* ghosts as a vaccine against enteric septicemia of catfish (ESC). *Journal of Aquaculture.* <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.01.017>.
- Waltman WD, Shotts EB, Hsu TC. 1986. Biochemical characteristics of *Edwardsiella ictaluri*. *Applied and Environmental Microbiology* 51, 101–104
- Whyte SK. 2007. The innate immune response of finfish—a review of current knowledge,” *Fish & Shellfish Immunology* 23 (6): 1127–1151.
- Williams ML, Lawrence ML. 2005. Identification and Characterization of a two-component hemolysin from *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Veterinary Microbiology* 108:281-289. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.04.017>.
- Williams ML, Lawrence ML. 2010. Verification of an *Edwardsiella ictaluri* specific diagnostic PCR. *Journal Applied Microbiology*, 50, 153-157.
- Williams ML, Gillaspay AF, Dyer DW, Thune RL, Waldbieser GL, Schuster GC, Gibson J, Zaitshik J, Landry C, Banes MM, Lawrence ML. 2012. Genome Sequence of *Edwardsiella ictaluri* 93-146, a Strain Associated with a Natural Channel Catfish Outbreak of Enteric Septicemia of Catfish. *Journal of Bacteriol* 193(3): 740-741
- Wise DJ, Greenway TE, Byars TS, Griffin MJ, Khoo LH. 2015. Oral vaccination of channel catfish against enteric septicemia of catfish using a live attenuated *Edwardsiella ictaluri* isolate. *J Aquat Anim Health.* 27:135–43. <http://doi.org/10.1080/08997659.2015.1032440>
- Woodland R. 2011. European regulatory requirements for veterinary vaccine safety and potency testing and recent progress towards reducing animal use. *Procedia in Vaccinology*, 5, 151–155. <http://doi.org/10.1016/j.provac.2011.10.013>.
- World Organization for Animal Health. 2006. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals : Enteric Septicaemia of Catfish (*Edwardsiella ictaluri*). *OIE*. Hal. 214 – 22.
- Wu L, Qin Z, Liu H, Lin L, Ye J and Li J. 2020. Recent Advances on Phagocytic B Cells in Teleost *Fish*. *Front. Immunol.* 11:824. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00824>
- Xie HX, et al. 2010. EseG, an effector of the type III secretion system of *Edwardsiella tarda*, triggers microtubule destabilization. *Infect. Immun.* 78: 5011–5021.



- Ye S, Li H, Qiao G, Li Z. 2009. First case of *Edwardsiella ictaluri* infection in China farmed yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Journal of Aquaculture* 292: 6-10. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.03.036>.
- Yuasa K, Kholidin EB, Panigoro N, Hatai K. 2003. First isolation of *Edwardsiella ictaluri* from cultured striped catfish *Pangasius hypophthalmus* in Indonesia. *Fish Pathol* 38 (4): 181-183.
- Zhang J, Zou W, Yan Q. 2008. Non-Specific immune responsse of Bullfrog *Rana catesbeiana* to intraperitoneal injection of bacterium *Aeromonas hydrophila*. *Chinesse Journal of Oceanology and Limnology* 26(3): 248-255.
- Zhou T, Yuan Z, Tan S, Jin Y, Yang Y, Shi H, Wang W, Niu D, Gao L, Jiang W, Gao D and Liu Z. 2018. A review of molecular responses of catfish to bacterial diseases and abiotic stresses. *Front. Physiol* 9:1113. <http://doi.org/10.3389/fphys.2018.01113>.
- Zhu W, Zhang Y, Zhang J, Yuan G, Liu X, Ai T, Su J. 2019. Astragalus polysaccharides, chitosan and poly(I:C) obviously enhance inactivated *Edwardsiella ictaluri* vaccine potency in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *J. Fish and Shellfish Immunology* 88: 293-300.

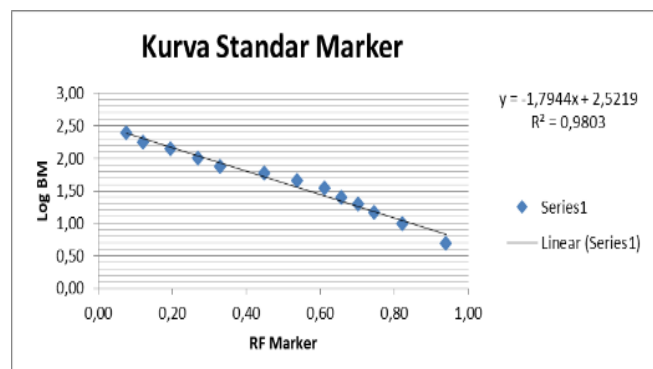
## LAMPIRAN

Lampiran 1 Hasil SDS- PAGE protein sel utuh dan ECP bakteri *E. ictaluri*

Jarak Pita	Marker	rf Marker	BM Marker	log BM	Sampel A	rf sampel	log BM	BM
1	0,5	0,07	245	2,39	1,40	0,21	2,15	140,00
2	0,8	0,12	180,0	2,26	1,60	0,24	2,09	123,76
3	1,3	0,19	140	2,15	1,80	0,27	2,04	109,40
4	1,8	0,27	100	2,00	2,10	0,31	1,96	90,93
5	2,2	0,33	75	1,88	2,5	0,37	1,85	71,06
6	3	0,45	60	1,78	2,90	0,43	1,74	55,53
7	3,6	0,54	45	1,65	3,1	0,46	1,69	49,08
8	4,1	0,61	35	1,54	3,3	0,49	1,64	43,39
9	4,4	0,66	25	1,40	3,5	0,52	1,58	38,36
10	4,7	0,70	20	1,30	4,10	0,61	1,42	26,50
11	5	0,75	15	1,18	4,30	0,64	1,37	23,42
12	5,5	0,82	10	1,00	4,50	0,67	1,32	20,70
13	6,3	0,94	5	0,70	5,10	0,76	1,16	14,30
Jarak CBB	6,7				5,5	0,82	1,05	11,18

Sampel B	rf sampel	log BM	BM	Sampel C	rf sampel	log BM	BM
2,50	0,37	1,85	71,06	2,50	0,37	1,85	71,06
2,90	0,43	1,74	55,53	2,90	0,43	1,74	55,53
3,10	0,46	1,69	49,08	3,10	0,46	1,69	49,08
3,30	0,49	1,64	43,39	3,30	0,49	1,64	43,39
3,5	0,52	1,58	38,36	3,5	0,52	1,58	38,36
4,10	0,61	1,42	26,50	4,10	0,61	1,42	26,50
4,30	0,64	1,37	23,42	4,30	0,64	1,37	23,42
4,5	0,67	1,32	20,70	4,5	0,67	1,32	20,70
5,1	0,76	1,16	14,30	5,1	0,76	1,16	14,30
5,50	0,82	1,05	11,18	5,50	0,82	1,05	11,18

Sampel D,E dan F	rf sampel	log BM	BM
5,10	0,76	1,16	14,30
5,50	0,82	1,05	11,18



## Lampiran 2 Pengujian Kadar Formalin dengan Metode AOAC (1990)

Pengujian ini melalui beberapa tahapan proses penetapan, diawali pembuatan larutan baku formalin 100g/mL, penetapan formalin dan penghitungan kadar formalin.

### 1. Pembuatan larutan baku formalin 100 g/mL

- Larutan formaldehyde 37% bj 1,08 kg/L diambil sebanyak 5 ml dan dilarutkan dengan akuades dalam labu takar 100 ml (larutan a)
- Larutan a diambil sebanyak 5 mL dan diencerkan dengan akuades dalam labu takar 100 mL (larutan b)
- Larutan b sebanyak 25 mL diencerkan dengan akuades dalam labu takar 100 mL (larutan c). Larutan ini mengandung 100 g/mL (ppm)
- Pereaksi nash : 150 g amonium asetat, 3 mL asam asetat dan 2 mL asetilaseton dilarutkan dalam akuades hingga volume 1 liter

### 2. Penetapan formalin

- Contoh ditimbang dengan teliti sebanyak 10 g, dimasukkan kedalam erlenmeyer dan ditambah akuades, kemudian disuling
- Hasil penyulingan ditampung dalam labu takar 100 mL dan diencerkan dengan akuades hingga garis penanda
- Hasil penyulingan diambil sebanyak 1 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan 1 mL akuades dan 2 ml pereaksi nash kemudian dipanaskan pada pemanas air suhu 37°C untuk membentuk warna
- OD ditentukan dengan spektrofotometer pada  $\lambda$  415 nm. Dilakukan pengerjaan pada no 3 dan pembacaan yang sama untuk larutan standar 4, 8, 12, 16, dan 20 ppm dan akuades sebagai blanko

### Lampiran 3 Hasil analisis formalin pada sediaan vaksin *E. ictaluri* dan ikan patin

No/Terbitan/Revisi: F.5,10-01-01/III/0



LABORATORIUM PENGUJIAN  
BALAI BESAR RISET PENGOLAHAN PRODUK DAN BIOTEKNOLOGI  
KELAUTAN DAN PERIKANAN  
BADAN RISET SUMBER DAYA MANUSIA  
KELAUTAN DAN PERIKANAN  
Jl. K.S. Tubun Petamburan VI, Jakarta Pusat 10260  
Telp. 021-53650157, Fax. 021-53650158  
Website: www.bbp4b.litbang.kkp.go.id Email: pproduk.biotek@kkp.go.id

#### LAPORAN HASIL UJI

Nomor : 25/Kimia/Int/IV/2021  
Laboratorium : Kimia  
Jenis Sampel : Ikan Patin dan Cairan  
Tgl. Penerimaan Sampel : 15 April 2021

Kode Sampel	Kandungan Formaldehida dalam sampel (mg/kg)
A	32,8002
	33,3455
B	32,5443
	31,5118
C	33,5344
	31,7411
D	32,3593
	30,7520
E	31,1870
	29,9803
F	30,3110
	28,0748
G	34,8524
	32,9065

Kode Sampel	Kandungan Formaldehida dalam sampel (mg/kg)
H	1,5463
	1,6585
I	2,1969
	2,3346
J	1,3376
	1,3967
K	1,9360
	2,1004
L	1,6388
	1,3681
M	1,0305
	1,0896
N	1,3514
	1,5128
O	0,8711
	0,8898

Kode Sampel	Kandungan Formaldehida dalam sampel (mg/kg)
A	0,5897
	0,5457
B	0,5407
	0,5444
C	0,5359
	0,5310

Sampel ikan kode A-G :  
tidak terdeteksi kandungan formaldehida

Catt: kode A-G larutan berwarna coklat muda, bukan putih bening, berpengaruh thadap data

Mengetahui,  
Kepala Laboratorium  
Bidang Kimia,

(Dr. Fera Roswita Dewi, M.Si)

Jakarta, 26 April 2021  
Yang membuat laporan  
Penguji,

(Helena Manik, A.Md)

\* Keterangan:

- Hasil analisis ini didasarkan pada contoh sebagaimana diterima laboratorium

## RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di kota Klaten pada tanggal 22 Januari 1981 sebagai anak pertama dari pasangan bapak Sri Purwanto dan ibu Suwarni. Penulis menyelesaikan pendidikan dasar dan menengah di SDN 06 Pesanggrahan Jakarta lulus tahun 1993, SMPN 177 Jakarta lulus tahun 1996, dan SMAN 1 Klaten lulus tahun 1999. Pendidikan sarjana ditempuh di Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, dan lulus pada tahun 2004. Pada tahun 2011, penulis diterima sebagai mahasiswa program magister (S-2) di Program Studi Mikrobiologi Medik pada Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor dan menamatkannya pada tahun 2013. Kesempatan untuk melanjutkan ke program doktor pada program studi Ilmu Akuakultur Sekolah Pascasarjana IPB diperoleh pada tahun 2018 dengan beasiswa pendidikan pascasarjana yang diperoleh dari Badan Riset Sumberdaya Manusia Kelautan dan Perikanan (BRSDMKP) Kementerian Kelautan dan Perikanan.

Penulis bekerja sebagai peneliti madya di Badan Riset Sumberdaya Manusia Kelautan dan Perikanan, Kementrian Kelautan dan Perikanan sejak tahun 2005, ditempatkan di Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan sejak tahun 2005 hingga sekarang pada bidang kesehatan ikan.

Penulis menikah pada tahun 2005 dengan Agus Karyono dan dikaruniai 3 orang anak yaitu Fathia Qutrotunada Alifa (15 tahun), Fahira Amalia Khairunnisa (13 tahun) dan Dirga Asgadipa Ghazi Alfarizky (3 tahun). Selama menempuh pendidikan program doktor, penulis telah mempublikasikan sebagian dari hasil riset berupa dua artikel, masing – masing pada jurnal internasional terindeks scopus yaitu *The Phenotypic, Genotypic and Pathogenicity Comparison of Edwardsiella ictaluri Indonesian Local Isolates Causing Enteric Septicemia of Catfish* pada jurnal *Aquaculture Research* dan *The Identification of Virulence Genes and Pathogenicity of Edwardsiella ictaluri Indonesian Local Isolates From Catfish (Pangasianodon hypophthalmus)* pada jurnal *Aquaculture International*, saat ini kedua artikel tersebut dalam proses *under review*. Karya-karya ilmiah tersebut merupakan bagian dari program S3 penulis.