

TESIS

**EFEK PEMBERIAN BAKTERI *Aeromonas hydrophila* YANG
DIPANASKAN (BAKTERIN) TERHADAP RESPON IMUN
HUMORAL SPESIFIK DAN DAYA PROTEKSI
IKAN MAS (*Cyprinus carpio* L.)**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK



WAHJU TJAHJANINGSIH

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
1999**

**EFEK PEMBERIAN BAKTERI *Aeromonas hydrophila* YANG
DIPANASKAN (BAKTERIN) TERHADAP RESPON IMUN
HUMORAL SPESIFIK DAN DAYA PROTEKSI
IKAN MAS (*Cyprinus carpio* L.)**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK

TESIS

Untuk memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Immunologi
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Oleh :

WAHJU TJAHJANINGSIH

NIM. 099612275M

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
1999**

Lembar Pengesahan

Karya tulis ilmiah ini

telah disetujui pada tanggal 25 Agustus 1999

Oleh :

Pembimbing Ketua,



Prof. Atasiati Idajadi, SpMK., dr.

NIP. 130 128 215

Pembimbing,



Didik Handijatno, MS., drh.

NIP. 130 933 208

Mengetahui

Ketua Program Studi Imunologi

Program Pascasarjana Universitas Airlangga,



Dr. Fedik Abdul Rantam, drh.

NIP.131 653 434

Telah diuji tanggal 25 Agustus 1999

PANITIA PENGUJI TESIS

KETUA : Dr. H. Sarmanu, MS., drh.

ANGGOTA : 1. Prof. Atasiati Idajadi, SpMK., dr.

2. Didik Handijatno, MS., drh.

3. Neneng K. Djinawi, MSc. SpMK., dr.

4. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur ke hadirat Allah Yang Maha Pengasih atas segala berkat dan karunia-Nya, sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Dengan tersusunnya tesis ini, perkenankan saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat :

Rektor Universitas Airlangga, Prof. Soedarto, PhD., DTMH, dr. dan Prof. Bambang Rahino, dr. selaku mantan Rektor Unair atas kesempatan dan fasilitas yang telah diberikan kepada saya untuk mengikuti program Magister.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr. Soedijono, dr. yang telah banyak membantu hingga saya dapat menyelesaikan program Magister.

Ketua dan mantan Ketua Program Studi Imunologi Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Dr. Fedik Abdul Rantam, drh. dan almarhum Prof. Dr. Noor Rachman, SpMK., dr. yang telah banyak membantu hingga saya dapat menyelesaikan program Magister.

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Dr. Ismudiono, MS., drh. dan Prof. Dr. H. Rochiman Sasmita, MS., drh. sebagai mantan Dekan FKH Unair, atas kesempatan yang diberikan hingga saya dapat mengikuti program Magister.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya juga saya ucapkan kepada Prof. Atasiati Idajadi, SpMK., dr. selaku Pembimbing Ketua yang dengan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran yang amat berharga dan sangat berguna dalam penyusunan mulai dari proposal sampai selesainya tesis ini.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya juga saya ucapkan kepada Didik Handijatno, MS., drh. sebagai pembimbing yang dengan amat teliti dan penuh perhatian telah memberikan bimbingan dan saran yang amat berharga demi sempurnanya penyusunan mulai dari proposal sampai selesainya tesis ini.

Ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada Kepala Laboratorium Virologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Rahaju Ernawati, MSc., drh. Kepala Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Didik Handijatno, MS., drh. atas fasilitas dan sarana laboratorium yang telah diberikan selama penelitian berlangsung, serta dorongan dalam penyelesaian tesis ini.

Ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada Dr. H. Sarmanu, MS., drh. dan Kusnoto, drh. yang telah membantu memberi bimbingan metodologi

penelitian dan analisis statistik hingga penelitian dan penulisan tesis dapat berjalan dengan lancar.

Ibu dan Bapak tercinta, atas doa yang tulus diberikan kepada penulis agar dapat menyelesaikan pendidikan Program Magister.

Suami tercinta, Jan Jacobus Silawanebessy dan kedua putraku tersayang, Anggara Squibbson Silawanebessy dan Nathan Newell Silawanebessy, atas doa, dorongan moril, kesabaran, pengertian, keikhlasan dan pengorbanan yang diberikan mulai dari awal pendidikan Program Magister hingga selesainya tesis ini.

Akhirnya dengan penuh keikhlasan, penulis hanya dapat memohonkan doa kepada Allah Yang Maha Besar, semoga melimpahkan segala berkat dan karunia-Nya kepada semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan pendidikan Program Magister ini. Amin.

RINGKASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek pemberian bakterin *A. hydrophila* baik melalui perendaman maupun infiltrasi hiperosmotik terhadap respon imun humoral spesifik yang digambarkan melalui terbentuknya antibodi serta daya proteksi ikan mas terhadap infeksi *A. hydrophila*. Antibodi yang terbentuk ditentukan dengan uji aglutinasi dengan prosedur mikrotiter dan daya proteksi ikan mas didasarkan atas kemampuan ikan mas untuk tetap survival setelah diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophila* yang ditentukan melalui persentase relatif proteksi.

Sampel penelitian berupa serum darah ikan mas yang diambil setiap minggu dan berasal dari ikan mas kelompok kontrol, kelompok pemberian bakterin melalui perendaman dan infiltrasi hiperosmotik. Sampel serum darah tersebut diukur titer antibodinya dengan uji aglutinasi prosedur mikrotiter. Sampel lainnya berupa organ ginjal dan hati dari semua ikan mas yang mati selama 7 hari pengamatan setelah ditantang dengan bakteri *A. hydrophila* pada minggu kedua, keempat, keenam, dan kedelapan dilakukan isolasi dan identifikasi untuk mengkonfirmasi penyebab kematian.

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Split Plot Design*. Untuk mengetahui pengaruh variabel bebas (cara pemberian bakterin dan waktu pengambilan serum serta pemberian infeksi) terhadap variabel tergantung (titer antibodi serum dan daya proteksi ikan mas) digunakan analisis varians dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata terkecil (BNT). Data yang dianalisis diperoleh dari titer antibodi serum selama delapan minggu dan daya proteksi ikan mas yang digambarkan melalui persentase relatif ikan hidup setelah

diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophila* pada minggu kedua, keempat, keenam, dan kedelapan. Untuk mengetahui adanya korelasi antara kedua variabel tersebut, dilakukan pengujian dengan korelasi Pearson.

Hasil penelitian menunjukkan pemberian bakterin *A. hydrophila* pada ikan mas baik melalui metode perendaman maupun infiltrasi hiperosmotik dapat menimbulkan antibodi dan daya proteksi ikan mas terhadap infeksi *A. hydrophila*. Rata-rata titer antibodi (log 2) yang terbentuk setelah pemberian bakterin melalui perendaman mencapai puncaknya pada minggu kelima (10,85), sedangkan dengan metode infiltrasi hiperosmotik, antibodi yang terbentuk mencapai puncaknya pada minggu keenam (11,60). Daya proteksi yang ditimbulkan akibat pemberian bakterin adalah 96,67% pada minggu kedua, sedangkan pada minggu keempat sampai minggu kedelapan sebesar 100 %.

Pada penelitian ini dijumpai adanya korelasi yang sangat erat ($R = 0,809$) antara titer antibodi serum dengan daya proteksi ikan mas terhadap infeksi *A. hydrophila*.

Setelah pemberian infeksi pada minggu kedua, keempat, keenam, dan kedelapan dijumpai adanya peningkatan titer antibodi serum ikan mas pada kelompok pemberian bakterin yang tetap hidup setelah diinfeksi oleh bakteri *A. hydrophila*. Peningkatan titer antibodi serum tersebut merupakan respon anamnestik atau respon imun sekunder.

Manfaat penelitian ini bagi bidang ilmu pengetahuan, terutama Imunologi pada ikan, khususnya dalam mengembangkan penggunaan vaksin sebagai alternatif pencegahan penyakit pada ikan yang dibudidayakan. Selain itu

juga memberi informasi bahwa pemberian bakterin *A. hydrophila* dapat mencegah penyakit *Haemorrhage Septicemia* pada ikan mas dan pemberian "booster" perlu dilakukan bila pemeliharaan ikan mas pada kolam pembesaran lebih dari empat bulan, walaupun titer antibodi serum yang terbentuk masih tinggi hingga tiga bulan setelah vaksinasi dengan bakterin *A. hydrophila*.

ABSTRACT

Serum antibody production and protection against *A. hydrophila* was examined in carp fish (*Cyprinus carpio* L.). Heat killed (bacterin) *A. hydrophila* was given by direct immersion and hyperosmotic infiltration at a dose of 10^8 cells/ml and there was different in antibody titers between immersion and hyperosmotic infiltration groups. Following the administration of bacterin, titer reached the peak in five weeks in carp fish from immersion groups and six weeks in carp fish from hyperosmotic infiltration groups. Upon challenge, the protective ability were significantly different between control and bacterin administration groups, but not statistically different between immersion and hyperosmotic infiltration groups. A relatif level of 100% was obtained within four weeks, six weeks, and eight weeks and 96,67% was found two-weeks post-bacterin administration. This study indicates that administration of bacterin *A. hydrophila* by direct immersion or hyperosmotic infiltration resulted in increased protective immunity.

Key Words : bacterin, immersion, hyperosmotic infiltration

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	iii
DAFTAR GAMBAR	iv
DAFTAR LAMPIRAN	v
1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.3.1 Tujuan Umum	7
1.3.2 Tujuan Khusus	7
1.4 Manfaat Penelitian	8
2 TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Ikan Mas	9
2.1.1 Sistematika	9
2.1.2 Morfologi	9
2.2 Respon Imun Humoral Pada Ikan	12
2.2.1 Pengolahan dan Presentasi Antigen	12
2.2.2 Aktivasi Sel	14
2.2.3 Pembentukan Antibodi	15
2.2.4 Immunoglobulin	17
2.3 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Respon Imun Pada Ikan	19
2.3.1 Faktor Ekstrinsik	20
2.3.2 Faktor Intrinsik	22
2.4 <i>Aeromonas hydrophila</i>	23
2.4.1 Habitat	23
2.4.2 Morfologi	24
2.4.3 Kultur dan Identifikasi	24
2.4.4 Epizootiologi	25
2.4.5 Patologi Klinik	26
2.4.6 Pengendalian	27

3	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	29
3.1	Kerangka Konseptual	29
3.2	Bagan Konseptual	32
3.3	Hipotesis Penelitian	32
4	METODE PENELITIAN	34
4.1	Rancangan Penelitian	34
4.2	Sampel dan Besar Sampel	34
4.3	Variabel Penelitian	35
4.3.1	Klasifikasi Variabel	35
4.3.2	Definisi Operasional Variabel	35
4.4	Bahan dan Materi Penelitian	36
4.4.1	Bahan	36
4.4.2	Materi Penelitian	36
4.5	Peralatan Penelitian	38
4.6	Tempat dan Waktu Penelitian	39
4.7	Prosedur Penelitian	39
4.7.1	Persiapan Ikan	39
4.7.2	Penentuan <i>Lethal Dose 50</i>	40
4.7.3	Pemberian Antigen	41
4.7.4	Pengambilan Serum	41
4.7.5	Penentuan Titer Antibodi Serum	42
4.7.6	Uji Tantang	42
4.7.7	Pemantauan Kualitas Air	43
4.8	Teknik Analisis Data	43
4.9	Kerangka Kerja	44
5	HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	45
5.1	Hasil Penelitian	45
5.2	Analisis Data	54
6	PEMBAHASAN	59
7	KESIMPULAN DAN SARAN	78
7.1	Kesimpulan	78
7.2	Saran	79
	DAFTAR PUSTAKA	81
	LAMPIRAN	88

DAFTAR TABEL

	halaman
Tabel 5.1 : Hasil Identifikasi dan Status Immunologis dari 50 Ekor Sampel Ikan Mas Sebelum Perlakuan	45
Tabel 5.2 : Titer Antibodi Serum (Log2) Ikan Mas Kelompok Kontrol dan Kelompok Pemberian Bakterin terhadap <i>A. hydrophila</i> Selama Delapan Minggu.....	47
Tabel 5.3 : Persentase Ikan Mas yang Mati pada Penentuan LD-50 <i>A. hydrophila</i>	49
Tabel 5.4 : Persentase Ikan Mati dan Persentase Ikan Hidup Kelompok Kontrol dan Kelompok Pemberian Bakterin Setelah Diinfeksi <i>A. hydrophila</i> pada Minggu Kedua, Keempat, Keenam, dan Kedelapan	50
Tabel 5.5 : Rata-Rata Titer Antibodi Serum (Log2) Ikan Mas dari Kelompok Perendaman dan Infiltrasi Hiperosmotik Sebelum dan Sesudah Diinfeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	52
Tabel 5.6 : Hasil Kualitas Air dalam Bak Ikan Mas Sebelum dan Sesudah Pergantian Air	54
Tabel 5.7 : Hasil Pengujian Statistik dengan Uji BNT terhadap Rata-Rata Titer Antibodi Serum (Log2) Ikan Mas Kelompok Kontrol dan Kelompok Pemberian Bakterin terhadap <i>A. hydrophila</i> Selama Delapan Minggu (data ditransformasi ke $\sqrt{x + 0,5}$)	55
Tabel 5.8 : Hasil Pengujian Statistik dengan Uji BNT terhadap Rata-Rata Daya Proteksi Ikan Mas Kelompok Kontrol dan Kelompok Pemberian Bakterin terhadap <i>A. hydrophila</i> (data ditransformasi ke Arc. Sine $\sqrt{p/100}$)	57

DAFTAR GAMBAR

	halaman
Gambar 5.1 : Kinetis respon imun humoral spesifik pada ikan mas dari kelompok kontrol, kelompok perendaman dan kelompok infiltrasi hiperosmotik	48
Gambar 5.2 : Diagram batang yang menggambarkan daya proteksi ikan mas dari kelompok kontrol, kelompok perendaman, dan kelompok infiltrasi hiperosmotik setelah diinfeksi pada minggu kedua, keempat, keenam, dan kedelapan	51
Gambar 5.3 : Diagram batang yang menggambarkan titer antibodi serum ikan mas dari kelompok perendaman dan kelompok infiltrasi hiperosmotik pada pre-infeksi dan post-infeksi	53
Gambar 5.4 : Model regresi yang menghubungkan antara titer antibodi dengan daya proteksi ikan mas	58

DAFTAR LAMPIRAN

	halaman
Lampiran 1 : Data Jumlah Koloni <i>A. hydrophila</i> dan Nilai <i>Absorbance</i> (X) yang Terbaca pada Spektrofotometer	88
Lampiran 2 : Analisa Varians Kurva Baku yang Menghubungkan Antara Nilai <i>Absorbance</i> dan Jumlah Koloni	89
Lampiran 3 : Perhitungan Lethal Dose-50 dengan Rumus Reed dan Muench	90
Lampiran 4 : Pengujian Statistik Data Titer Antibodi Serum Awal (Log ₂) dengan Kolmogorov-Smirnov Z	91
Lampiran 5 : Pengujian Statistik dengan Analisis Varians terhadap Variabel Tergantung Titer Antibodi Serum Ikan Mas dari Kelompok Kontrol, Perendaman, dan Infiltrasi Hiperosmotik	92
Lampiran 6 : Pengujian Statistik dengan Uji Beda Nyata Terkecil Pengaruh Pemberian Bakterin <i>A. hydrophila</i> terhadap Titer Antibodi Serum Ikan Mas	93
Lampiran 7 : Pengujian Statistik dengan Uji Beda Nyata Terkecil Pengaruh Waktu Pengambilan Serum terhadap Titer Antibodi Serum Ikan Mas	94
Lampiran 8 : Pengujian Statistik dengan Analisis Varians terhadap Variabel Tergantung Daya Proteksi Ikan Mas dari Kelompok Kontrol, Perendaman, dan Infiltrasi Hiperosmotik	96
Lampiran 9 : Pengujian Statistik dengan Uji Beda Nyata Terkecil Pengaruh Pemberian Bakterin <i>A. hydrophila</i> terhadap Daya Proteksi Ikan Mas	97
Lampiran 10: Pengujian Statistik dengan Uji Beda Nyata Terkecil Pengaruh Pemberian Infeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i> terhadap Daya Proteksi Ikan Mas	98
Lampiran 11: Penghitungan Statistik dengan Uji Korelasi Pearson.....	99
Lampiran 12: Dokumentasi Hasil Uji Mikro-Aglutinasii	101

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Permintaan konsumen akan produk komoditas perikanan sebagai bahan pangan di dalam negeri semakin meningkat selaras dengan meningkatnya kesadaran masyarakat akan ikan sebagai sumber protein hewani dan gizi yang penting bagi tubuh. Adanya kecenderungan makan ikan sebagai simbol prestise, juga menambah maraknya peluang pasar hasil perikanan baik yang merupakan produksi hasil tangkapan maupun hasil budidaya ikan maupun udang.

Dalam dekade terakhir ini, budidaya ikan air tawar semakin berkembang untuk memenuhi kebutuhan pasar hasil perikanan. Berbagai jenis ikan air tawar telah banyak dikembangkan, salah satu diantaranya adalah ikan mas yang mempunyai nilai ekonomis dan produksinya dapat mencapai di atas rata-rata ikan konsumsi lainnya. Sebagai salah satu jenis ikan budidaya air tawar, ikan mas termasuk paling banyak dibudidayakan petani baik budidaya pembenihan, pembesaran di kolam pekarangan ataupun air deras (*running water*).

Untuk lebih meningkatkan produksi ikan yang dibudidayakan, tentunya diperlukan peningkatan produktivitas. Namun, dalam prakteknya usaha peningkatan populasi ikan dalam suatu kolam budidaya sering melewati batas-batas maksimal yang dapat ditolerir sesuai dengan kemampuan lingkungan atau kondisi perairan setempat. Akibatnya berbagai penyakit, baik yang infeksius maupun yang non-infeksius berkembang menjadi suatu kendala yang harus dihadapi dalam sistem budidaya intensif.



Di Indonesia, menjelang akhir tahun 1980 telah terjadi wabah penyakit yang melanda populasi ikan mas yang menimbulkan kerugian sebesar 173 ton termasuk didalamnya 30 % ikan-ikan kecil (benih) dan kerugian tersebut ditaksir sebesar Rp. 126 juta (Anonim, 1990). Sebagian para ahli menduga penyebabnya oleh bakteri seperti *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida* dan *Pseudomonas fluorescens*, disamping infeksi campuran oleh kausa parasiter, viral (*virus-like*) dan faktor-faktor lain seperti faktor perubahan lingkungan (*environmental diseases*) yang sampai sekarang masih terus dilacak penyebab utamanya (Mangunwiryo, 1991).

Timbulnya suatu penyakit dalam suatu sistem budidaya ikan merupakan akibat interaksi kompleks antara inang (ikan), jasad patogen dan lingkungan yang tidak seimbang (Anderson, 1974). Kondisi ini biasa terjadi pada usaha budidaya ikan secara intensif dengan kepadatan tinggi, pemberian pakan buatan, perubahan kondisi yang menyebabkan kualitas air menurun. Pada kondisi lingkungan yang jelek, dapat menyebabkan ikan mudah stres dan menurunnya sistem pertahanan tubuh ikan terhadap penyakit. Stres akibat lingkungan merupakan pemacu utama bagi timbulnya penyakit parasiter, bakterial dan viral (Wasito, 1995).

Dalam upaya pengobatan penyakit ikan, bahan-bahan kimia dan antibiotika banyak digunakan di kalangan petani ikan sebagai alternatif terapi. Namun penggunaan bahan-bahan kimia tersebut selain menimbulkan masalah bagi lingkungan perairan sekitarnya, juga mempunyai keterbatasan yaitu perbedaan antara dosis terapeutika dengan toksisitasnya sangat rendah (Ward, 1982). Penggunaan kemoterapi tersebut hanya memberikan pertolongan

sementara dan kemungkinan besar ikan masih rentan terhadap reinfeksi (Raa *et al.*, 1992). Sedangkan antibiotika, walaupun tidak toksik terhadap inang, namun penggunaan yang berulang-ulang atau dalam jangka waktu lama dapat menginduksi *strain* bakteri yang resisten antibiotika tersebut dan menimbulkan residu antibiotika tersebut. Disamping itu, ikan yang terinfeksi seringkali mengalami anoreksia, sehingga pakan yang mengandung antibiotika tersebut tidak cukup termakan dan pada akhirnya sebagian ikan yang tidak terobati menjadi mati (Ward, 1982; Roberts, 1989). Untuk mengatasi kendala ini, maka perlu digunakan alternatif lain sebagai kontrol terhadap penyakit, antara lain dengan vaksinasi.

Vaksinasi dengan organisme yang dinaktifkan atau dilemahkan atau produk-produknya telah terbukti merupakan cara yang efektif untuk meningkatkan daya tahan hospes (Bellanti dan Robbins, 1993). Disamping itu, vaksinasi untuk mencegah penyakit mempunyai keuntungan dibanding pengobatan menggunakan antibiotik. Proteksi yang ditimbulkan akibat vaksinasi biasanya lebih lama dan hewan hanya membutuhkan satu atau dua dosis untuk memberikan proteksi (Ward, 1982). Selain tidak mempengaruhi lingkungan perairan sekitarnya (Roberts, 1989), vaksin tidak menyebabkan agen (bakteri) berkembang menjadi resisten dan tidak menimbulkan efek samping toksik serta ikan yang sehat mempunyai performans pertumbuhan lebih baik (Ward, 1982; Roberts, 1989).

Kemanjuran vaksin tidak ditentukan oleh perangsangan terjadinya antibodi serum saja, tetapi lebih ke arah adanya penambahan proteksi terhadap penyakit. Proteksi tersebut dihubungkan dengan beberapa faktor

imunitas humoral dan seluler (Bellanti dan Robbins, 1993). Pada imunitas seluler, terutama diperankan oleh sel-sel makrofag, dimana makrofag yang teraktivasi melalui proses endositosis maupun produk-produk limfosit yang dirangsang oleh antigen akan lebih efisien dalam mematikan bakteri (Parslow, 1994; Bellanti dan Kadlec, 1993). Vaksin dengan daya protektif yang tinggi sudah dikembangkan terhadap beberapa penyakit bakterial pada ikan (Lillehaug, 1989 dalam Raa *et al.*, 1992) ; antara lain untuk bakteri patogen *A. hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri*, *Pasteurella piscicida*, *Vibrio anguillarum* atau *V. ordalii* (Austin dan Austin, 1987).

Penelitian vaksinasi ikan di Indonesia telah dilakukan sejak tahun 1983 di Balai Penelitian Perikanan Air Tawar Bogor, dimulai pada ikan mas dengan cara menyuntikkan bakteri *A. hydrophila* yang sudah diinaktifkan dengan formalin tanpa diberi adjuvant. Hasilnya menunjukkan bahwa pemberian vaksin dapat meningkatkan daya proteksi ikan terhadap infeksi *A. hydrophila*. Penelitian vaksinasi benih ikan lele dengan cara perendaman langsung selama 15 menit dalam vaksin *A. hydrophila* menunjukkan derajat kelangsungan hidup yang cukup tinggi , yaitu 59,3 % setelah diuji tantang dengan bakteri *A. hydrophila* (Supriyadi dan Rukyani, 1990).

Rute atau metode pemberian vaksin pada ikan merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi terbentuknya kekebalan spesifik (Ellis, 1982; Roberts, 1989). Sebagai contoh, vaksinasi dengan metode perendaman selama 30 - 120 detik dapat memberikan daya proteksi terhadap *A. hydrophila* sebesar 98% (Austin dan Austin, 1987). Berbeda dengan vaksinasi yang diberikan melalui injeksi intraperitoneal yang mampu memberikan daya

proteksi 100% mulai dari minggu kedua sampai minggu kelima pasca-vaksinasi pada ikan nila terhadap *A. hydrophila* (Ruangpan *et al.*, 1986). Derajat proteksi yang tinggi juga diperoleh ikan salmon setelah diinjeksi dengan vaksin *Vibrio anguillarum* (Ward, 1982).

Walaupun metode pemberian antigen dengan injeksi intraperitoneal sangat efektif dalam merangsang respon antibodi pada ikan, namun di sisi lain vaksinasi dengan metode ini tidak mungkin diterapkan di lapangan dengan ikan yang berjumlah banyak (skala besar) dan pada anak-anak ikan. Selain membutuhkan waktu, stres akibat pembiusan sebelum diinjeksi dapat mempengaruhi kemampuan untuk mencapai respon imun yang optimal (Ward, 1982). Disamping itu, vaksinasi dengan cara intraperitoneal diperlukan ketelitian dan ketrampilan agar tidak terkena usus yang dapat menimbulkan perdarahan dan kehilangan antigen (Anderson, 1974).

Untuk mengatasi problema ini, maka metode perendaman langsung dan infiltrasi hiperosmotik sering digunakan untuk memaparkan antigen (Lamers *et al.*, 1985). Meskipun metode ini tidak terlepas dari perlakuan *stressing*, namun metode ini mudah diterapkan pada skala besar dan anak-anak ikan (Ward, 1982). Metode perendaman juga efektif dalam menimbulkan proteksi, karena bakterin relatif cukup banyak diserap oleh insang, namun derajat dan lama proteksi yang ditimbulkan bervariasi, tergantung pada konsentrasi bakterin, ukuran ikan dan spesies ikan. Metode perendaman tersebut dapat menghasilkan titer antibodi serum, tetapi dapat juga memberikan proteksi walaupun belum menghasilkan antibodi serum (Lamers *et al.*, 1985).

Kemampuan ikan untuk membentuk antibodi terhadap penyakit bakterial dengan jalan memberikan antigen yang tidak patogenik dapat digunakan sebagai tindakan pencegahan terhadap penyakit bakterial. Mengingat bahwa bakteri *A. hydrophila* dikenal sebagai patogen oportunistik pada ikan (Tajima *et al.*, 1992), maka pemberian bakterin diharapkan dapat mengaktifkan sistem pengenalan imun dan sistem efektor yang diperlukan; sehingga dapat meningkatkan derajat kekebalan ikan mas terhadap *A. hydrophila*. Atas dasar hal ini, maka dilakukan suatu penelitian untuk mengkaji lebih lanjut bagaimana respon imun humoral spesifik yang digambarkan melalui terbentuknya antibodi serta bagaimana daya proteksi yang ditimbulkan akibat pemberian bakterin *A. hydrophila* pada ikan mas dengan metode perendaman dan metode infiltrasi hiperosmotik.

1.2 Rumusan Masalah

Bertolak dari landasan teoritik dan fakta dari hasil penelitian yang telah diuraikan sebelumnya, maka dirumuskan masalah sebagai berikut :

- 1) Apakah pemberian bakterin *A. hydrophila* pada ikan mas baik melalui metode perendaman maupun metode infiltrasi hiperosmotik dapat menimbulkan antibodi dan daya proteksi ikan mas terhadap infeksi *A. hydrophila*.
- 2) Adakah perbedaan antara pemberian bakterin melalui metode perendaman dengan metode infiltrasi hiperosmotik terhadap titer antibodi dan persentase relatif proteksi ikan mas terhadap infeksi *A. hydrophila*.

- 3) Bagaimana perkembangan titer antibodi selama delapan minggu dan persentase relatif proteksi ikan mas terhadap infeksi *A. hydrophila* pada minggu kedua, keempat, keenam, dan kedelapan setelah pemberian bakterin baik melalui metode perendaman maupun metode infiltrasi hiperosmotik.
- 4) Adakah korelasi antara titer antibodi yang terbentuk dengan daya proteksi ikan mas terhadap infeksi *A. hydrophila*.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Untuk mempelajari efek pemberian bakterin *A. hydrophila* baik melalui perendaman maupun infiltrasi hiperosmotik terhadap respon imun humoral spesifik yang digambarkan melalui terbentuknya antibodi serta daya proteksi ikan mas terhadap infeksi *A. hydrophila*.

1.3.2 Tujuan khusus

- 1) Mengetahui titer antibodi dan daya proteksi ikan mas setelah pemberian bakterin *A. hydrophila* dengan metode perendaman dan metode infiltrasi hiperosmotik.
- 2) Mengetahui perbedaan antara pemberian bakterin melalui metode perendaman dengan metode infiltrasi hiperosmotik terhadap titer antibodi dan daya proteksi ikan mas yang ditimbulkan terhadap infeksi *A. hydrophila*.

- 3) Mengetahui perkembangan titer antibodi selama delapan minggu dan daya proteksi ikan mas terhadap infeksi *A. hydrophila* yang ditera pada minggu kedua, keempat, keenam, dan kedelapan setelah pemberian bakterin *A. hydrophila* dengan metode perendaman dan metode infiltrasi hiperosmotik.
- 4) Mengetahui korelasi antara titer antibodi dengan daya proteksi ikan mas terhadap infeksi *A. hydrophila*.

1.4 Manfaat Penelitian

Diharapkan dengan pengkajian efek pemberian bakterin *A. hydrophila* pada ikan mas baik dengan cara perendaman maupun infiltrasi hiperosmotik terhadap respon imun spesifik, dapat berguna bagi pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi, khususnya bidang teknologi kesehatan ikan. Diharapkan pula dari pengkajian tersebut, dapat memberi gambaran kapan sebaiknya dilakukan suatu "booster" vaksinasi *A. hydrophila*, sehingga nantinya dapat digunakan untuk pengendalian penyakit *A. hydrophila* pada ikan mas dalam suatu sistem budidaya.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Mas

2.1.1 Sistematika

Menurut Santoso (1993), sistematika ikan mas adalah sebagai berikut :

- Kelas : Pisces (golongan ikan yang mempunyai insang sebagai alat pernapasan)
- Subkelas : Teleostei (golongan ikan bertulang belakang)
- Ordo : Ostariophysi (golongan ikan yang mempunyai alat keseimbangan berupa tulang pada rongga perut bagian atas)
- Subordo : Cyprinoidea
- Famili : Cyprinidae
- Genus : *Cyprinus*
- Species : *Cyprinus carpio* (Linne), *Cyprinus carpio*, L.
- Nama lain : Karper
- Nama daerah : Iwak Tombro (Jawa Timur), Lauk Mas (Jawa Barat), Sinyonya (kalau bermata sipit, warna kuning muda), Karper Punten (jika berpunggung tinggi, warna hijau keabu-abuan).

2.1.2 Ciri-Ciri morfologi

Menurut Santoso (1993), ikan mas (*Cyprinus carpio*) berasal dari daratan Cina dan Rusia. Ikan mas mempunyai bentuk badan agak memanjang

pipih ke samping (*compressed*). Mulut (bibir) berada di ujung tengah (terminal), dapat disembulkan, dan lunak (elastis). Ikan mas memiliki kumis (barbel) dua pasang (empat buah) yang dapat digunakan untuk membedakan dengan ikan masa koki (*Carasius auratus*) dari jenis ikan hias, kadang-kadang juga terdapat satu pasang sungut (*rudimenter*).

Jari-jari sirip punggung (*dorsal*) yang kedua mengeras seperti gergaji. Letak antara sirip punggung dan sirip perut berseberangan, sedangkan sirip dada (*pectoral*) terletak di belakang tutup insang (*operculum*) (Santoso, 1993).

Ikan mas tergolong bersisik besar tipe *cycloid*. Usus umumnya tidak begitu panjang, jika dibandingkan dengan hewan pemakan tumbuh-tumbuhan asli. Ikan mas tidak mempunyai lambung, juga tidak bergigi; sehingga bila mencerna makanan digunakan pharing mengeras sebagai pengganti penggerus (Santoso, 1993).

Menurut Santoso (1993), terdapat beberapa ciri-ciri morfologi yang dapat membedakan antara tujuh macam ras (*strain*) yang banyak dijumpai di masyarakat dewasa ini, yaitu :

a. Ikan Mas Majalaya

Sisiknya berwarna hijau keabu-abuan dengan tepi sisik lebih gelap. Mempunyai punggung yang tinggi dan badan relatif pendek. Bagian kuduk atas antara kepala dan punggung melekok. Penampang melintang badan kian menipis ke arah punggung dan lebih tipis dari ras lainnya. Gerakannya lamban dan bila diberi makanan suka

berenang pada permukaan air. Perbandingan panjang badan dengan tinggi badan antara 3,2 : 1.

b. Ikan Mas Punten

Sisiknya berwarna hijau gelap dan bentuk badannya paling pendek diantara ras-ras lainnya. Bagian punggung tinggi melebar, mata agak menonjol. Gerakannya lebih gesit daripada ikan mas Majalaya. Perbandingan antara panjang dan tinggi badan antara 2,3 : 1.

c. Ikan Mas Taiwan

Sisiknya berwarna hijau kekuning-kuningan. Badan relatif lebih panjang daripada ikan mas Punten dengan penampang punggung agak membulat. Mata agak menonjol. Gerakannya lebih gesit dan aktif. Ikan mas Taiwan mempunyai kebiasaan berada di bawah permukaan air bila diberi makan. Perbandingan panjang dengan tinggi badan berkisar 3,5 : 1.

d. Ikan Mas si Nyonya

Sisiknya berwarna kuning muda dan badannya relatif panjang. Mata pada ikan mas si Nyonya yang masih muda tampak normal dan tidak menonjol, sedangkan ikan dewasa bermata sipit. Gerakannya lambat dan lebih suka berada di permukaan air. Perbandingan panjang badan dengan tinggi badan berkisar 3,6:1.

e. Ikan Mas Karper Kaca

Sisiknya berwarna putih mengkilap seperti perak, besar-besar dan ada pula yang kecil-kecil atau tidak seragam. Biasanya bagian yang tertutup sisik dekat sirip. Gerakannya gesit dan aktif.

f. Ikan Mas Kumpay

Warna sisiknya beraneka ragam, ada yang kuning, merah, abu-abu, hitam dan putih. Kadang-kadang ada yang bersisik seperti strain ikan mas Kaca. Sirip-siripnya memanjang, pertumbuhannya lambat dan gerakannya lamban. Banyak dijadikan sebagai ikan hias, karena keunikan siripnya yang meliuk-liuk seperti selendang.

g. Ikan Mas Kancra Domas

Warna sisiknya coklat keemasan dan kemerahan, kecil dan letaknya tidak teratur. Sisi badan terdapat garis membujur yang merupakan batas warna. Bagian punggung berwarna lebih gelap, sedangkan perutnya mengkilap keemasan. Badannya relatif panjang, gerakannya gesit atau aktif.

2.2 Respon Imun Humoral Pada Ikan

2.2.1 Pengolahan dan presentasi antigen

Menurut Rijkers *et al.* (1981); Kennedy dan Stoskopf (1993); pada ikan, sel yang berperan dalam pengolahan dan mempresentasikan antigen adalah makrofag. Sedangkan menurut Kennedy dan Stoskopf (1993), keberadaan sel



dendritik sebagai sel penyaji antigen (*Antigen Presenting Cells*) seperti yang terdapat pada mamalia, masih dalam perdebatan.

Makrofag pada teleost tersebar luas dalam jaringan, insang dan peritoneum, terutama ditemukan sebagai sel-sel retikuloendotelial pada ginjal dan limpa. Pada beberapa spesies, makrofag juga ditemukan pada atrium jantung. Makrofag tidak ditemukan pada hati sebagai sel Kuppfer, seperti halnya pada mamalia. Makrofag juga ditemukan menginfiltrasi ke dalam epidermis kulit untuk memberikan respon terhadap patogen (Langdon, 1988; Roberts, 1989). Sel-sel makrofag juga terdapat menyebar pada intestinal epitelium. Pada ikan mas, makrofag intraepithelial banyak ditemukan pada segmen kedua posterior dari intestine dibanding pada segmen yang pertama anterior; sehingga pada bagian posterior intestine dari ikan dianggap merupakan letak imunologik (*immunological site*) penting pada ikan teleost (Manning, 1994).

Antigen terlebih dahulu akan ditangkap oleh makrofag, kemudian masuk ke dalam sel makrofag dengan cara endositosis atau pinositosis. Di dalam sel makrofag, antigen diproses dengan berbagai cara, diantaranya denaturasi atau proteolisis yang terjadi di dalam endosom dan kemudian fragmen-fragmen antigen yang terdiri atas rantai peptida dan bersifat hidrofo-bik itu dipresentasikan pada permukaan sel makrofag (Kresno, 1996). Dikemukakan pula oleh Kresno (1996) bahwa agar supaya antigen dapat dikenali oleh sel limfoid, bersama atau melalui ekspresi MHC (*major histocompatibility complex*) kelas II pada permukaan sel. Keberadaan MHC kelas II pada ikan golongan teleost telah dibuktikan melalui test *mixed lymphocyte reaction*

(MLR) yang menunjukkan hasil kuat (Kennedy dan Stoskopt, 1993), dimana test MLR didasarkan atas terjadinya perubahan bentuk menjadi blas apabila limfosit tersebut mengenali antigen permukaan yang berbeda (Subowo, 1993). Manning (1994) juga menyatakan bahwa keberadaan MHC-like dapat mempengaruhi penyajian antigen dan terjadi restriksi MHC dari respon imun teleost, seperti pada mamalia. Dikemukakan oleh Subowo (1993) bahwa restriksi MHC tersebut merupakan persyaratan yang diperlukan limfosit T untuk mengenal antigen asing harus bersama antigen diri MHC, agar dapat membangkitkan respon imun.

2.2.2 Aktivasi Sel

Aktivasi APC dapat diinduksi oleh unsur antigen itu sendiri. Namun demikian, sebagian besar aktivasi APC terjadi melalui sitokin yang diproduksi oleh sel T (Baratawidjaja, 1996). Pada mamalia, antigenik atau mitogenik dapat menstimulasi limfosit T untuk memproduksi MAF (*macrophage activating factor*), teristimewa INF (*interferon*)-gama yang poten untuk mengaktivasi makrofag. Seperti halnya mamalia, limfosit T pada ikan yang terstimulasi juga memproduksi MAF dan INF-gama (Manning, 1994). Aktivasi makrofag oleh limfokin tersebut telah dibuktikan oleh Smith dan Braun-Nesje (1982), yaitu terdapat perubahan morfologi dari makrofag ikan salmon Atlantik setelah diberi supernatan dari kultur leukosit dengan *concanavalin A* (Con A). Menurut Parslow (1994); Bellanti dan Kadlec (1993), sel-sel makrofag yang teraktivasi akan menunjukkan peningkatan aktivitas metaboliknya dan peningkatan fungsi, misalnya aktivitas mikrobisidal. Selain menyajikan

antigen, APC juga memproduksi IL-1 (*interleukin-1*) yang mampu mengaktifkan limfosit T. Sel T-*helper* yang teraktivasi tersebut akan menghasilkan IL-2 yang diperlukan untuk proliferasi sel limfosit T selanjutnya (Kennedy dan Stoskopf, 1993).

Sel T-*helper* yang dirangsang juga melepaskan interleukin (saat ini belum teridentifikasi) yang akan mengaktifkan limfosit B (Kennedy dan Stoskopf, 1993). Disamping antigen T-*dependent* yang membutuhkan sel T untuk menimbulkan respon sel, aktivasi sel B juga dapat terjadi atas rangsangan antigen T-*independent* (Manning, 1994). Sebagai contoh lipopolisakarida (LPS) pada permukaan bakteri *A. hydrophila* dapat mengaktivasi sel B tanpa bantuan sel T-*helper* yang berarti sel B dengan slg (imunoglobulin permukaan) sebagai reseptor dapat menangkap antigen tanpa harus diproses terlebih dahulu oleh APC (Kresno, 1996). Hal ini berarti sel B dengan reseptor slg yang cocok dengan antigen tersebut, selanjutnya akan berdiferensiasi menjadi sel plasma. Keberadaan molekul Ig pada permukaan limfosit B dibuktikan melalui antibodi monoklonal (Manning, 1994), bahkan menurut De Luca *et al.* (1993) dalam Roberts (1989), ada korelasi antara keberadaan slg dengan tanggapan terhadap LPS mitogen.

2.2.3 Pembentukan antibodi

Menurut Roberts (1989), bila antigen pertama kali masuk ke dalam tubuh ikan, maka seminggu setelah pemaparan tersebut sel-sel produksi antibodi (*antibody-producing cells*) terlihat di ginjal dan limpa. Jumlah sel-sel tersebut akan meningkat secara eksponensial dan berkurang setelah

mencapai puncak. Namun, sebelum sel-sel produksi antibodi mencapai puncaknya, antibodi serum biasanya muncul sekitar 10-15 hari setelah pemaparan antigen. Kadar antibodi akan meningkat secara eksponensial untuk mencapai plateau dalam waktu 20-30 hari dan kemudian menurun secara cepat atau perlahan, tergantung pada tipe antigen dan spesies ikan.

Menurut Kresno (1996), saat antara pemaparan antigen dan munculnya Ig M disebut *lag phase*. Dibanding dengan mamalia, *lag phase* pada ikan lebih lama, tetapi kadar antibodi dapat dipertahankan lebih lama (Roberts, 1989).

Bila pemaparan antigen terjadi kedua kalinya, terjadi respon imun sekunder dengan *lag phase* yang pendek dan kadar antibodi yang lebih tinggi dibanding pada respon primer. Pada respon primer, antibodi yang dihasilkan adalah Ig M, sedangkan pada respon sekunder, antibodi yang dihasilkan adalah Ig M dengan berat molekul yang lebih rendah dibanding Ig M pada respon primer. Disamping itu afinitas antibodi pada respon sekunder lebih tinggi dibanding antibodi pada respon primer (Roberts, 1989).

Perbedaan antara respon primer dan sekunder tersebut, disebabkan adanya sel-sel T dan B memori akibat pemaparan yang pertama (Roberts, 1989). Menurut Lamers *et al.* (1985), timbulnya sel-sel memori pada ikan mas membutuhkan waktu lebih lama (maksimum 3-6 bulan) dibanding mamalia dan sel-sel memori tersebut dapat tinggal selama 8-12 bulan setelah pemaparan yang pertama.

Menurut Roberts (1989), besarnya kadar antibodi yang dicapai pada respon imun sekunder dibanding respon imun primer tergantung pada temperatur. Ikan mas yang dipelihara pada suhu 18°C mempunyai respon antibodi

sekunder dengan *lag phase* dan waktu untuk mencapai puncak respon lebih pendek. Bila pada suhu 20°C, respon sekunder yang terbentuk 10 kali lebih besar daripada respon primer, sedangkan pada suhu 24°C, ratio antara respon sekunder dan respon primer kurang lebih sebesar 50 kali.

Pembentukan antibodi tersebut tidak berlangsung tanpa batas, ada mekanisme kontrol yang mengendalikan respon imun. Beberapa mekanisme yang mengontrol respon imun yang terdapat pada mamalia, juga ditemukan pada ikan, yaitu adanya sel *T-suppressor* dan regulasi oleh antibodi. Regulasi oleh antibodi terbukti ada pada ikan, disebabkan oleh antibodi itu sendiri yang dapat memberikan umpan balik negatif (*antibody feed-back inhibition*) (Roberts, 1989). Sedangkan limfosit *T-suppressor* muncul sebagai mekanisme umpan balik dalam rangka homeostatik untuk mengimbangi adanya aktivasi limfosit *T-helper* (Subowo, 1993; Kennedy dan Stoskopf, 1993).

2.2.4 Imunoglobulin

Imunoglobulin merupakan molekul protein yang mempunyai aktivitas antibodi, yaitu suatu kemampuan mengikat secara spesifik dengan substansi (antigen) yang membangkitkan respon imun, sehingga dihasilkan imunoglobulin (Ig) tersebut (Subowo, 1993). Pada hakekatnya, setiap molekul imunoglobulin mempunyai fungsi ganda, dimana satu daerah atau regio dapat mengikat antigen, sedangkan daerah lainnya dapat pula mengikat sel-sel dalam sistem imun dan komponen-komplemen secara tidak spesifik (Gudkovs, 1988; Subowo, 1993).

Imunoglobulin sebagian besar ditemukan dalam cairan dari jaringan ikan meliputi: plasma, limfe, kulit, insang, mukus usus dan empedu (Ellis, 1982; Gudkovs, 1988; Roberts, 1989). Imunoglobulin juga terdapat pada permukaan sel limfosit dan mempunyai fungsi sebagai reseptor antigen spesifik (Gudkovs, 1988). Menurut Roberts (1989), Ig juga ditemukan pada telur dari beberapa spesies teleost, seperti: ikan karper, ikan sebelah, yang mengingatkan adanya antibodi maternal.

Dalam darah, Ig terdapat kurang lebih 40-50 % dari total serum protein (Ellis, 1982; Gudkovs, 1988). Bila serum protein tersebut dipisahkan dengan cara elektroforesis, maka Ig ditemukan dalam fraksi globulin gama dan beta (Ellis, 1982).

Berbeda dengan mamalia, pada ikan *teleost* hanya terdapat satu kelas atau isotipe Ig yaitu Ig M (Gudkovs, 1988; Roberts, 1989; Kennedy dan Stoskopf, 1993; Manning, 1994). Adapun struktur dasar Ig tersebut terdiri atas dua rantai berat (*H-chain*) dan dua rantai ringan (*L-chain*) yang diukur berdasarkan berat molekul (Gudkovs, 1988; Roberts, 1989). Pada mamalia, bentuk unit dasar serum Ig M adalah pentamer, sedangkan pada *teleost* berbentuk tetramer (Gudkovs, 1988; Roberts, 1989; Kennedy dan Stoskopf, 1993). Meskipun demikian, pada beberapa spesies, seperti ikan hiu dan ikan pari, bentuk unit dasar serum Ig M tersebut adalah monomer (Roberts, 1989; Kennedy dan Stoskopf, 1993).

Meskipun pada *teleost* tidak terdapat Ig G seperti halnya pada mamalia, tetapi terdapat respon humoral yang protektif (Roberts, 1989). Pada umumnya Ig M lebih efisien daripada Ig G dalam hal aktivasi komplemen,

opsonisasi, netralisasi virus dan aglutinasi (Tizard, 1987). Antibodi Ig M yang dibentuk pada awal respon imun tampak berfungsi terbaik sebagai opsonin dan mudah bekerjasama dalam peristiwa fagositik (Bellanti, 1993).

Pada ikan, diduga Ig M berperan sebagai opsonin pada spesies tertentu baik secara langsung melalui reseptor untuk Ig M (Fc-reseptor) maupun tidak langsung melalui reseptor untuk komplemen (C-reseptor) yang teraktivasi secara klasik (Roberts, 1989). Dugaan ini sudah dibuktikan oleh Sakai (1984) melalui penelitiannya, dimana opsonisasi oleh antibodi dan komplemen ikan dapat memperbesar aktivitas fagositik sel-sel makrofag ikan salmon melalui reaksi antigen-antibodi dan hasil ini menunjukkan keberadaan Fc dan C reseptor pada permukaan sel-sel fagosit dari ikan salmon.

2.3 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Respon Imun Pada Ikan

Menurut Roberts (1989), terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi respon imun serta dapat diklasifikasikan ke dalam dua kategori, yaitu: faktor ekstrinsik dan faktor intrinsik. Faktor ekstrinsik meliputi antara lain: temperatur, dosis dan rute pemberian antigen, lingkungan dan kompetisi antigen. Sedangkan faktor intrinsik dikaitkan dengan mekanisme imunoregulator dalam sistem imun pada ikan, yaitu: umpan balik negatif dari antibodi (*antibody feed-back inhibition*), kompleks imun (antigen-antibodi), aktivitas limfosit T-helper dan T-suppressor.

2.3.1 Faktor Ekstrinsik

Menurut Kennedy dan Stoskopf (1993), pada beberapa penelitian menunjukkan bahwa temperatur yang rendah akan menekan mekanisme pertahanan non-spesifik, humoral dan seluler pada ikan. Namun pengenalan antigen oleh makrofag sel T tidak dipengaruhi oleh temperatur yang rendah, dimana pada kekebalan berperantara sel, sel-sel *killer* dan fagositosis tetap tinggal aktif (Langdon, 1988).

Fungsi limfosit *T-helper* sangat tergantung pada temperatur (Langdon, 1988; Kennedy dan Stoskopf, 1993) dan respon antibodi primer menjadi lebih cepat pada temperatur optimal (Kennedy dan Stoskopf, 1993). Walaupun kinetik dari respon antibodi primer lebih lambat pada temperatur sub-optimal, namun besar dan lama respon tidak berbeda nyata dengan respon antibodi yang terjadi pada temperatur tinggi (Kennedy dan Stoskopf, 1993).

Menurut Ellis (1982), Roberts (1989), Gudkovs (1988), dan Langdon (1988) hanya pada fase-fase tertentu dari respon antibodi yang tergantung pada temperatur. Fase tergantung temperatur (*temperature dependent phase*) meliputi interaksi antara sel-sel T dan B, yaitu untuk menghalangi fungsi *T-helper* atau meningkatkan aktivitas sel *T-suppressor*. Berikutnya multiplikasi dan diferensiasi sel-sel produksi antibodi (sel-sel B) yang teraktivasi diperkirakan tidak tergantung pada temperatur, sedangkan pembentukan antibodi oleh sel-sel plasma merupakan fase tergantung temperatur.

Menurut Ellis (1982) dan Gudkovs (1988), dosis antigen, rute pemberian antigen dan pemilihan waktu pemaparan sekunder sangat penting dalam menentukan besarnya respon primer dan sekunder pada ikan karper. Jika ikan

diberi antigen melalui intravena, besarnya respon primer dan sekunder terhadap sel darah merah domba meningkat sebanding dengan dosis antigen. Bila diberikan melalui intramuskuler dengan dosis tinggi, maka respon primer yang dihasilkan juga tinggi, tetapi respon sekunder kurang. Pada dosis rendah yang diberikan awal melalui intramuskuler akan memberikan respon primer yang rendah, tetapi bila *booster* diberikan tidak kurang dari enam bulan setelah pemaparan pertama akan memberikan respon sekunder yang tinggi.

Banyak faktor yang berkaitan dengan lingkungan dapat langsung menekan respon imun ataupun melalui stres yang kronis (Roberts, 1989). Menurut Kennedy dan Stoskopf (1993), efek dari logam-logam berat terhadap kekebalan non-spesifik bervariasi. Sebagai contoh, *cadmium* 12 ppm dapat meningkatkan fagositosis, tetapi menurunkan *intracellular killing*. *Copper* sangat menekan aktivitas fagositik, sedangkan aluminium kurang bersifat depresif. *Mercuric chloride* 0,3 ppm dapat menyebabkan secara stabil berkurangnya lisosim serum lebih dari tujuh hari setelah terpapar antigen. Namun, tidak hanya kontaminan lingkungan yang potensial mengganggu sistem imun, tetapi bahan-bahan terapeutika juga dapat bersifat immunosupresif.

Kompetisi antigenik didefinisikan sebagai hambatan respon imun terhadap satu antigen atau determinan antigenik yang disebabkan oleh pemberian antigen yang lain dan sudah dibuktikan dapat terjadi pada ikan (Roberts, 1989). Kompetisi antigenik sering dijumpai apabila antigen yang berbeda diberikan pada saat tidak bersamaan, melainkan berturut-turut dan

seringkali respon imun yang timbul ditujukan kepada antigen yang pertama diberikan, bukan terhadap antigen berikutnya (Subowo, 1993).

2.3.2 Faktor Intrinsik

Dugaan adanya regulasi oleh antibodi dengan memberikan umpan balik negatif (*antibody feed-back inhibition*) telah dibuktikan oleh Rijkers *et al.* (1981) dalam penelitiannya, dimana nampak adanya hambatan produksi antibodi terhadap sel darah merah domba akibat pemberian pasip antibodi spesifik terhadap sel darah merah domba.

Adanya kompleks antigen-antibodi dengan cepat akan ditangkap oleh sel-sel APC dalam limpa dan diproses, sehingga dapat memperbaiki induksi memori dan produksi antibodi dengan afinitas yang lebih tinggi (Roberts, 1989).

Menurut Roberts (1989), aktivitas sel *T-helper* terbukti dapat terjadi pada ikan melalui eksperimen *hapten-carrier*. Dikemukakan bahwa BSA (*Bovine Serum Albumin*) yang diasetilasi (Ac BSA) tidak dapat menginduksi pembentukan antibodi pada ikan karper atau tilapia, tetapi dapat merangsang pembentukan sel-sel *T-helper* memori yang berumur panjang (lebih dari 250 hari). Efek ini tidak dapat diinduksi pada temperatur rendah (12°C), tetapi bila diinduksi pada temperatur yang tinggi (25°C) masih dapat tinggal aktif pada temperatur rendah. Aktivitas sel *T-helper* juga dibuktikan oleh Lamers dan de Haas (1983) melalui vaksinasi dosis tunggal secara intramuskular dengan vaksin *A. hydrophila* inaktif ternyata dapat diperoleh respon imun yang mampu dipertahankan selama 360 hari.

Menurut Wishkovsky dan Avtalion (1982), aktivitas limfosit *T-suppressor* ditunjukkan melalui induksi toleransi spesifik terhadap BSA terlarut (sBSA) pada suhu 25°C setelah injeksi *intracardiac* pada ikan carp. Toleransi imunologik tersebut berlangsung lama (lebih dari 16 bulan) dan hal ini berlawanan dengan aktivitas *T-helper* yang dapat diinduksi pada temperatur tinggi atau temperatur rendah. Menurut Subowo (1993), toleransi imunologik merupakan ketidakmampuan melangsungkan respon imun terhadap molekul determinan antigenik. Dikemukakan pula bahwa rute pemberian antigen merupakan faktor yang berpengaruh terhadap induksi toleransi. Menurut Roberts (1989), pemberian imunisasi *A. salmonicida* melalui oral pada ikan trout ternyata dapat menekan titer antibodi serum pada injeksi antigen berikutnya yang menunjukkan adanya induksi sel-sel *suppressor*.

2.3 *Aeromonas hydrophila*

2.3.1 Habitat

A. hydrophila tersebar luas pada lingkungan akuatik, yang ditemukan baik pada lingkungan air tawar yang tidak terpolusi maupun yang terpolusi oleh bahan organik (Kabata, 1985; Roberts, 1989; Afrianto dan Liviawaty, 1992). Organisme ini juga ditemukan pada perairan laut, kecuali pada daerah perairan dengan salinitas yang tinggi (Roberts, 1989). Ada yang berpendapat bahwa organisme ini juga merupakan flora usus dari ikan yang sehat (Kabata, 1985; Roberts, 1989; Afrianto dan Liviawaty, 1992).



2.3.2 Morfologi

A. hydrophila merupakan bakteri Gram-negatif, motil dan berbentuk batang lurus dengan ukuran 0,3-1 x 1-3,5 μm (Austin dan Austin, 1987; Roberts, 1989; Stoskopf, 1993). Menurut Austin dan Austin (1987), Stoskopf (1993); Kabata (1985); bakteri *A. hydrophila* mempunyai satu flagela polar (*single polar flagella*).

2.3.3 Kultur dan Identifikasi

A. hydrophila dapat diisolasi dari ginjal atau darah dari ikan yang terserang dengan menumbuhkan pada media nutrient agar atau tryptone soya agar. Dalam waktu 24 jam, pada suhu 22-28°C, akan terbentuk koloni yang melingkar, cembung serta berwarna putih hingga kuning tua (Austin dan Austin, 1987; Roberts, 1989). Pada suhu 25°C setelah 48 jam, diameter koloni yang terbentuk adalah 2-3 mm (Austin dan Austin, 1987; Stoskopf, 1993).

Disamping nutrient agar atau tryptone soya agar, media selektif yang dapat digunakan untuk mengisolasi bakteri *A. hydrophila* adalah media Rimler-Shotts atau peptone beef extract glycogen agar (PBG) (Austin dan Austin, 1987). Menurut Roberts (1989), Rimler-Shotts (R-S) merupakan medium selektif yang mengandung novobiocin, biasanya digunakan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi tersangka *A. hydrophila* dari bahan-bahan yang terkontaminasi oleh bakteri lainnya. Menurut Stoskopf (1993), bila ditumbuhkan pada medium Rimler-Shotts, dibutuhkan waktu antara 24 - 48 jam dengan suhu inkubasi antara 20 - 25°C.

Menurut Austin dan Austin (1987) dan Stoskopf (1993), test aglutinasi lebih efektif untuk mengidentifikasi bakteri *A. hydrophila* terutama di lapangan, sedangkan teknik imunofluoresens biasa digunakan di laboratorium. Namun perlu diperhatikan bahwa reaksi silang kemungkinan dapat terjadi, yaitu dengan *A. salmonicida* dan *A. sobria*.

2.3.4 Epizootiologi

A. hydrophila kebanyakan merupakan penyebab utama dari suatu wabah penyakit ikan yang terjadi pada suatu kolam budidaya dan perairan tawar lainnya (Roberts, 1989). *Aeromonas* dapat menyerang semua jenis ikan air tawar dan jenis penyakitnya disebut *Motil Aeromonas Septicemia* (MAS) atau sering juga disebut *Haemorrhage Septicemia* (Afrianto dan Liviawaty, 1992).

Bakteri *Aeromonas* umumnya hidup di air tawar, tanaman air dan tubuh ikan, sehingga berpeluang besar untuk dapat menginfeksi ikan (Austin dan Austin, 1987). Serangan bakteri baru terlihat, apabila ketahanan tubuh ikan menurun akibat stres yang disebabkan oleh penurunan kualitas air, kekurangan pakan atau penanganan yang kurang cermat (Afrianto dan Liviawaty, 1992).

Menurut Langdon (1988), adanya respon stres dapat menghambat fagositosis dan inaktivasi oleh sel-sel makrofag. Dikemukakan oleh Austin dan Austin (1987), stres menjadi perantara bagi kondisi penyakit, dimana adanya mortalitas dipengaruhi oleh temperatur air yang dibuktikan melalui penelitian. Dalam penelitian tersebut, ikan yang ditantang dengan *A. hydrophila* melalui

injeksi intraperitoneal ternyata terjadi mortalitas pada temperatur yang meningkat 9,4°C. Dikemukakan pula bahwa temperatur air, adanya polutan, terutama nitrit 6 mg/l memudahkan ikan untuk terinfeksi.

Menurut Afrianto dan Liviawaty (1992), penularan bakteri *Aeromonas* dapat berlangsung melalui air, kontak badan, kontak dengan peralatan yang telah tercemar atau karena pemindahan ikan yang telah terserang *Aeromonas* dari satu tempat ke tempat lain.

2.3.5 Patologi Klinik

Menurut Kabata (1985), *A. hydrophila* dikenal sebagai penyebab septikemia hemoragik bakterial. Penyakit yang terjadi dibedakan menjadi tiga bentuk, yaitu : (1) abdominal dropsi dengan karakteristik berupa distensi dari rongga viseral dengan cairan, (2) ulserasi, dimana nampak lesi pada kulit dan otot, dan (3) septikemia hemoragik bakterial umum.

Ikan yang terinfeksi akan menunjukkan tingkah laku abnormal, kemampuan berenang akan menurun, ikan mengalami kesulitan bernapas, sering nampak di permukaan atau tetap tinggal lemah dekat dasar kolam (Kabata, 1985; Afrianto dan Liviawaty, 1992). Warna tubuh berubah menjadi agak gelap dengan hemoragi tidak teratur pada permukaan tubuh, terlihat adanya asites serta sirip mengalami kerusakan (Kabata, 1985; Roberts, 1989). Hemoragi pada permukaan kulit, mungkin ulcera membentuk lesi-lesi nekrotik yang dangkal (Roberts, 1989). Ulcera pada kulit dapat berkembang di mana saja pada tubuh (Stoskopf, 1993). Organ-organ internal juga nampak adanya kongesti, dengan hemoragi sampai ke viscera. Jika dilakukan insisi

pada ginjal dan limpa yang mengalami distensi, biasanya diperoleh cairan yang kental (Roberts, 1989). Seringkali terjadi anemia dan kerusakan pada ginjal dan hati (Austin dan Austin, 1987; Stoskopf, 1993). Menurut Kabata (1985), ginjal membengkak dan lunak, hati mungkin ada kebengkakan dan berwarna kuning serta rektum nampak bengkak serta berwarna kemerahan.

Menurut Roberts (1989), pengamatan dengan histopat, tidak dapat dibedakan dengan infeksi *Pseudomonas*, dimana masih nampak sel-sel nekrotik pada jaringan haemopoetik ginjal dan limpa. Dinding intestinal mengalami nekrosis dan mukosa berkerak hingga ke lumen dan terlihat adanya inflamatori oedema yang meluas dan infiltrasi seluler dari submukosa. Focal nekrosis juga ditemukan pada otot jantung, hati, gonad dan pankreas. Lesi pada kulit diawali dengan terjadinya oedema yang parah pada dermis dan hiperemia pada stratum retikularis yang mengarah ke spongiosis dan ulcera pada epidermis yang diikuti oleh nekrotik hemoragik yang meluas sampai ke otot, tetapi biasanya lesi-lesi yang terjadi lebih dangkal daripada vibriosis.

2.3.6 Pengendalian

Pengendalian bakteri *Aeromonas* dapat dilakukan dengan menggunakan antibiotik melalui injeksi, perendaman ataupun dicampur dengan pakan. Antibiotik yang biasa digunakan untuk memberantas *Aeromonas* adalah *chloramphenicol*, *oxytetracyclin* dan *streptomycin* (Afrianto dan Liviawaty, 1992). Namun di pihak lain, pemakaian antibiotik yang terus menerus dapat berakibat timbulnya galur bakteri yang resisten terhadap antibiotik tersebut (Ward, 1982).

Menurut Supriyadi dan Rukyani (1990), pengendalian terhadap penyakit ikan akan lebih efisien apabila dilakukan tindakan pencegahan, yaitu dengan menimbulkan kekebalan terhadap suatu penyakit pada ikan. Selain tidak memberikan peluang timbulnya galur bakteri yang resisten, juga tidak menimbulkan akumulasi residu toksik seperti halnya bila menggunakan antibiotik (Ward, 1982).

Pemberian bakterin untuk pencegahan penyakit ikan sudah dikembangkan dan diuji di laboratorium (Anderson *et al.*, 1982). Lamers dan de Haas (1983) menyimpulkan bahwa konsentrasi vaksin, dalam arti jumlah sel bakterin yang diberikan sangatlah penting untuk memperoleh respon imun. Dikemukakan lebih lanjut bahwa bakterin sebanyak 10^7 - 10^9 sel pada ikan karper akan diperoleh respon aglutinasi yang nyata. Vaksinasi dengan cara perendaman juga telah diuji oleh Lamers *et al.* (1985), dimana dengan dosis tunggal tidak diperoleh kadar antibodi serum yang nyata; namun pada pemberian vaksin kedua setelah satu, tiga atau delapan bulan dari vaksinasi pertama dapat memberikan kenaikan respon imun yang nyata.

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual

Infeksi bakteri pada ikan biasanya akut dan umumnya terjadi pada ikan yang dibudidayakan pada air yang berkualitas buruk. Infeksi ini terjadi sebagai lanjutan dari gangguan parasit atau setelah ikan ditangani secara buruk.

Menurut Anderson (1974), pada lingkungan akuatik yang terpolusi berat, bakteri *Aeromonas sp* umum ditemukan dan biasanya langsung atau tidak langsung dikaitkan dengan kematian ikan. Jika lingkungan mendukung atau kondisi ikan lemah, maka ikan mudah sekali terinfeksi dan pada akhirnya menimbulkan bakteremia yang merupakan penyebab kematian ikan. Gejala klinis yang nampak pada ikan yang terinfeksi oleh bakteri *Aeromonas* adalah perdarahan eksternal pada daerah sirip yang berkembang pada daerah abdomen, serta nampak adanya lepuh dan abses. Walaupun demikian, tubuh ikan dapat sebagai pembawa (*carrier*) bakteri tersebut untuk jangka waktu lama tanpa menunjukkan adanya gejala klinis.

Seperti halnya pada vertebrata lainnya, salah satu upaya tubuh ikan untuk mempertahankan diri terhadap masuknya antigen, misalnya antigen bakteri, adalah dengan menghancurkan bakteri tersebut secara non-spesifik melalui proses fagositosis oleh makrofag sebagai sel-sel fagosit. Disamping itu, makrofag juga merupakan sel penyaji antigen (*antigen presenting cells*) pada ikan (Kennedy dan Stoskopf, 1993). Menurut Subowo (1993), makrofag berperan besar dalam mengawali dan mengatur respon imun. Peran tersebut

berlangsung dalam memproses dan menyajikan antigen kepada limfosit dan dalam kemampuannya menghasilkan interleukin 1 (IL-1) agar limfosit menerima sinyal dan selanjutnya menjadi aktif.

Bakterin *A. hydrophila* yang diberikan pada ikan mas dengan metode perendaman dan infiltrasi hiperosmotik akan masuk melalui insang, kulit (Lamers *et al.* 1985) dan ada beberapa antigen yang ditelan oleh ikan (Manning, 1994). Jumlah antigen yang masuk melalui metode infiltrasi hiperosmotik diduga lebih banyak dibanding dengan metode perendaman. Hal ini mengingat bahwa dengan metode infiltrasi hiperosmotik, ikan terlebih dahulu dipaparkan dengan larutan NaCl 2% selama lima menit untuk mempermudah antigen bakterin masuk ke dalam tubuh ikan melalui kulit.

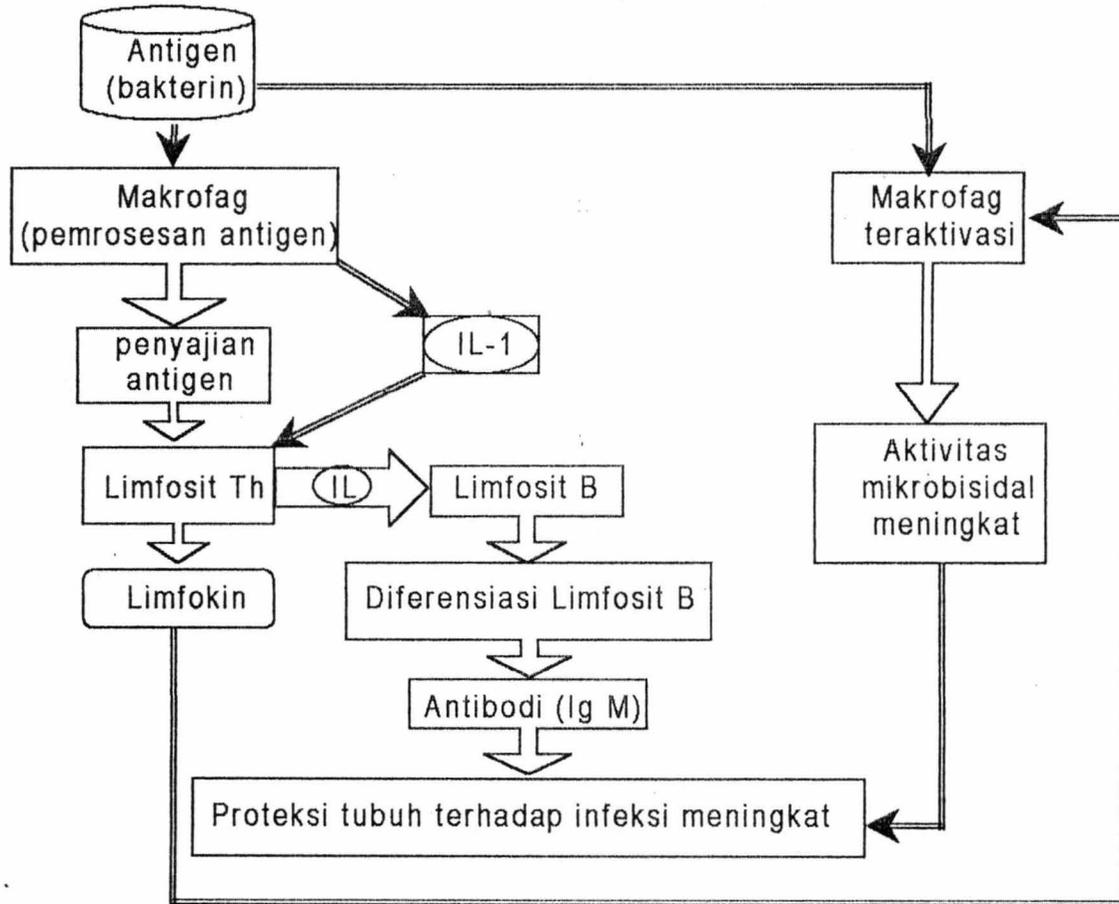
Antigen yang masuk tersebut akan ditangkap dan diproses terlebih dahulu oleh sel-sel makrofag sebelum disajikan sebagai suatu molekul yang dikenali oleh limfosit T. Antigen yang masuk melalui insang dan kulit akan ditangkap oleh sel-sel makrofag antara lain yang terdapat di insang, peritoneum, ginjal, limpa, dan epidermis kulit (Langdon, 1988; Roberts, 1989). Sedangkan antigen yang tertelan akan ditangkap oleh sel-sel makrofag yang terdapat pada intestinal epitelium (Manning, 1994).

Makrofag yang teraktivasi oleh antigen akan memproduksi IL-1 yang dapat mengaktifkan limfosit T. Selanjutnya limfosit T yang menerima sinyal dari makrofag menjadi aktif dan melepaskan interleukin (belum teridentifikasi) agar limfosit B dapat menjadi aktif dan berdiferensiasi untuk memproduksi dan mensekresikan antibodi spesifik (Kennedy dan Stoskopf, 1993).

Antibodi IgM yang terbentuk tersebut dapat mencegah mobilisasi mikroorganisme patogen, memudahkan fagositosis dan merupakan aglutinator kuat terhadap antigen serta dapat mengaktifkan komplemen dengan kuat (Baratawidjaja, 1996). Disamping itu, makrofag yang sudah teraktivasi melalui proses endositosis atau melalui zat-zat humoral, termasuk antibodi, komplemen atau produk-produk limfosit akan meningkatkan aktivitas metaboliknya dan memperlihatkan peningkatan fungsi, misalnya aktivitas mikrobisidal (Parslow, 1994; Bellanti dan Kadlec, 1993).

Dari gambaran konsep tersebut di atas, tentunya pemberian bakterin *A. hydrophila* dapat meningkatkan pertahanan tubuh terhadap infeksi bakteri *A. hydrophila*. Untuk mengkaji lebih lanjut bagaimana respon antibodi spesifik yang terbentuk setelah pemberian antigen bakterin, dilakukan pengukuran titer antibodi serum terhadap *A. hydrophila* dengan uji aglutinasi. Sedangkan sejauh mana proteksi yang ditimbulkan, digambarkan melalui jumlah kematian yang terjadi setelah dilakukan ujiantang secara *in vivo* dengan bakteri *A. hydrophila*.

3.3 Bagan Konseptual



3.2 Hipotesis Penelitian

- 1) Pemberian bakterin *A. hydrophila* baik melalui metode perendaman maupun metode infiltrasi hiperosmotik dapat menimbulkan antibodi dan daya proteksi ikan mas terhadap infeksi *A. hydrophila*.
- 2) Ada perbedaan antara pemberian bakterin melalui metode perendaman dengan metode infiltrasi hiperosmotik terhadap titer antibodi dan persentase relatif proteksi ikan mas terhadap infeksi *A. hydrophila*.

- 3) Ada perbedaan titer antibodi pada setiap minggu selama delapan minggu dan persentase relatif proteksi ikan mas terhadap infeksi *A. hydrophila* pada minggu kedua, keempat, keenam, dan kedelapan setelah pemberian bakterin baik melalui metode perendaman maupun metode infiltrasi hiperosmotik.
- 4) Ada korelasi antara titer antibodi serum dengan daya proteksi ikan mas terhadap infeksi *A. hydrophila*.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan *split plot design* yang terdiri atas dua faktor. Faktor A yang ditempatkan sebagai petak utama (*main plot*) merupakan faktor waktu pengambilan serum darah ikan untuk penelitian yang bertujuan mengetahui titer antibodi dan waktu pemberian infeksi *A. hydrophila* untuk penelitian yang bertujuan mengetahui daya proteksi ikan mas. Faktor waktu tersebut terdiri dari delapan nilai untuk waktu pengambilan serum, yaitu mulai minggu pertama sampai minggu kedelapan, sedangkan waktu pemberian infeksi terdiri dari empat nilai, yaitu minggu ke II, IV, VI, dan VIII. Sedangkan faktor B ditempatkan sebagai petak bagian (*sub plot*) mempunyai tiga nilai, yaitu : tanpa pemberian bakterin sebagai kontrol, pemberian bakterin *A. hydrophila* dengan metode perendaman, dan dengan metode infiltrasi hiperosmotik.

4.2 Sampel dan Besar Sampel

Sampel berupa serum darah ikan mas yang berasal dari bak kontrol dan bak yang mendapat perlakuan vaksinasi bakterin, dimana sebanyak empat ekor ikan mas dari setiap unit bak (ulangan) diambil serumnya setiap minggu untuk diukur titer antibodi terhadap *A. hydrophila*. Besar sampel serum pada setiap pengamatan dari tiga perlakuan dan lima ulangan adalah sebesar 60 buah, sehingga dengan demikian besar sampel serum seluruhnya selama delapan kali pengamatan adalah 480 buah.

Sampel lainnya adalah berupa organ ginjal dan hati dari semua ikan mas yang mati setiap hari pada masing-masing bak kontrol dan perlakuan selama tujuh hari pengamatan setelah ditantang dengan bakteri *A. hydrophila* pada minggu ke II, IV, VI, dan VIII. Untuk ujiantang tersebut, masing-masing bak berisi enam ekor ikan mas, sehingga jumlah seluruh ikan mas yang diinfeksi sebanyak 360 ekor.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Klasifikasi Variabel

- 1) Variabel bebas : cara pemberian bakterin dan waktu pengambilan serum / pemberian infeksi.
- 2) Variabel tergantung : titer antibodi dan persentase relatif proteksi ikan mas.
- 3) Variabel kendali : cara pengukuran titer antibodi serum dengan uji aglutinasi, isolasi dan identifikasi *A. hydrophila* dari organ ginjal dan hati ikan mas setelah ditantang dengan bakteri *A. hydrophila*, umur ikan mas, jenis ikan mas serta kualitas air dari setiap bak tempat ikan mas dipelihara.

4.3.2 Definisi Operasional Variabel

- 1) Respon imun humoral spesifik, digambarkan melalui terbentuknya antibodi akibat pemberian bakterin *A. hydrophila* yang dapat diukur titer antibodi dengan uji aglutinasi dari serum darah ikan mas yang

diambil setiap minggu selama delapan minggu setelah pemberian bakterin.

- 2) Daya proteksi ikan mas terhadap infeksi *A. hydrophila* digambarkan melalui nilai persentase relatif proteksi, yang diperoleh dari pengamatan jumlah ikan mas yang mati dari kelompok yang divaksin dibandingkan dengan kelompok kontrol.
- 3) Bakterin adalah sediaan bakteri inaktif atau mati yang digunakan untuk vaksinasi. Dalam penelitian ini, inaktivasi dilakukan dengan cara pemanasan.

4.4 Bahan dan Materi Penelitian

4.4.1 Bahan

Aquadest, Alkohol, Larutan Kalium Permanganat, Water Test Kit (untuk amonium), Larutan fisiologis (NaCl), Natrium Karbonat, Indikator Phenophtalin, Tryptose Soya Broth (Difco), Nutrient Agar (Difco), Mac Conkey Agar, Media SIM (*Sulfid Indole Motility*), Media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), dan Media Citrat.

4.4.2 Materi Penelitian

a. Hewan percobaan

Penelitian ini menggunakan ikan Mas (*Cyprinus carpio*) berukuran 6-8 cm dan berumur \pm tiga bulan sebagai hewan uji yang diperoleh dari petani Desa Pangandaran, Kecamatan Ngeglok, Kabupaten Blitar. Jumlah ikan mas yang diperlukan untuk penentuan *Lethal*

Dose-50 sebanyak 70 ekor dan untuk penelitian eksperimental sebanyak 600 ekor dan 100 ekor sebagai cadangan, bila ada yang mati selama perjalanan atau selama aklimatisasi. Ikan mas tersebut dipelihara di dalam bak plastik, dimana pada masing-masing bak plastik diisi 10 ekor ikan mas. Pakan yang diberikan dua kali sehari dalam bentuk pelet komersial sebanyak 4 % per hari dari berat badan total ikan mas (Santoso, 1993).

b. Antigen

Antigen yang digunakan berupa bakterin *A. hydrophila*. Untuk menyiapkan bakterin tersebut, terlebih dahulu bakteri *A. hydrophila* (isolat 26) yang diperoleh dari Balai Penelitian Ikan Air Tawar Bogor, ditumbuhkan dalam Nutrient Agar (NA) selama 24 jam. Dari koloni yang terbentuk pada NA tersebut, dibiakkan dalam Tryptose Soya Broth (TSB, Difco) sebanyak 5 koloni/ml (Kingscote, 1989) pada suhu 25°C selama 24 jam (Lamers *et al.*, 1985).

Untuk mengetahui jumlah sel bakteri/ml yang tumbuh pada TSB tersebut, maka dilakukan pengenceran kelipatan dua dengan NaCl dan selanjutnya masing-masing pengenceran diukur nilai *absorbance* dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Untuk mengkonfirmasi hasilnya, setiap pengenceran tersebut diambil sebanyak 25µl dan ditetaskan serta diratakan pada NA. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 25°C dan koloni yang terbentuk dihitung, kemudian dibuat persamaan regresi

antara jumlah bakteri dengan hasil nilai *absorbance* pada spektrofotometer (Lampiran 1). Berdasarkan persamaan regresi tersebut, maka untuk mendapatkan jumlah bakteri sebanyak 10^8 sel/ml dapat dikonfirmasi melalui nilai *absorbance* yang diperoleh. Bakteri yang sudah tertentu jumlahnya diinaktivasi dengan pemanasan pada suhu 80°C selama 60 menit (Ali *et al.*, 1997). Untuk menguji hasil inaktivasi bakteri (bakterin) tersebut, maka suspensi bakterin dibiakkan pada NA. Bila tidak terjadi pertumbuhan koloni pada NA, maka bakterin tersebut benar-benar inaktif.

d. Serum hiperimun

Serum hiperimun yang digunakan berasal dari kelinci yang diimunisasi secara intramuskular dengan bakterin *A. hydrophila* setiap empat hari sekali. Dosis bakterin yang diberikan adalah : 0,5; 1,0; 2,0 dan 4,0 ml, dimana setiap ml bakterin tersebut mengandung 16 mg *A. hydrophila* (Torres *et al.*, 1992). Pada hari ketujuh setelah injeksi yang terakhir, diambil darahnya melalui jantung, dibiarkan beku dan serum yang keluar dikumpulkan.

4.5 Peralatan Penelitian

Bak plastik berbentuk oval sebanyak 60 buah dengan ukuran diameter diagonal 45 x 35,5 cm dan tinggi bak 21,5 cm, aerator, termometer, pH meter, timbangan, syringe, tabung reaksi, tabung sentrifus berskala, tabung mikrosentrifus, *haematocrit microcapillar tube*, pipet berskala, pipet Pasteur,

pipet dropper, diluter, mikroplate U (*round-bottom*), *erlenmeyer*, beker glass, petri dish, *autoclave*, inkubator, *water bath*, jarum ose, obyek glass, dan spektrofotometer.

4.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Virologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya. Penelitian ini berlangsung mulai bulan Juni 1998 sampai bulan Mei 1999.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Ikan

Bak plastik dan peralatan lainnya yang akan digunakan terlebih dahulu disucihamakan dengan larutan Kalium Permanganat 3 ppm selama 30 menit sebelum digunakan (Afrianto dan Liviawaty, 1992). Sebelum diberi perlakuan, ikan mas tersebut diaklimatisasikan selama satu minggu, kemudian diperiksa secara sampling status imunologisnya dengan uji mikro-aglutinasi serta dilakukan isolasi dan identifikasi bakteri *A. hydrophila* yang diambil dari usapan mucus permukaan sisik ikan mas. Untuk mengidentifikasi isolat yang diduga mengandung bakteri *A. hydrophila* pada mucus tersebut, digunakan uji biokimiawi dengan menggunakan media SIM (*Sulfid Indole Motility*), media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), dan media Citrat. Bila hasil identifikasi mengarah ke *A. hydrophila*, dikonfirmasi dengan uji slide aglutinasi menggunakan antiserum hiperimun. Hasil titer antibodi *A. hydrophila* dan identifikasi isolat dari mucus yang diperoleh nantinya digunakan sebagai data

awal dan apabila hasil isolat tersebut positif, menunjukkan bahwa ikan mas pernah kontak dengan *A. hydrophila*. Walaupun demikian, ikan mas tersebut tetap digunakan untuk penelitian selanjutnya, mengingat bahwa bakteri *A. hydrophila* merupakan flora normal.

4.7.2 Penentuan Lethal Dose 50

Pada penentuan LD 50, bakteri *A. hydrophila* yang digunakan berasal dari isolat 26. Dosis bakteri yang diinjeksikan secara intraperitoneal berkisar dari 10^5 sampai 10^{10} sel bakteri / ikan. Jumlah ikan mas yang digunakan untuk setiap kelompok pengenceran sel bakteri (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , dan kelompok kontrol adalah 10 ekor. Pengamatan mortalitas dilakukan selama tujuh hari setelah infeksi (Supriyadi dan Shariff, 1995). Untuk memastikan penyebab kematian ikan mas, dilakukan isolasi dari organ ginjal dan hati (Ruangpan *et al.*, 1986) pada Mac Conkey Agar. Kemudian diidentifikasi dengan cara biokimiawi dan dikonfirmasi dengan uji slide aglutinasi menggunakan antiserum *A. hydrophila* hiperimun yang telah dibuat sebelumnya.

Bila hasil reaksi dari uji biokimiawi dan uji slide aglutinasi positif, maka dapat disimpulkan bahwa penyebab kematian ikan mas tersebut adalah akibat infeksi *A. hydrophila*. Isolat tersebut positif *A. hydrophila*, apabila indole dan motilitas positif, TSIA menunjukkan asam-asam (tanpa adanya gas) dan citrat negatif (Austin dan Austin, 1987; Holt *et al.*, 1994). Dari data ikan mati yang positif akibat infeksi *A. hydrophila* pada masing-masing

kelompok pengenceran, dapat dihitung dengan menggunakan rumus Reed dan Muench (Anderson, 1974; Sakai *et al.*, 1992).

4.7.3 Pemberian Antigen

Bakterin *A. hydrophila* dosis 10^8 sel bakteri/ml (Lamers *et al.*, 1985) diberikan pada setiap ekor ikan mas dengan cara perendaman (*bath technique*) dan infiltrasi hiperosmotik. Lama perendaman ikan mas dengan larutan bakterin adalah satu jam dengan aerasi (Lamers *et al.*, 1985), sedangkan dengan teknik infiltrasi hiperosmotik, terlebih dahulu ikan mas dipaparkan dengan 2 % sodium chloride (NaCl) selama lima menit untuk membantu perembesan bakterin ke dalam tubuh ikan melalui kulit (Maas dan Bootsma, 1982). Setelah pemaparan dengan sodium chloride, dilakukan perendaman (*immersion*) dengan larutan bakterin selama satu jam dengan aerasi.

4.7.4 Pengambilan Serum

Sebelum dilakukan vaksinasi dengan bakterin *A. hydrophila* dan setiap minggu selama delapan minggu setelah vaksinasi dilakukan pengambilan serum untuk diukur titer antibodinya dengan uji aglutinasi. Untuk mendapatkan serum tersebut, ikan mas diambil darahnya melalui jantung dengan *haematocrit microcapillary tube* dan dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus. Setelah dibiarkan menggumpal dalam suhu kamar selama dua jam, serum yang keluar dapat diambil dengan pipet Pasteur dan kemudian dapat disimpan dalam *freezer* untuk uji aglutinasi (Anderson, 1974).



4.7.5 Penentuan Titer Antibodi Serum

Untuk menentukan titer antibodi serum, digunakan uji aglutinasi dengan prosedur mikrotiter. Serum darah diencerkan kelipatan dua dengan NaCl 0,85% pada mikroplate U (*round-bottom*) ditambah dengan larutan antigen *A. hydrophila* standard dengan volume yang sama dan digoyang perlahan. Setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama dua jam dan dilanjutkan inkubasi pada suhu 4°C semalam (Torres *et al.*, 1992), dilakukan pengamatan untuk melihat adanya aglutinasi pada pengenceran yang tertinggi dari antiserum, dimana aglutinasi nampak sebagai butir-butir halus yang homogen pada dasar lubang mikroplate. Titer antibodi serum adalah pengenceran tertinggi dari antiserum yang masih terlihat jelas adanya aglutinasi dikalikan dengan besarnya pengenceran dari antiserum.

4.7.6 Uji Tantang

Uji tantang dilakukan pada minggu kedua, keempat, keenam dan kedelapan setelah pemberian bakterin *A. hydrophila*. Setiap perlakuan diinjeksi bakteri *A. hydrophila* secara intraperitoneal dengan dosis sesuai hasil penentuan LD-50 yang menunjukkan adanya mortalitas 100 %. Jumlah ikan mati setiap hari setelah diinfeksi selama tujuh hari pengamatan untuk masing-masing perlakuan dicatat. Untuk mengkonfirmasi penyebab kematian ikan tersebut karena terinfeksi *A. hydrophila*, dilakukan diagnosa seperti pada prosedur penentuan *Lethal Dose-50*.

4.7.7 Pemantauan Kualitas Air

Untuk mengendalikan kualitas air, dilakukan pergantian air setiap tiga hari sekali dan untuk mengetahui kualitas air sebelum dan sesudah pergantian air, maka dilakukan pengukuran terhadap parameter CO₂, derajat keasaman (pH) dan suhu air. Untuk membantu meningkatkan kebutuhan oksigen terlarut sebagai salah satu parameter yang penting dalam budidaya ikan, digunakan aerator yang dilengkapi dengan selang aerator.

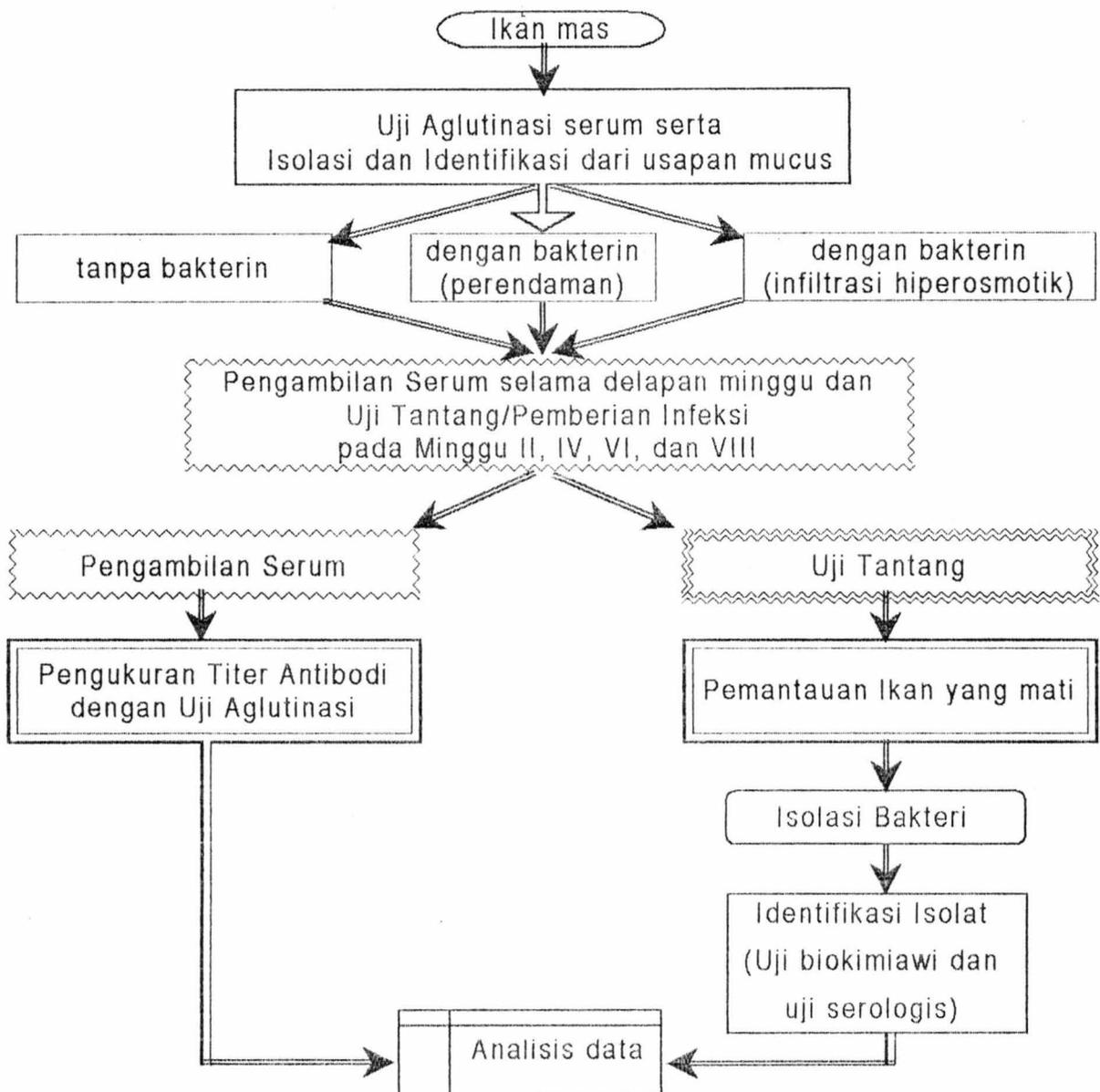
4.8 Teknik Analisis Data

Data hasil penelitian yang diperoleh berupa titer antibodi serum (log 2) dan persentase relatif proteksi. Menurut Austin dan Austin (1987), Roberts (1982); Robertsen *et al.* (1990), untuk menghitung persentase relatif proteksi ikan mas digunakan rumus : 100 % (1 - hasil pembagian nilai persentase ikan mati dari kelompok ikan yang divaksin dengan nilai persentase ikan mati dari kelompok ikan kontrol).

Sebelum dianalisis dengan menggunakan analisis varian, terlebih dahulu dilakukan transformasi ke $\sqrt{y + 1/2}$ untuk data titer antibodi serum dan untuk data persentase relatif proteksi ditransformasi ke $\text{arc. sin. } \sqrt{p/100}$ (Hanafiah, 1991). Untuk mengetahui pengaruh petak utama (faktor waktu) dan petak bagian (faktor pemberian bakterin), serta kemungkinan adanya interaksi antara faktor waktu dan faktor pemberian bakterin dilakukan analisis varian (uji F). Apabila hasil uji F dengan taraf uji 5 % menunjukkan adanya pengaruh, maka untuk mengetahui lebih lanjut dilakukan analisis lanjutan dengan menggunakan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) (Steel dan Torrie, 1991).

Selain itu digunakan uji koefisien korelasi Pearson untuk mengetahui adanya korelasi antara titer antibodi serum dengan daya proteksi ikan mas. Untuk menganalisa data hasil penelitian yang sudah ditransformasi dan ditabulasi sesuai dengan kelompoknya digunakan program *SPSS rel 7.5 for Windows 95*.

4.9 Kerangka Kerja



BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

Pada awal pelaksanaan penelitian dilakukan pengujian untuk mengetahui apakah ikan mas telah terpapar oleh bakteri *A. hydrophila* dan bagaimana status imunologis ikan mas sebagai ikan uji. Setelah dilakukan isolasi dan identifikasi dari usapan mucus yang diambil dari 50 ekor sampel ikan mas serta penentuan status imunologis dari sampel serum ikan mas, diperoleh hasil seperti yang terlihat pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Hasil Identifikasi dan Status Imunologis dari 50 Ekor Sampel Ikan Mas Sebelum Perlakuan

Sampel	N	Uji Biokimia		Citrat	Uji Aglutinasi	
		TSIA	SIM		Slide Pos/Neg	mikro Titer Ab
Mucus	11	Asam-Asam	Neg.	Negatip	-	-
	13	Basa-Asam	Neg.	Positip	-	-
	14	Basa-Asam	Pos. Kuat	Positip	-	-
	12	Basa-Asam	Pos. Lemah	Negatip	-	-
Isolat <i>A. hydrophila</i> (Kontrol)		Asam-Asam	Pos.	Negatip	Positip	-
Serum	38	-	-	-	-	2 ⁰
	12	-	-	-	-	2 ¹

Keterangan: N = Jumlah sampel
- = tidak dilakukan

Dari sampel sebanyak 50 ekor yang diisolasi dan diidentifikasi melalui uji biokimiawi dengan menggunakan media SIM menunjukkan indol positif lemah (12), positif kuat (14), indol negatif (24), dengan media TSIA terlihat

asam-asam (11), basa-asam (39) dan dengan media Citrat menunjukkan hasil positif (27), dan yang negatif (23). Setelah dibandingkan dengan kontrol (isolat *A. hydrophila*) yang menunjukkan hasil positif dengan media SIM, asam-asam dengan TSIA dan dengan media Citrat menunjukkan hasil negatif, maka identifikasi sampel mucus ikan mas tidak dilanjutkan dengan uji slide aglutinasi. Sedangkan pengukuran titer antibodi dari sampel serum ikan mas dengan mikro-aglutinasi menunjukkan sebanyak 38 sampel serum tidak terdapat antibodi spesifik terhadap bakteri *A. hydrophila* dan 12 sampel serum terdapat antibodi spesifik dengan titer ($\log 2$) sebesar 2^1 .

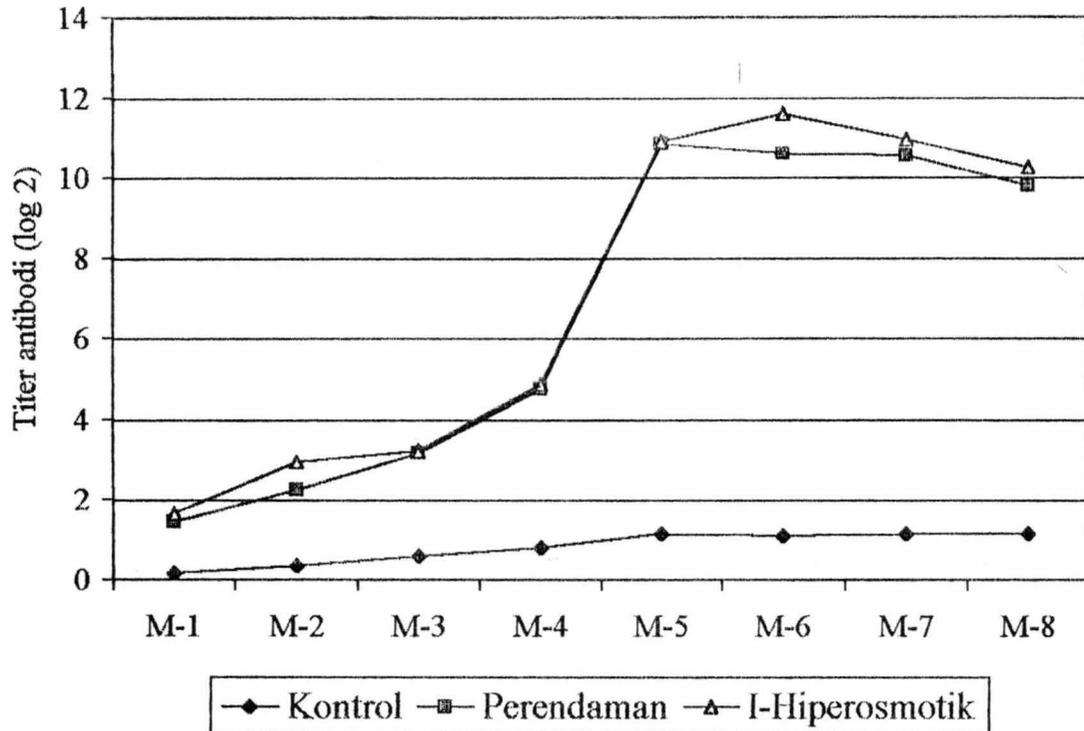
Seminggu setelah aklimatisasi, dilakukan pemberian bakterin *A. hydrophila* melalui perendaman dan infiltrasi hiperosmotik. Setiap minggu selama delapan minggu dilakukan pengambilan serum dari kelompok kontrol, kelompok perendaman, dan kelompok infiltrasi hiperosmotik. Hasil penentuan titer antibodi serum terhadap *A. hydrophila* dengan mikro-aglutinasi tercantum pada Tabel 5.2 dan Gambar 5.1 yang merupakan gambaran kinetis respon imun humoral spesifik.

Pada kelompok perlakuan dengan infiltrasi hiperosmotik, terlihat titer antibodi serum yang terbentuk cenderung lebih tinggi dibanding kelompok perlakuan dengan perendaman, tampak pada minggu pertama, kedua, keempat, keenam, ketujuh, dan kedelapan. Titer antibodi serum ($\log 2$) tersebut meningkat dan mencapai puncaknya pada minggu keenam (11,60) untuk kelompok perlakuan dengan infiltrasi hiperosmotik, sedangkan untuk kelompok perlakuan dengan perendaman terlihat pada minggu kelima (10,85) (Gambar 5.1). Selanjutnya terjadi penurunan titer antibodi serum setelah

minggu keenam untuk kelompok perlakuan dengan infiltrasi hiperosmotik dan pada kelompok perlakuan dengan perendaman, terjadi sedikit penurunan titer antibodi mulai minggu kelima sampai minggu ketujuh.

Tabel 5.2 Titer Antibodi Serum (Log₂) Ikan Mas Kelompok Kontrol dan Kelompok Pemberian Bakterin terhadap *A. hydrophila* Selama Delapan Minggu

Perlakuan	Minggu							
	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7	M 8
Kontrol	0,25	0,50	0,75	0,75	1,00	1,00	1,00	1,00
	0,25	0,50	0,75	0,75	1,00	1,00	1,00	1,00
	0,25	0,25	0,50	1,00	1,25	1,25	1,25	1,25
	0	0,25	0,50	0,75	1,25	1,25	1,25	1,25
	0	0,25	0,50	0,75	1,25	1,00	1,25	1,25
Rata-rata	0,15	0,35	0,60	0,80	1,15	1,10	1,15	1,15
SD	0,14	0,14	0,14	0,11	0,14	0,14	0,14	0,14
Perendaman	1,25	2,00	3,00	4,50	10,75	10,50	10,50	10,00
	1,25	2,25	3,00	4,50	10,75	10,50	10,50	9,50
	1,50	2,25	3,25	5,00	11,00	10,50	10,50	9,75
	1,75	2,50	3,25	4,75	10,75	10,75	10,75	10,00
	1,50	2,25	3,25	5,00	11,00	10,75	10,50	9,75
Rata-rata	1,45	2,25	3,15	4,75	10,85	10,60	10,55	9,80
SD	0,21	0,18	0,14	0,25	0,14	0,14	0,11	0,21
Infiltrasi Hiper-osmotik	1,50	2,75	3,00	4,75	10,75	11,50	10,75	10,00
	1,75	2,75	3,00	4,50	10,75	11,50	10,75	10,00
	1,50	3,00	3,25	5,00	11,00	11,50	11,00	10,50
	1,75	3,00	3,25	5,00	11,00	11,75	11,25	10,50
	1,75	3,25	3,50	5,00	11,00	11,75	11,00	10,25
Rata-rata	1,65	2,95	3,20	4,85	10,90	11,60	10,95	10,25
SD	0,14	0,21	0,21	0,22	0,14	0,14	0,21	0,25



Gambar 5.1. Kinetis respon imun humoral spesifik pada ikan mas dari kelompok kontrol, kelompok perendaman, dan kelompok infiltrasi hiperosmotik.

Untuk mengetahui efektivitas pemberian bakterin *A. hydrophila* dilakukan uji tantang dengan menginfeksi ikan mas secara intraperitoneal. Dosis bakteri *A. hydrophila* yang digunakan untuk infeksi adalah 1000 LD50, dimana nilai LD50 terlebih dahulu ditentukan pada awal penelitian. Hasil penentuan LD50 tercantum pada Tabel 5.3 dan perhitungan dengan rumus Reed; Muench (Lampiran 3), maka LD50 terdapat pada pengenceran 10^{-2} , dimana pada pengenceran tersebut mengandung bakteri *A. hydrophila* sebanyak 10^{11} sel bakteri/ml.

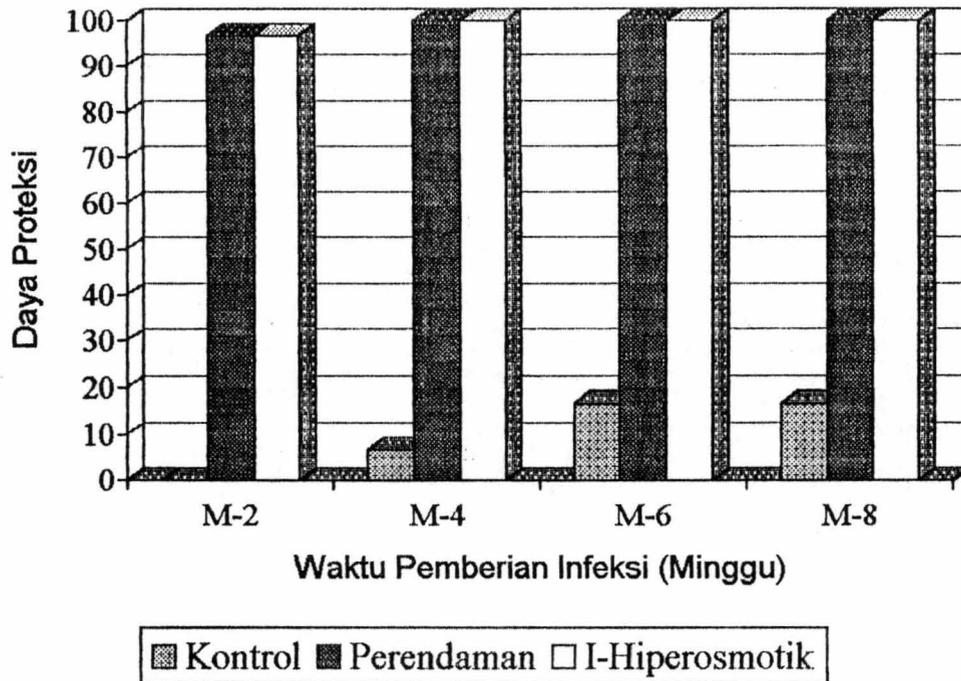
Tabel 5.3. Persentase Ikan Mas yang mati pada Penentuan LD-50 *A. hydrophila*

Pengenceran Kuman	Dosis (sel/0,1 ml)	Jml. Ikan Mati	Ratio Ikan Mati	% Ikan Mati
10 ⁻¹	10 ¹¹	6	6/10	60
10 ⁻²	10 ¹⁰	4	4/10	40
10 ⁻³	10 ⁹	2	2/10	20
10 ⁻⁴	10 ⁸	2	2/10	20
10 ⁻⁵	10 ⁷	1	1/10	10

Ujiantang dilakukan pada minggu kedua, keempat, keenam, dan kedelapan dengan dosis 10¹³ sel/0,1 ml yang diinjeksikan secara intraperitoneal. Hasil pengamatan selama seminggu menunjukkan bahwa ikan mas dari kelompok perlakuan protektif terhadap infeksi *A. hydrophila*, sebagaimana yang tercantum pada Gambar 5.2 dan Tabel 5.4. Sedangkan pada kelompok kontrol (tanpa pemberian bakterin), terlihat rata-rata ikan mas yang mati pada minggu kedua, keempat, keenam, dan kedelapan setelah diinfeksi adalah : 100 %, 93,33 %, 83,33 %, dan 83,33 %. Walaupun terlihat penurunan kematian pada kelompok kontrol setelah diinfeksi dengan *A. hydrophila*, namun kematian yang terjadi pada minggu keempat, keenam, dan kedelapan lebih dari 50 %.

Tabel 5.4 Persentase Ikan Mati dan Persentase Ikan Hidup dari Kelompok Kontrol dan Kelompok Pemberian Bakterin Setelah Diinfeksi *A. hydrophila* pada Minggu Kedua, Keempat, Keenam, dan Kedelapan

Perlakuan	% Ikan Mati				% Relatif Ikan Hidup			
	M 2	M 4	M 6	M 8	M 2	M 4	M 6	M 8
Kontrol	100	100	100	100	0	0	0	0
	100	100	83,33	83,33	0	0	16,67	16,67
	100	100	83,33	83,33	0	0	16,67	16,67
	100	83,33	83,33	83,33	0	16,67	16,67	16,67
	100	83,33	66,67	66,67	0	16,67	33,33	33,33
Rata-rata	100	93,33	83,33	83,33	0	6,67	16,67	16,67
SD	0	9,13	11,78	11,78	0	9,13	11,78	11,78
Perendaman	16,67	0	0	0	83,33	100	100	100
	0	0	0	0	100	100	100	100
	0	0	0	0	100	100	100	100
	0	0	0	0	100	100	100	100
	0	0	0	0	100	100	100	100
Rata-rata	3,33	0	0	0	96,67	100	100	100
SD	7,45	0	0	0	7,45	0	0	0
Infiltrasi Hiperosmotik	16,67	0	0	0	83,33	100	100	100
	0	0	0	0	100	100	100	100
	0	0	0	0	100	100	100	100
	0	0	0	0	100	100	100	100
	0	0	0	0	100	100	100	100
Rata-rata	3,33	0	0	0	96,67	100	100	100
SD	7,45	0	0	0	7,45	0	0	0



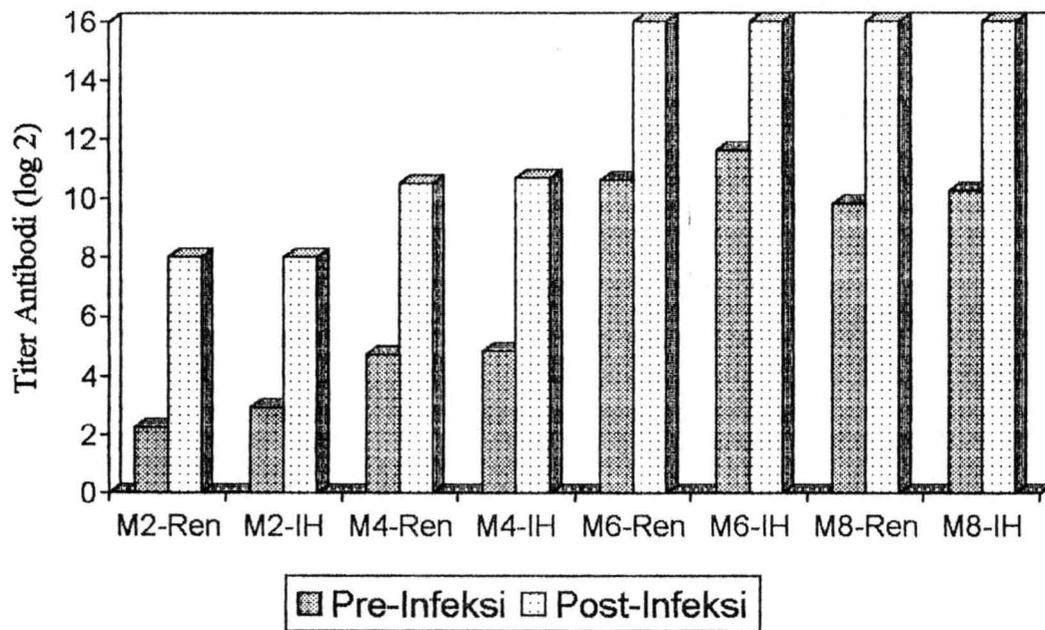
Gambar 5.2 Diagram batang yang menggambarkan daya proteksi ikan mas dari kelompok kontrol, kelompok perendaman, dan kelompok infiltrasi hiperosmotik setelah diinfeksi pada minggu kedua, keempat, keenam, dan kedelapan.

Pada kelompok ikan mas yang hidup atau protektif terhadap infeksi *A. hydrophila* setelah seminggu inkubasi diambil serumnya. Setelah dilakukan pengukuran titer antibodi serum dengan mikro-aglutinasi, ternyata terdapat peningkatan titer antibodi serum, seperti yang terlihat pada Tabel 5.5 dan Gambar 5.3.

Tabel 5.5 Rata-Rata Titer Antibodi Serum (Log₂) Ikan Mas dari Kelompok Perendaman dan Infiltrasi Hiperosmotik Sebelum dan Sesudah Diinfeksi Bakteri *A. hydrophila*

Perlakuan	Minggu							
	Minggu kedua		Minggu keempat		Minggu keenam		Minggu kedelapan	
	Sebelum	Sesudah	Sebelum	Sesudah	Sebelum	Sesudah	Sebelum	Sesudah
Perendaman	2,25	8,00	4,75	10,50	10,60	16,00	9,80	16,00
Infiltrasi Hiperosmotik	2,95	8,00	4,85	10,67	11,60	16,00	10,25	16,00

Gambar 5.3 menyajikan titer antibodi serum yang terbentuk sebelum dan sesudah diinfeksi pada minggu kedua, keempat, keenam, dan kedelapan untuk kelompok perendaman dan infiltrasi hiperosmotik. Tampak pada Gambar 5.3, peningkatan titer antibodi serum seminggu setelah terinfeksi yang merupakan respon imun sekunder dibanding titer antibodi serum sebelum terinfeksi. Pada minggu kedua untuk kelompok perendaman, terlihat titer antibodi serum yang terbentuk setelah terinfeksi hampir empat kali lipat dari titer antibodi serum sebelum terinfeksi, sedangkan untuk kelompok infiltrasi hiperosmotik lebih dari dua kali lipat. Demikian pula titer antibodi serum yang terbentuk setelah terinfeksi pada minggu keempat dan keenam baik untuk kelompok perendaman maupun infiltrasi hiperosmotik hampir dua kali lipat titer antibodi serum sebelum terinfeksi pada kelompok yang sama. Dibanding dengan minggu kedua, keempat, dan kedelapan, tampak peningkatan titer antibodi serum setelah terinfeksi pada minggu keenam untuk kelompok infiltrasi hiperosmotik tidak terlihat mencolok.



Gambar 5.3 Diagram batang yang menggambarkan titer antibodi serum ikan mas dari kelompok perendaman dan kelompok infiltrasi hiperosmotik pada pre-infeksi dan post-infeksi.

Selama penelitian, dilakukan monitoring terhadap kualitas air sebagai variabel terkendali, yang dilakukan sebelum dan sesudah pergantian air dalam bak ikan. Parameter kualitas air yang diukur adalah suhu air, derajat keasaman (pH), kadar amonium, dan kadar karbon dioksida (CO₂), dan hasilnya relatif stabil baik sebelum maupun sesudah pergantian air, seperti yang terlihat pada Tabel 5.6.

Tabel 5.6. Hasil Kualitas Air dalam Bak Ikan Mas Sebelum dan Sesudah Pergantian Air

Parameter	Waktu	Kontrol	Perendaman	I. Hiperosmotik
Temperatur	Sebelum	27°C-28°C	27°C-28°C	27°C-28°C
	Sesudah	27°C-28°C	27°C-28°C	27°C-28°C
Derajat Keasaman (pH)	Sebelum	6,9-7,2	6,9-7,2	6,9-7,2
	Sesudah	6,9-7,2	6,9-7,2	6,9-7,2
Amonium	Sebelum	0 mg/l NH ₄ ⁺	0 mg/l NH ₄ ⁺	0 mg/l NH ₄ ⁺
	Sesudah	0 mg/l NH ₄ ⁺	0 mg/l NH ₄ ⁺	0 mg/l NH ₄ ⁺
Karbon dioksida	Sebelum	0,2 mg/l Na ₂ CO ₃	0,2 mg/l Na ₂ CO ₃	0,2 mg/l Na ₂ CO ₃
	Sesudah	0,2 mg/l Na ₂ CO ₃	0,2 mg/l Na ₂ CO ₃	0,2 mg/l Na ₂ CO ₃

5.2 Analisis Data

Untuk mengetahui apakah titer antibodi serum ikan mas pada awal penelitian, yaitu sebelum ikan mas diberi perlakuan dapat mempengaruhi hasil penelitian, maka perlu dilakukan pengujian statistik. Hasil pengujian dengan menggunakan Kolmogorov-Smirnov Z, menunjukkan data titer antibodi serum awal berdistribusi normal, seperti tampak pada Lampiran 4.

Semua data hasil penelitian ditabulasikan sesuai dengan kelompoknya dan dilakukan pengujian dengan analisis varians untuk mengetahui adanya pengaruh perlakuan dan interaksi antara faktor perlakuan dan dilanjutkan pengujian statistik dengan uji BNT. Hasil analisis varian dari data titer antibodi serum ikan mas selama delapan minggu tercantum pada Lampiran 5 dan Tabel 5.7 merupakan hasil uji BNT yang dapat menunjukkan adanya perbedaan bermakna dari setiap data hasil pengamatan setiap minggu maupun setiap perlakuan serta interaksi antara keduanya.

Hasil analisis varians (Lampiran 5) menunjukkan adanya pengaruh yang sangat nyata ($p < 0,01$) dari perlakuan (kontrol, perendaman, dan infiltrasi hiperosmotik), minggu pengambilan serum (minggu-1, 2, 3, 4, 5, 6,7, dan 8) terhadap titer antibodi serum ikan mas. Disamping itu juga terdapat interaksi yang sangat nyata ($p < 0,01$) antara perlakuan dengan minggu pengambilan serum terhadap titer antibodi serum.

Pada Tabel 5.7, tampak adanya perbedaan yang sangat nyata dengan taraf uji 99% antara kontrol, pemberian bakterin dengan perendaman, dan melalui infiltrasi hiperosmotik terhadap titer antibodi serum pada setiap minggu (Lampiran 6). Pengujian statistik dengan uji BNT terhadap faktor minggu pengambilan serum, ternyata tidak terdapat perbedaan titer antibodi serum yang nyata ($p > 0,05$) antara minggu kedua dan ketiga, serta antara minggu kelima, keenam, ketujuh, dan kedelapan (Lampiran 7).

Tabel 5.7 Hasil Pengujian Statistik dengan Uji BNT terhadap Rata-Rata Titer Antibodi Serum (Log₂) Ikan Mas Kelompok Kontrol dan Kelompok Pemberian Bakterin terhadap *A. hydrophila* Selama Delapan Minggu (data ditransformasi ke $\sqrt{x + 0,5}$)

Perlakuan	Minggu								Rata ²
	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7	M 8	
Kontrol	0,80 ^a	0,92 ^{ab}	1,05 ^{bc}	1,14 ^{cd}	1,28 ^{dhp}	1,26 ^{deh}	1,28 ^{dfg}	1,28 ^{dg}	1,13 ^x
Perendaman	1,39 ^{gh}	1,66 ^{ip}	1,91 ^{jr}	2,29 ^{kq}	3,37 ^{lu}	3,33 ^{lmv}	3,32 ^{lnu}	3,21 ^{lo}	2,56 ^y
I. Hiperosmotik	1,46 ^{gp}	2,43 ^{qs}	1,92 ^r	2,31 ^{ks}	3,38 ^{llu}	3,48 ^u	3,38 ^{luv}	3,28 ^{luw}	2,71 ^z
Rata ² minggu	1,22 ^A	1,67 ^{BC}	1,63 ^C	1,91 ^D	2,68 ^E	2,69 ^{EF}	2,66 ^{EG}	2,59 ^{EH}	2,13

Notasi berbeda pada baris dan kolom yang sama menunjukkan perbedaan.

Pengujian statistik lebih lanjut dengan uji BNT terhadap interaksi antara perlakuan dengan minggu pengambilan serum terhadap titer antibodi serum (Tabel 5.7), tampak pada kontrol minggu kelima tidak menunjukkan perbedaan titer antibodi yang nyata ($p > 0,05$) dengan kontrol minggu keenam, ketujuh, kedelapan, perendaman minggu pertama, dan infiltrasi hiperosmotik minggu pertama. Sedangkan pada perlakuan perendaman, dimana puncak titer antibodi terjadi pada minggu kelima ternyata tidak menunjukkan perbedaan titer antibodi yang nyata ($p > 0,05$) dengan perendaman minggu keenam, ketujuh, kedelapan dengan perlakuan infiltrasi hiperosmotik minggu kelima, keenam, ketujuh, dan kedelapan. Demikian pula minggu keenam yang merupakan puncak titer antibodi pada perlakuan infiltrasi hiperosmotik tidak menunjukkan perbedaan titer antibodi yang nyata ($p > 0,05$) dengan minggu kelima, ketujuh, kedelapan, dengan perlakuan perendaman minggu kelima, keenam, dan ketujuh.

Pada pengujian statistik terhadap daya proteksi ikan mas sebagai variabel tergantung dengan analisis varians menunjukkan pengaruh sangat nyata ($p < 0,01$) dari perlakuan dan waktu pemberian infeksi *A. hydrophila* terhadap daya proteksi ikan mas. Sedangkan interaksi antara perlakuan dan waktu pemberian infeksi tidak terlihat nyata pengaruhnya terhadap daya proteksi ikan mas (Lampiran 8). Untuk mengetahui lebih lanjut perbedaan pengaruh dari faktor perlakuan dan waktu pemberian infeksi terhadap daya proteksi ikan mas dilakukan analisis lanjutan dengan uji BNT, dan hasilnya seperti yang terlihat pada Tabel 5.8, Lampiran 9 dan Lampiran 10.

Pada Tabel 5.8 terlihat perbedaan daya proteksi yang nyata ($p < 0,05$) antara minggu kedua dan minggu keempat, tetapi antara minggu kedua, keenam, dan kedelapan terlihat perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$). Pengaruh antar perlakuan terhadap daya proteksi ikan mas juga terlihat melalui uji BNT, terutama antara kontrol dengan pemberian bakterin melalui perendaman dan infiltrasi hiperosmotik terdapat perbedaan pengaruh yang sangat nyata ($p < 0,01$) terhadap daya proteksi ikan mas.

Tabel 5.8 Hasil Pengujian Statistik dengan Uji BNT terhadap Rata-Rata Daya Proteksi Ikan Mas Kelompok Kontrol dan Kelompok Pemberian Bakterin terhadap *A. hydrophila* (data ditransformasi ke Arc.Sin. $\sqrt{p/100}$)

Perlakuan	Minggu				Rata-rata
	M 2	M 4	M 6	M 8	
Kontrol	7,03	13,86	22,92	22,92	16,68 ^a
Perendaman	79,55	82,96	82,96	82,96	82,11 ^b
I. Hiperosmotik	79,55	82,96	82,96	82,96	82,11 ^{bc}
Rata-rata	55,37 ^A	59,93 ^B	62,95 ^{BC}	62,95 ^{BD}	-

Notasi berbeda pada baris dan kolom yang sama menunjukkan perbedaan.

Untuk mengetahui korelasi antara titer antibodi serum dengan daya proteksi ikan mas terhadap infeksi *A. hydrophila* dilakukan pengujian statistik menggunakan uji koefisien korelasi Pearson. Hasilnya menunjukkan adanya korelasi yang sangat erat ($p < 0,01$) dengan nilai koefisien korelasi R sebesar 0,809 (Lampiran 11) dan model regresi seperti yang tampak pada Gambar 5.4. Pada Gambar 5.4. terlihat semakin tinggi titer antibodi serum

BAB 6 PEMBAHASAN

Vaksinasi dengan bakterin *Aeromonas hydrophila* merupakan cara yang paling efektif untuk mencegah penyakit *Haemorrhage Septicaemia* yang sering merupakan kendala dalam budidaya ikan mas. Vaksinasi dengan metode perendaman dan infiltrasi hiperosmotik atau perendaman tidak langsung, dimana ikan mas direndam dalam larutan hipertonik dahulu beberapa saat sebelum direndam dengan larutan bakterin, ternyata sangat efektif dalam menimbulkan ketahanan ikan terhadap infeksi *A. hydrophila*. Hal ini terbukti dari uji Beda Nyata Terkecil (BNT) yang menunjukkan bahwa pemberian bakterin baik melalui perendaman maupun infiltrasi hiperosmotik dapat menimbulkan antibodi dan memberikan perlindungan atau ketahanan yang sangat nyata ($p < 0,01$) terhadap infeksi bakteri *A. hydrophila*. Beberapa peneliti juga telah membuktikan bahwa vaksinasi dengan metode perendaman dan infiltrasi hiperosmotik dapat menimbulkan ketahanan ikan terhadap infeksi bakteri, bahkan Baba *et al.* (1988) membuktikan bahwa imunisasi ikan mas dengan *crude* lipopolisakarida (LPS) melalui cara perendaman dapat memberikan daya proteksi atau ketahanan ikan mas lebih baik dibanding imunisasi melalui cara intraperitoneal.

Pemberian bakterin dengan metode perendaman dan infiltrasi hiperosmotik memungkinkan antigen bakterin masuk melalui insang, kulit, dan usus. Pendapat ini ditunjang oleh hasil penelitian Smith (1982), yang menunjukkan bahwa vaksinasi dengan perendaman dan hiperosmotik, sebagian besar antigen masuk melalui insang, walaupun keterlibatan kulit dan usus

sama sekali tidak dapat dikesampingkan. Berbeda dengan hasil penelitian Alexander *et al.* (1982), dimana bakteri hanya ditemukan pada insang setelah infiltrasi hiperosmotik yang dihubungkan dengan adanya kerusakan pada lamela insang, tetapi tidak ditemukan pada jaringan integument. Demikian pula halnya dengan hasil penelitian Bowers dan Alexander dalam Smith (1982) yang menggambarkan bahwa insang sebagai pintu gerbang utama tempat masuknya *Escherichia coli* ketika diberikan melalui infiltrasi hiperosmotik. Hasil penelitian *in vitro* dari Alexander *et al.* (1982), menggambarkan bahwa bakteri secara cepat dapat masuk menembus lamela insang, tetapi tidak melalui kulit, jika ikan terlebih dahulu mendapatkan shock osmotik. Sedangkan Amend dan Fender dalam Alexander *et al.* (1982), mendeteksi adanya *bovine serum albumin* (BSA) dalam konsentrasi tinggi pada daerah *lateral line* dan insang setelah perlakuan infiltrasi hiperosmotik pada ikan rainbow trout.

Selanjutnya antigen bakterin *A. hydrophila* yang masuk melalui insang, dan kulit tersebut akan ditangkap dan diproses terlebih dahulu oleh sel-sel makrofag yang terdapat di insang, dan epidermis kulit sebelum disajikan sebagai suatu molekul yang dikenali oleh sel-sel limfosit. Sedangkan antigen yang kemungkinan ditelan selama perendaman dengan bakterin akan ditangkap oleh sel-sel makrofag intraepithelial yang terdapat pada segmen kedua dari usus. Disamping itu, sel-sel makrofag yang terdapat pada ginjal dan limpa juga turut berperan dalam menangkap antigen bakterin tersebut. Fenomena ini didukung oleh hasil penelitian Smith (1982) yang menunjukkan bahwa 24 jam setelah perlakuan infiltrasi hiperosmotik, terlihat adanya

aktivitas seluler pada daerah ginjal dan limpa. Sedangkan pada daerah insang, kulit dan usus; aktivitas seluler terlihat dalam waktu empat jam, enam jam dan delapan jam setelah infiltrasi hiperosmotik dengan BSA yang dilabel dengan tritium.

Seperti telah disebutkan di atas, antigen bakterin tersebut terlebih dahulu akan ditangkap oleh sel-sel makrofag sebagai sel penyaji antigen (APC = *antigen presenting cells*) untuk dipresentasikan pada permukaan sel. Akibatnya makrofag yang teraktivasi oleh antigen bakterin tersebut akan melepaskan interleukin (IL)-1 yang dapat menginduksi limfosit T dan selanjutnya melakukan komunikasi dengan sel B melalui interleukin yang diproduksi oleh sel *T-helper*. Limfosit B yang sudah teraktivasi melakukan proliferasi dan diferensiasi menjadi sel plasma untuk memproduksi antibodi.

Kemampuan ikan mas membentuk antibodi spesifik terhadap antigen *A. hydrophila* pada ikan mas selama delapan minggu dapat dilihat pada Gambar 1 yang menggambarkan kinetik respon humoral spesifik. Pada Gambar 1, terlihat bahwa pada minggu pertama baik dari kelompok ikan yang divaksin dengan perendaman, maupun yang divaksin dengan infiltrasi hiperosmotik terdapat titer antiserum. Menurut Subowo (1993) dan Herscowitz (1993), segera setelah pemaparan antigen merupakan periode laten atau periode induktif, karena belum dapat ditunjukkan adanya antibodi. Dalam periode tersebut masih berlangsung perubahan-perubahan seluler, yaitu: pengenalan, transformasi sel, pembelahan dan diferensiasi. Fenomena ini telah dibuktikan oleh Lamers dan Pilarczyk (1982) dalam penelitiannya, dimana pada hari ke 10 setelah inkubasi dengan larutan antigen-O *Y. ruckeri*

terlihat adanya puncak respon *plaque forming cell* (PFC) kemudian menurun setelah 10 hari, selanjutnya sirkulasi antibodi mulai timbul dan segera meningkat jika PFC sudah tidak terdeteksi lagi.

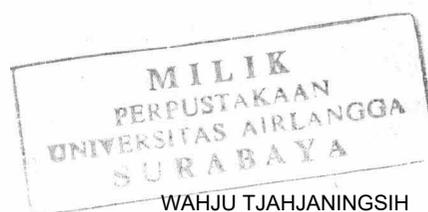
Dalam penelitian ini, pada minggu pertama sudah terdapat antibodi serum (Gambar 1), sehingga diperkirakan periode induktif berlangsung kurang lebih satu minggu. Berbeda dengan hasil penelitian Areechon dan Karoon (1995), dimana periode induktif pada catfish berlangsung lebih lama (lebih dari seminggu) setelah diinjeksi intraperitoneal dengan vaksin *A. hydrophila* yang dinaktifkan dengan formalin. Demikian pula pada penelitian Lamers dan Pilarczyk (1982) ikan carp yang diinkubasi dengan larutan antigen *Y. ruckeri* 15 mg/l, mempunyai periode induktif lebih dari seminggu, dimana antibodi serum baru terlihat setelah 18 hari. Menurut Herscowitz (1993), lamanya periode induktif tersebut bervariasi, antara lain tergantung pada spesies hewan dan rute imunisasi.

Setelah berakhirnya periode induktif, akan diikuti periode biosintesis aktif antibodi yang dibedakan dalam 3 fase, yaitu : fase logaritmik, fase datar dan fase penurunan (Subowo, 1993; Herscowitz, 1993). Pada Gambar 1 terlihat, mulai minggu pertama terjadi kenaikan titer antibodi secara logaritmik, terbukti melalui uji BNT yang menunjukkan adanya perbedaan sangat nyata ($p < 0,05$) antara minggu pertama dengan minggu berikutnya sampai pada minggu dimana titer antibodi serum mencapai puncaknya baik pada kelompok ikan diberi bakterin *A. hydrophila* melalui perendaman maupun infiltrasi hiperosmotik. Kenaikan titer antibodi disebabkan oleh bertambah banyaknya plasmasit sebagai hasil pembelahan berulang sel-sel B. Walaupun

berdasarkan uji BNT antara minggu kedua dan minggu ketiga tidak terdapat perbedaan titer antibodi yang nyata ($p < 0,05$), namun masih tampak peningkatan titer antibodi serum pada minggu ketiga dibanding dengan minggu kedua (Tabel 5.2 dan Gambar 5.1).

Pada Gambar 1, terlihat fase logaritmik tersebut berakhir pada puncak titer antibodi atau akhir dari fase logaritmik terjadi pada minggu kelima untuk perlakuan dengan perendaman, dan minggu keenam untuk perlakuan dengan infiltrasi hiperosmotik. Hal ini menunjukkan saat terbentuknya puncak titer antibodi pada ikan mas berbeda antara perlakuan perendaman dengan infiltrasi hiperosmotik, terbukti melalui uji BNT yang menunjukkan ada perbedaan sangat nyata ($p < 0,01$) antara perlakuan perendaman dengan infiltrasi hiperosmotik terhadap terbentuknya antibodi spesifik *A. hydrophila*. Pada perlakuan infiltrasi hiperosmotik, dimana ikan mas terlebih dahulu mendapatkan shock osmotik, maka kemungkinan jumlah antigen bakterin yang masuk lebih banyak dibanding perlakuan perendaman, sehingga diduga dapat mempengaruhi terbentuknya titer antibodi serum. Dugaan ini didukung oleh hasil penelitian Lamers dan Pilarczyk (1982), dimana puncak titer antibodi ikan *carp* yang diinjeksi intramuskular dengan 100 μ g antigen O *Y. ruckeri* terjadi pada hari ke-26, dan bila diinjeksi secara intraperitoneal, puncak titer antibodi terjadi pada hari ke-16.

Pada Gambar 1 tidak terlihat adanya fase datar, sedangkan fase penurunan terjadi setelah puncak titer antibodi serum tercapai. Walaupun berdasarkan gambaran kinetis respon imun humoral tidak terlihat adanya fase datar, namun hasil uji BNT menunjukkan tidak terdapat perbedaan nyata



($p > 0,05$) antara minggu saat tercapainya puncak titer antibodi serum dengan minggu berikutnya. Hal ini menunjukkan penurunan titer antibodi yang terjadi tidak terlalu tajam (drastis) setelah titer antibodi mencapai puncaknya. Hasil ini berbeda dengan penelitian Lamers dan Pilarczyk (1982), dimana terjadi penurunan titer antibodi yang drastis mulai hari ke-34 hingga hari ke-42 dan kemudian terjadi peningkatan titer antibodi serum pada ikan mas yang diinkubasi dengan larutan antigen O *Yersinia ruckeri* 15 mg/l. Bervariasinya hasil vaksinasi tergantung pada spesies ikan, jenis vaksin dan cara vaksinasi (Nitimulyo, 1990), seperti yang terlihat pada hasil penelitian Vinitnantharat dan Plumb (1992), terlihat ada penurunan titer antibodi mulai minggu keempat setelah channel catfish diinjeksi intraperitoneal dengan *E. ictaluri* yang dinaktifkan dengan formalin.

Bila mengacu pada hasil uji BNT yang menunjukkan tidak terdapat perbedaan titer antibodi yang nyata ($p > 0,05$) antara minggu kelima kelompok perendaman dengan minggu keenam, ketujuh, dan kedelapan; maka dapat dikatakan setelah minggu kelima merupakan fase datar. Sedangkan pada kelompok infiltrasi hiperosmotik fase datar terlihat setelah minggu keenam, karena berdasarkan hasil uji BNT menunjukkan tidak terdapat perbedaan titer antibodi serum yang nyata ($p > 0,05$) pada minggu keenam, ketujuh, dan kedelapan. Fase datar setelah minggu keenam terdapat pada penelitian Lamers dan Pilarczyk (1982) setelah pemberian antigen O *Y. ruckeri* 100 μ g pada ikan carp melalui intraperitoneal dan intramuskular, tetapi fase datar tidak terlihat bila melalui perendaman atau inkubasi dengan larutan antigen O *Y. ruckeri* 15 mg/l. Menurut Subowo (1993) dan Herscowitz (1993), fase

datar terjadi bila jumlah antibodi yang bereaksi dengan antigen dan yang telah mengalami katabolisme seimbang dengan jumlah antibodi yang disintesis, tetapi bila lebih besar dengan jumlah antibodi yang disintesis, maka akan terjadi fase penurunan.

Pada Gambar 1 juga terlihat hingga minggu kedelapan, titer antibodi serum (\log_2) adalah sebesar 9,80 untuk kelompok perendaman, dan 10,25 untuk kelompok infiltrasi hiperosmotik. Berdasarkan pada pengamatan minggu kedua belas atau tiga bulan setelah vaksinasi (data penelitian tidak dicantumkan pada hasil), masih terlihat adanya antibodi terhadap *A. hydrophila* rata-rata titer antibodi (\log_2) sebesar 8,83 untuk kelompok ikan yang mendapat perlakuan perendaman dengan bakterin dan sebesar 9,83 untuk kelompok ikan mendapat perlakuan infiltrasi hiperosmotik terlebih dahulu. Pada penelitian Vinitnantharat dan Plumb (1992) menunjukkan adanya antibodi pada serum sampai minggu kesebelas pada channel catfish setelah vaksinasi perendaman dengan *Edwardsiella ictaluri*. Sedangkan pada penelitian yang dilakukan oleh Nitimulyo (1990) menunjukkan bahwa antibodi serum masih ada sampai minggu kesembilan belas setelah vaksinasi *Vibrio ordalii* dan *V. anguillarum* pada ikan english sole dan chum salmon.

Pada penelitian ini, terlihat titer antibodi serum pada minggu pertama masih rendah, walaupun demikian diduga ikan mas tersebut dapat protektif apabila diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophila*. Dugaan ini ditunjang oleh hasil penelitian Sakai *et al.* (1995) yang menggambarkan kontinuitas peningkatan aktivitas fagositik dari sel-sel fagositik (neutrofil dan makrofag) selama tujuh hari setelah pemberian bakterin *Clostridium butyricum* melalui oral.

Seperti telah diketahui bahwa makrofag pada ikan merupakan fagosit profesional yang terpenting, terutama dalam menghancurkan mikroorganisme. Makrofag yang sudah teraktivasi baik melalui proses endositosis maupun produk-produk limfosit, seperti *macrophage activating factor* (MAF) dan interferon (IFN) gama akan meningkatkan aktivitas mikrobisidal. Berdasarkan fenomena ini, maka sangat dimungkinkan apabila ikan mas terinfeksi oleh *A. hydrophila* seminggu setelah vaksinasi akan mampu bertahan. Hal ini juga ditunjang oleh hasil penelitian Ruangpan *et al.* (1986), yang menggambarkan ketahanan hidup ikan nila sebesar 61,6 % setelah satu minggu divaksin melalui injeksi intraperitoneal dengan bakteri *A. hydrophila* yang diinaktivasi dengan formalin.

Titer antibodi serum yang masih tinggi hingga minggu kedelapan menggambarkan bahwa tidak semua makarofag memfagositosis antigen bakterin, tetapi ada beberapa yang mempunyai kemampuan mengolah antigen tersebut sedemikian rupa sehingga dapat merangsang sel B. Lamers dan Pilarczyk (1982) menyatakan bahwa kadar antibodi yang tinggi mungkin disebabkan oleh produksi antibodi yang terus menerus karena senantiasa diinduksi oleh antigen. Dikemukakan pula bahwa induksi dari produksi antibodi disebabkan oleh pengolahan antigen pada makrofag, dimana antigen tersebut tetap tinggal dan hal ini dipertahankan dengan pengolahan antigen pada makrofag bebas atau di dalam *macrophage cluster*. Menurut Tizard (1982), makrofag pengolah antigen ditandai dengan pemilikan antigen membran sel dan mengizinkan sisa antigen tetap tinggal pada membran sel yang mencapai 10^4 kali lebih efektif dari antigen yang tidak terikat dalam memperkembangkan

suatu tanggap kebal. Herscowitz (1993) juga menyatakan bahwa antigen yang terikat makrofag lebih imunogenik terhadap sel T daripada antigen bebas dalam jumlah yang sama.

Disamping keterlibatan makrofag, titer antibodi serum yang masih tinggi hingga minggu kedelapan bahkan hingga minggu ke-12 diduga juga dipengaruhi oleh kompleks lipopolisakarida (LPS) yang terdapat pada dinding sel bakteri *A. hydrophila* yang merupakan golongan bakteri gram negatif. Menurut Tizard (1982), lipopolisakarida dapat merangsang produksi antibodi, dengan pemunculan lebih awal dan lebih tinggi dan lebih lama tingkat antibodi pada tanggap pertama serta juga merangsang pelepasan antibodi dari sel plasma. Disamping itu, lipopolisakarida mempunyai efek mitogen terhadap sel B (Stoskopf, 1993), dalam arti mempunyai kemampuan merangsang sel B untuk proliferasi dan diferensiasi. Menurut Kresno (1996), LPS juga dapat meningkatkan pembentukan IL-1 yang berfungsi mengaktifkan sel T dan merangsang sel T untuk memproduksi limfokin.

Hasil pengamatan terhadap uji tantang pada minggu keempat, keenam dan kedelapan, menunjukkan rata-rata ketahanan hidup atau daya proteksi 100%, sedangkan pada minggu kedua (96,67%) terhadap infeksi *A. hydrophila* dosis 1000 LD50 (10^{14} sel/ml). Gambaran protektif 100% pada minggu kedua, ketiga dan kelima setelah vaksinasi secara intraperitoneal juga terdapat pada ikan nila yang diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophila* dengan dosis 10^9 cfu/ml (Ruangpan *et al.*, 1986). Daya proteksi terhadap infeksi *A. hydrophila* setelah vaksinasi juga telah dibuktikan oleh Nugroho dkk. (1990) dengan menginfeksi secara intraperitoneal sebanyak $5,1 \times 10^8$ sel/ml, sedangkan

Supriyadi dan Shariff (1995) menggunakan dosis 10^7 cfu/ml untuk ujiantang. Perbedaan dosis ujiantang yang digunakan oleh beberapa peneliti diduga terkait dengan virulensi bakteri *A. hydrophila* yang digunakan berbeda. Dugaan ini ditunjang oleh pendapat Santos dalam Karunasagar *et al.* (1995) bahwa bakteri *A. hydrophila* dengan LD50 $10^6 - 10^7$ menunjukkan virulensinya lemah, sedangkan LD50 $> 10^8$ menunjukkan bakteri tersebut tidak virulen. Sedangkan dalam penelitian ini, hasil LD50 adalah sebesar 10^{10} sel/ml (Lampiran 3) yang menggambarkan bahwa bakteri *A. hydrophila* isolat 26 yang digunakan tidak virulen. Menurut Leblanc *et al* (1981) dalam Tajima *et al.* (1992) bahwa ada hubungan antara virulensi bakteri *A. hydrophila* pada ikan dengan partikular antigen O yang termostabil. Demikian pula Chanphong dan Sirirat (1997) menyatakan bahwa derajat virulensi dari *A. hydrophila* dikaitkan dengan variasi dalam kualitas dan kuantitas toksin ekstraselular yang diproduksi oleh bakteri dan juga mempunyai korelasi dengan keberadaan protein S-layer.

Pada penelitian ini, baik pembuatan bakterin *A. hydrophila* maupun untuk ujiantang digunakan bakteri *A. hydrophila* isolat 26 yang terbukti tidak virulen melalui hasil LD50. Hal ini menunjukkan bahwa strain *A. hydrophila* yang digunakan sebagai vaksin inaktif maupun untuk ujiantang adalah sama. Mengingat bahwa dalam penelitian ini, strain yang digunakan adalah strain yang tidak virulen, maka perlu dikaji lebih lanjut apakah vaksin yang berasal dari strain yang tidak virulen tersebut mampu memberikan daya proteksi terhadap infeksi *A. hydrophila* strain yang virulen. Disamping itu juga perlu dikaji tentang kemungkinan penggunaan vaksin *A. hydrophila* dari

berbagai strain (multistrain) untuk memberikan daya proteksi terhadap infeksi *A. hydrophila* strain alam yang virulen. Menurut Angka (1997), terdapat 18 strain *Aeromonas hydrophila* yang digolongkan virulen yang berhasil diisolasi dari ikan sakit, dimana virulensinya ditentukan dari dosis bakteri yang dapat mengakibatkan kematian, sebanyak 50 % dari jumlah ikan yang diinfeksi dengan bakteri tersebut.

Hasil uji BNT menggambarkan tidak ada perbedaan yang nyata ($p > 0,05$) antara perlakuan perendaman dan infiltrasi hiperosmotik terhadap daya proteksi ikan mas. Walaupun tujuan perlakuan infiltrasi hiperosmotik untuk memudahkan antigen bakterin masuk ke dalam tubuh ikan mas, namun diduga sel-sel fagosit yang sudah teraktivasi akibat pemberian bakterin baik melalui metode perendaman maupun infiltrasi hiperosmotik dapat menghancurkan bakteri *A. hydrophila* secara non spesifik dengan proses fagositosis sebagai upaya tubuh ikan untuk mempertahankan diri terhadap masuknya antigen bakteri. Menurut Herscowitz (1993), fagositosis dapat dipermudah oleh adanya antigen yang dilapisi oleh antibodi melalui proses opsonisasi. Walaupun demikian, kemampuan aktivitas mikrobisidal dari sel-sel fagositik setelah pemberian bakterin *A. hydrophila* perlu dibuktikan secara *in vitro*, mengingat bahwa sel-sel makrofag sebagai salah satu sel fagositik dapat teraktivasi baik melalui antigen bakterin maupun limfokin yang diproduksi oleh limfosit yang terinduksi terus menerus oleh antigen yang terikat makrofag.

Adanya fenomena tersebut di atas, maka diduga antibodi spesifik yang terbentuk akibat pemberian bakterin *A. hydrophila* dapat berperan sebagai

opsonin. Menurut Subowo (1993) opsonisasi tersebut dipermudah dengan adanya reseptor untuk Fc Ig dan Fc C pada permukaan sel fagosit. Keberadaan reseptor Fc Ig tersebut pada ikan telah dibuktikan oleh Honda *et al.* (1986), dimana terdapat peningkatan aktivitas fagositik dari makrofag ikan rainbow trout terhadap *V. anguillarum* dengan adanya antiserum *V. anguillarum*. Demikian pula Sakai (1984) dalam Honda *et al.* (1986) juga membuktikan keberadaan reseptor Fc Ig dan Fc C melalui penelitian yang menggambarkan bahwa komplemen dan antibodi spesifik dapat meningkatkan aktivitas fagositik dari sel-sel eksudat peritoneal rainbow trout terhadap *A. salmonicida*. Menurut Manning (1994), komplemen dari teleost mempunyai fungsi opsonisasi dalam proses fagositosis. Pendapat yang berbeda dikemukakan oleh Honda *et al.* (1986) bahwa komplemen dengan konsentrasi 10% tidak mempunyai efek opsonin, namun kemungkinan kompleks antibodi-bakteri dapat mengaktifasi komplemen rainbow trout dan memudahkan perlekatan (*adheren*) bakterial dan pencernaan (*ingestion*). Menurut Kresno (1996); Kennedy dan Stoskopf (1993), kompleks antigen-antibodi atau agregat imunoglobulin, baik yang larut maupun yang melekat pada permukaan dapat mengaktifkan komplemen melalui jalur klasik. Sedangkan Roberts (1989) menyatakan bahwa, Ig M4 (tetramer) dapat mengaktifkan komplemen baik melalui jalur klasik maupun alternatif, bahkan Ig M4 mempunyai kemampuan mengaktifkan komplemen 100 kali lebih efektif daripada kelas Ig M1 (monomer). Dengan demikian fenomena yang menyatakan bahwa peranan respon imun humoral yang berkaitan erat dengan peningkatan fungsi fagositosis melalui proses kemotaksis yang mengakibatkan fagosit bergerak menuju

lokasi infeksi, opsonisasi dan aktivasi komplemen yang mengakibatkan bakteriolisis (Kresno, 1996) dapat terbukti melalui hasil penelitian, dimana hingga pada minggu kedelapan, kelompok ikan mas yang direndam dengan bakterin dan kelompok ikan mas yang mendapat perlakuan infiltrasi hiperosmotik terlebih dahulu terbukti protektif terhadap infeksi *A. hydrophila*. Walaupun secara *in vivo* terbukti bahwa ikan mas tersebut protektif terhadap infeksi bakteri *A. hydrophila* hingga minggu kedelapan melalui aktivasi komplemen yang mengakibatkan bakteriolisis, namun hal ini perlu dibuktikan secara *in vitro* bagaimana aktivasi komplemen tersebut akibat adanya kompleks antigen-antibodi maupun agregat imunoglobulin.

Diduga hingga minggu ke-12 atau tiga bulan setelah pemberian bakterin baik melalui perendaman maupun infiltrasi hiperosmotik masih protektif. Dugaan ini juga ditunjang oleh hasil penelitian Groberg (1981) dan Johnson *et al.* (1982) dalam Nitimulyo (1990) yang mendapatkan bahwa dengan vaksinasi bakterin *V. anguillarum* melalui perendaman dapat melindungi ikan salmon lebih dari tiga bulan terhadap infeksi vibriosis. Atas dasar hal ini dan ditunjang dengan titer antibodi serum yang masih tinggi hingga minggu ke-12, maka perlu dikaji lebih lanjut pemberian vaksin bakterin pada induk ikan mas dan sejauh mana peranan antibodi maternal yang terdapat pada anak-anak ikan mas yang berasal dari induk ikan mas yang mendapat vaksinasi *A. hydrophila* dalam memberikan daya proteksi terhadap infeksi *A. hydrophila*. Selain itu juga perlu dikaji berapa lama antibodi maternal tersebut masih terdeteksi dalam tubuh anak-anak ikan mas untuk mengetahui kapan vaksinasi *A. hydrophila* perlu diberikan. Hal ini mengingat bahwa bila vaksinasi

yang diberikan saat antibodi maternal tersebut masih terdapat dalam tubuh anak ikan mas, maka tentunya vaksin yang diberikan tersebut akan dinetralisir oleh antibodi maternal, sehingga pemberian vaksin *A. hydrophila* menjadi tidak efektif. Vaksinasi dapat diberikan sebelum ikan mas ditebar pada kolam pembesaran dan mengingat masa pemeliharaan ikan mas di kolam pembesaran sampai pada ukuran konsumsi berlangsung antara 3-4 bulan serta titer antibodi serum tersebut masih tinggi hingga tiga bulan setelah vaksinasi, maka pemberian "booster" perlu diberikan apabila masa pemeliharaan ikan mas di kolam pembesaran lebih dari empat bulan.

Dalam penelitian ini terdapat hasil yang berbeda ditinjau dari hasil uji BNT, dimana pemberian bakterin melalui perendaman dan infiltrasi hiperosmotik memberikan perbedaan pengaruh yang sangat nyata ($p < 0,01$) terhadap titer antibodi serum, tetapi tidak memberikan perbedaan pengaruh yang nyata ($p > 0,05$) terhadap daya proteksi ikan mas. Diduga, hal ini disebabkan pemberian bakterin melalui infiltrasi hiperosmotik, terlebih dahulu ikan mas mengalami shock osmotik dengan larutan NaCl 2% sebelum direndam dengan bakterin *A. hydrophila*, sehingga memungkinkan antigen bakterin yang masuk ke dalam tubuh ikan mas lebih banyak dibanding pemberian bakterin melalui perendaman dan hal ini kemungkinan dapat mempengaruhi kemampuan sel B untuk berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi plasmasit. Diduga jumlah antigen bakterin dalam jumlah banyak yang terikat pada makrofag dapat terus-menerus menginduksi sel T untuk memproduksi limfokin yang dapat meningkatkan kemampuan sel B untuk membentuk antibodi melalui plasmasit. Dugaan ini terbukti dari gambaran kinetis respon imun humoral spesifik yang

menunjukkan adanya fase logaritmik mulai minggu pertama hingga minggu keenam, saat terbentuknya puncak titer antibodi untuk perlakuan infiltrasi hiperosmotik. Walaupun demikian, jumlah antigen bakterin yang masuk baik melalui perendaman maupun infiltrasi hiperosmotik tersebut ternyata tidak memberikan perbedaan pengaruh terhadap daya proteksi ikan mas. Hal ini diduga, meningkatnya proteksi ikan mas terhadap infeksi bakteri *A. hydrophila* lebih dipengaruhi oleh antibodi serum yang sudah terbentuk akibat pemaparan dengan antigen bakterin, dimana antibodi serum tersebut mampu menetralkan bakteri *A. hydrophila*.

Dugaan bahwa antibodi serum berperan dalam meningkatkan daya proteksi ikan mas terbukti melalui uji koefisien korelasi Pearson yang menunjukkan adanya korelasi yang sangat erat ($R = 0,809$) antara titer antibodi serum dengan daya proteksi ikan mas terhadap infeksi *A. hydrophila* (data titer antibodi dan daya proteksi pada minggu kedua, keempat, keenam, dan kedelapan yang diolah). Berdasarkan gambaran model regresi yang menghubungkan antara titer antibodi serum dengan daya proteksi ikan mas (Gambar 5.4), terlihat semakin tinggi titer antibodi serum, maka semakin tinggi pula daya proteksi yang diperoleh ikan mas, namun gambaran ini agak berbeda dengan gambaran histogram daya proteksi ikan mas (Gambar 5.2) dan gambaran kinetis titer antibodi (Gambar 5.1). Pada perlakuan perendaman maupun infiltrasi hiperosmotik, tampak daya proteksi ikan mas pada minggu kedua mencapai 96,67 %, sedangkan pada minggu keempat, keenam, dan kedelapan mencapai 100 %. Pada gambaran kinetis titer antibodi, terlihat bahwa titer antibodi pada minggu kedua dan keempat belum mencapai

puncaknya, sedangkan pada minggu kedelapan sudah terjadi penurunan titer antibodi, tetapi walaupun demikian antibodi tersebut dapat memberikan daya proteksi ikan mas terhadap infeksi *A. hydrophila*. Diduga, hal ini disebabkan antibodi serum tersebut tidak hanya menetralkan bakteri *A. hydrophila*, tetapi juga dapat meningkatkan proses fagositosis oleh sel-sel sistem imun non-spesifik yang diperankan oleh sel-sel fagositik akibat opsonisasi bakteri tersebut oleh antibodi serum. Disamping itu adanya antibodi serum dapat membentuk kompleks antigen-antibodi ataupun agregat imunoglobulin yang dapat meningkatkan aktivasi komplemen sebagai sistem imun non-spesifik dalam melisis bakteri *A. hydrophila*. Hal ini menggambarkan bahwa meningkatnya daya proteksi ikan mas terhadap infeksi *A. hydrophila* selain diperankan oleh sistem imun spesifik humoral, yaitu antibodi serum yang terbentuk, juga diperankan oleh sistem imun non-spesifik selular, yaitu sel-sel fagositik (makrofag dan neutrofil) dan sistem imun non-spesifik humoral yang diperankan oleh komplemen.

Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa ikan mas yang masih protektif setelah diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophila* pada minggu kedua, keempat, keenam, dan kedelapan ternyata terdapat peningkatan titer antibodi serum seminggu setelah diinfeksi (Tabel 5.5). Hal ini menunjukkan adanya respon imun sekunder akibat pemaparan antigen bakteri *A. hydrophila* yang kedua kali melalui injeksi secara intraperitoneal. Akibat rangsangan antigen yang kedua, maka sel-sel B memori yang dapat mengenali antigen bakteri bersangkutan berproliferasi dan menimbulkan respon imun sekunder spesifik yang berlangsung lebih cepat dan lebih intensif dibanding respon

imun primer. Gambaran ini juga terlihat pada hasil penelitian Pasaribu dkk. (1990) yang mendapatkan peningkatan titer antibodi *A. hydrophila* yang mencapai puncaknya pada akhir minggu kedua setelah dilakukan "booster". Demikian pula terdapat peningkatan titer antibodi *E. ictaluri* pada respon anamnestic (sekunder) pada minggu ketujuh setelah dilakukan "booster" pada minggu keenam dan terlihat perbedaan titer antibodi yang terbentuk pada minggu ketujuh antara respon imun primer dan respon imun sekunder (Vinitnantharat dan Plumb, 1992).

Menurut Roberts (1989), antibodi yang muncul pada respon imun primer adalah kelas Ig M dengan bentuk unit dasar tetramer (Ig M₄) dan pembentukan antibodi tersebut akan diikuti kelas Ig M dengan berat molekul lebih rendah dan mempunyai afinitas lebih tinggi dibanding kelas Ig M pada awal pembentukan antibodi (seperti pada mamalia : Ig M -----> Ig G). Fenomena ini dibuktikan oleh Anderson *et al.* (1982) pada ikan rainbow trout yang memproduksi hanya satu kelas antibodi, yaitu molekul Ig M ketika mendapat rangsangan antigen pertama dan pada rangsangan selanjutnya terjadi *switch* pembentukan molekul antibodi yang lebih ringan, yaitu molekul Ig M dimer pada kelas yang sama.

Pada Gambar 5.3, terlihat peningkatan titer antibodi serum yang tidak mencolok pada minggu keenam dibanding minggu kedua, keempat, dan kedelapan akibat pemaparan antigen bakteri *A. hydrophila* yang kedua kali melalui injeksi intraperitoneal. Hal ini diduga, antigen bakteri yang dipaparkan tersebut sebagian besar dinetralkan oleh antibodi serum yang terbentuk karena adanya respon imun primer, sehingga hanya sebagian kecil yang

masih dapat menginduksi sel-sel B memori untuk berdiferensiasi dan kemudian membentuk antibodi spesifik terhadap *A. hydrophila*.

Menurut Lamers dan Pilarczyk (1982), kinetik dari respon antibodi dan pembentukan memori selain tergantung pada tipe, dosis dan rute pemberian antigen, juga tergantung pada temperatur. Avtalion dalam Plumb (1995) berpendapat bahwa temperatur dimana hewan akuatik tersebut divaksin adalah sangat penting. Menurut Rijkers (1982), interaksi seluler dan fase efektor dari respon imun, yaitu sintesis dan pelepasan antibodi merupakan peristiwa yang sensitif terhadap temperatur. Dikemukakan pula bahwa sistem imun dari ikan golongan cyprinid dapat berfungsi secara optimal pada temperatur 24-28°C. Pada penelitian ini, kisaran temperatur air media lingkungan hidup ikan mas berkisar antara 27-28°C dan bila mengacu pada pendapat Rijkers (1982), maka kisaran temperatur tersebut tidak memberikan pengaruh pada fungsi dari sistem imun ikan mas.

Menurut Plumb (1995), sistem imun dari ikan akan berkurang fungsinya dengan kualitas lingkungan yang tidak mendukung, antara lain : rendahnya kadar oksigen, kadar amonia yang tinggi yang dapat menyebabkan meningkatnya konsentrasi kortikosteroid pada ikan yang dapat menekan respon imun. Dalam penelitian ini, selama pengamatan dilakukan pergantian air media setiap tiga hari sekali untuk membuang sisa-sisa metabolisme dan untuk mencegah meningkatnya kadar amonia yang terbentuk sebagai hasil proses dekomposisi protein yang berasal dari sisa pakan dan pengeluaran hasil metabolisme ikan melalui ginjal dan jaringan insang. Menurut Afrianto dan Liviawaty (1992), peningkatan konsentrasi amonia menjadi lebih berbahaya

apabila terjadi pada pH tinggi. Dalam penelitian ini, kadar amonium dalam air adalah 0 mg/l NH_4^+ dan pH yang terukur dalam kisaran 6,9 - 7,2. Menurut Afrianto dan Liviawaty (1992) kisaran pH tersebut masih berada dalam kisaran pH yang sesuai untuk ikan air tawar, yaitu: 6,5-7,5, sedangkan menurut Stoskopf (1993), fluktuasi pH berada dalam kisaran 7-8,5. Walaupun kadar oksigen tidak diukur dalam penelitian ini, namun untuk mencukupi kebutuhan oksigen dalam air ditunjang dengan aerator agar oksigen bebas dapat terikat. Menurut Afrianto dan Liviawaty (1992), konsentrasi oksigen terlarut di dalam air dapat ditingkatkan dengan menggunakan aerator. Jika konsentrasi oksigen berada pada tingkat maksimal, pengaruh gas karbon dioksida dapat diabaikan. Dalam penelitian ini, kadar karbon dioksida sebelum dan sesudah pergantian air yang terukur adalah 0,2 mg/l. Mengacu pada pendapat Stoskopf (1993), bahwa karbon dioksida yang dapat ditolerir oleh ikan adalah kurang dari 5 ppm, maka kadar karbon dioksida dalam air masih dalam taraf yang memenuhi kriteria.

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

- 1) Pemberian bakterin *A. hydrophila* pada ikan mas baik melalui metode perendaman maupun metode infiltrasi hiperomotik dapat menimbulkan antibodi dan daya proteksi ikan mas terhadap infeksi *A. hydrophila*.
- 2) Terdapat perbedaan sangat nyata antara pemberian bakterin melalui perendaman dan infiltrasi hiperosmotik terhadap titer antibodi, tetapi tidak terdapat perbedaan nyata terhadap daya proteksi ikan mas yang digambarkan melalui persentase relatif proteksi terhadap infeksi *A. hydrophila*.
- 3) Titer antibodi yang terbentuk setelah pemberian bakterin melalui perendaman mencapai puncaknya pada minggu kelima, sedangkan melalui infiltrasi hiperosmotik, mencapai puncaknya pada minggu keenam. Tidak terdapat perbedaan titer antibodi yang nyata ($p > 0,05$) antara minggu saat tercapainya puncak titer antibodi serum dengan minggu berikutnya. Terdapat perbedaan daya proteksi ikan mas yang sangat nyata ($p < 0,01$) terhadap infeksi *A. hydrophila* antara minggu kedua dengan minggu keenam, dan kedelapan. Sedangkan perbedaan daya proteksi yang nyata ($p < 0,05$) terdapat pada minggu kedua dengan minggu keempat setelah pemberian infeksi *Aeromonas hydrophila*.

- 4) Terdapat korelasi yang sangat erat ($R = 0.809$) antara titer antibodi serum dengan daya proteksi ikan mas terhadap infeksi *A. hydrophila*.

7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian dan keterbatasan yang ada dalam penelitian ini, maka disarankan :

- 1) Penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kemungkinan penggunaan vaksin *A. hydrophila* dari berbagai strain (multistrain) untuk memberikan daya proteksi terhadap infeksi *A. hydrophila* strain alam yang virulen.
- 2) Penelitian lebih lanjut untuk mengetahui *potential killing activity* dari sel-sel fagositik dan aktivitas komplemen secara *in vitro* setelah pemberian bakterin *A. hydrophila* melalui perendaman dan infiltrasi hiperosmotik.
- 3) Penelitian lebih lanjut kemungkinan pemberian vaksin *A. hydrophila* pada induk ikan mas dan sejauh mana titer antibodi maternal yang terdapat pada anak ikan mas yang berasal dari induk ikan mas yang divaksin masih dapat memberikan daya proteksi terhadap infeksi *A. hydrophila* serta berapa lama antibodi maternal tersebut masih terdeteksi dalam tubuh anak ikan mas.
- 4) Untuk mencegah penyakit *Haemorrhage Septicemia* pada ikan mas dapat dilakukan vaksinasi dengan bakterin *A. hydrophila* melalui metode perendaman, karena terbukti dapat meningkatkan daya proteksi ikan mas terhadap infeksi oleh *A. hydrophila*.

- 5) Pemberian "*booster*" vaksinasi perlu dilakukan bila masa pemeliharaan ikan mas di kolam pembesaran lebih dari empat bulan, walaupun titer antibodi terhadap *A. hydrophila* masih tinggi hingga tiga bulan setelah vaksinasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto E, Liviawaty E. 1992. Pengendalian hama dan penyakit ikan. Yogyakarta : Penerbit Kanisius. hal : 56-59.
- Alexander JB, Bowers A, Ingram GA, Shamsboom SM. 1982. The portal of entry of bacteria into fish during hyperosmotic infiltration and the fate of antigens. Dev. and Comp. Immunol. Suppl. 2 : 41-45.
- Ali A, Karunasagar I, Karunasagar I. 1997. Effect of oxytetracycline on the immune response of *Labeo rohita* to *A. hydrophila* vaccine. In (Flegel TW, Mac Rae IH. eds.) Diseases in Asian Aquaculture III. Bangkok. pp : 187-190.
- Anderson DP. 1974. Fish Immunology. Hong Kong : TFH Publications, Inc. Ltd. pp : 11-18, 137-140, 203-211.
- Anderson DP, Roberson BS, Dixon OW. 1982. Immunosuppression induced by a corticosteroid or an alkylating agent in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) administered a *Yersinia ruckeri* bacterin. Dev. and Comp. Immunology. Suppl. 2. pp : 197-204.
- Anderson DP, Merchant B, Dixon OW, Lizzio EF. 1982. Investigations of immunological memory in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to DNP conjugates. Dev. and Comp. Immunol. Suppl. 2. pp : 115-122.
- Angka SL. 1997. Antibiotic sensitivity and pathogenicity of *Aeromonas* and *Vibrio* Isolates in Indonesia. In (Flegel TW, Mac Rae IH. eds.) Diseases in Asian Aquaculture III. Bangkok. pp : 339-347.
- Anonim. 1990. Kerugian ekonomis akibat penyakit ikan dan upaya penanggulangannya. Bogor : Balitkanwar Puslitbang Perikanan. hal : 191-196.
- Areechon N, Karoon B. 1995. Comparative studies on resistance and immunological response of a hybrid catfish and the parent species to *Aeromonas hydrophila*. In (Shariff M, Arthur JR, Subasinghe RP. eds.). Manila : Fish Health Section, Asian Fisheries Society. 451-457.
- Austin B, Austin DA. 1987. Bacterial Fish Pathogens : Disease in farmed and wild fish. England. Chichester : Ellis Horwood Limited. pp : 171 - 177.

- Baba T, Imamura J, Izawa K, Ikeda K. 1988. Cell-mediated protection in carp, *Cyprinus carpio* L., against *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fish Diseases*. 11 : 171-178.
- Baratawidjaja KG. 1996. *Imunologi Dasar*. Jakarta : Fak. Kedokteran UI. hal: 13-26.
- Bellanti JA. 1993. Mekanisme imunitas terhadap penyakit bakteri. *In* (Bellanti JA. ed). *Imunologi*. 3rd edition, Yogyakarta : Gajah Mada Univ. Press. hal : 293-299.
- Bellanti JA, Kadlec JV. 1993. *Imunobiologi Umum*. *In* (Bellanti JA. ed). *Imunologi*. 3rd edition, Yogyakarta: Gajah Mada Univ. Press. hal : 551-555.
- Bellanti JA, Robbins JB. 1993. *Imunoprofilaksis : Penggunaan Vaksin*. *In* (Bellanti JA. ed). *Imunologi*. 3rd edition. Yogyakarta : Gajah Mada Univ. Press. hal : 18-32.
- Chanphong J, Sirirat T. 1997. The relationship between virulence and whole cell protein composition in various strains of *Aeromonas hydrophila*. *In* (Flegel TW, Mac Rae IH. eds.) *Diseases in Asian Aquaculture III*. Bangkok. pp: 91-94.
- Ellis AE. 1982. Differences between the immune mechanism of fish and higher vertebrates. *In* (Roberts RJ. ed.). *Microbial Diseases of fish*. London: Academic Press. pp : 1-23.
- Gudkovs N. 1988. *Fish Immunology*. *In* (Proceedings 106) Sydney : Post Graduate Committee in Veterinary Science Univ. pp: 531-543.
- Hanafia, KA. 1991. *Rancangan Percobaan. Teori dan Aplikasi*. Jakarta: Rajawali Press. hal : 171-191.
- Herscowitz HB. 1993. *Imunofisiologi: Fungsi sel dan interaksi seluler dalam pembentukan antibodi*. *In* (Bellanti JA. ed). *Imunologi*. 3rd edition. Yogyakarta: Gajah Mada Univ. Press. hal : 126-170.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. USA : Williams & Wilkins. pp: 254-255.
- Honda A, Kodama H, Moustafa M, Yamada F, Mikami, T, Izawa H. 1986. Phagocytic activity of macrophages of rainbow trout against *Vibrio anguillarum* and the opsonising effect of antibody and complement. *Research in Veterinary Science*. 40 : 328 - 332.

Iida T, Wakabayashi H. 1992. Preliminary trial of vaccination against edwardsiellosis of hirame (Japanese flounder), *Paralichthys olivaccus*. In (Shariff M, Subasinghe RP, Arthur JR eds.) Diseases in Asian Aquaculture I. Manila : Fish Health Section, Asian Fisheries Society. pp : 407-412.

Kabata Z. 1985. Parasites and diseases of fish cultured in the tropics. London : Taylor & Francis Ltd. pp : 99 - 101.

Karunasagar I, Sugumar G, Karunasagar I. 1995. Virulence characters of *Aeromonas* spp. isolated from EUS-affected fish. In (Shariff M, Arthur JR, Subasinghe RP. eds.) Diseases in Asian Aquaculture II. Manila : Fish Health Section, Asian Fisheries Society. pp : 307-314.

Kennedy Z, Stoskopf MK. 1993. Immunology. In (Stoskopf MK, Phelps TH, Bauer BA. eds). Fish Medicine. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo : WB Saunders Comp. pp : 149-158.

Kingscote B. 1989. Veterinary Microbiology : Introduction to Bacteria & Fungi. Canadian International Development Agency. pp : 82-88.

Kresno SB. 1996. Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium. Jakarta: Fak. Kedokt. UI. hal : 65-77.

Lamers CHJ, Pilarczyk A. 1982. Immune response and antigen localization in carp (*Cyprinus carpio*) after administration of *Yersinia ruckeri* O-antigen. Dev. and Comp. Immunol. Suppl. 2 : 107-113.

Lamers CHJ, de Haas MJH. 1983. The development of immunological memory in carp (*Cyprinus carpio* L.) to a bacterial antigen. Dev. Comp. Immunol. 7: 713-714.

Lamers CHJ, de Haas MJH, van Muiswinkel WB. 1985. The reaction of the immune system of fish to vaccination, development of immunological memory in carp, *Cyprinus carpio* L., following direct immersion in *A. hydrophila* bacterin. J Fish Diseases 8 : 253-263.

Langdon JS. 1988. Environment and management factors in diseases of fish. In (Proceedings 106) Fish Diseases. Sydney : Post Graduate Committee in Veterinary Science Univ. pp : 329-337.

Maas M.G., Bootsma R. 1982. Uptake of bacterial antigen in the spleen of carp (*Cyprinus carpio*). Dev. and Comp. Immun. Suppl. 2. pp : 47-52.

- Mangunwiryo H. 1991. Penyakit ikan/udang dan permasalahannya. Yogyakarta: Kongres XI dan Konferensi Ilmiah Nasional V PDHI. hal: 1-10.
- Manning MJ. 1994. Fishes. In (Turner RJ. ed). Immunology: A Comparative Approach. Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore : John Wiley and Sons. pp: 69-92.
- Nabib R, Pasaribu FH. 1989. Patologi dan penyakit ikan. Bogor : PAU-IPB. hal: 99-114.
- Nitimulyo KH. 1990. Vaksinasi untuk mencegah vibriosis pada ikan. Bogor: Balitkanwar Puslitbang Perikanan. hal: 53-61.
- Nugroho E, Angka SL, Bastiawan D. 1990. Peningkatan daya tahan ikan terhadap infeksi *A. hydrophila* dengan cara vaksinasi. Bogor : Balitkanwar Puslitbang Perikanan. hal : 83-86.
- Parslow TG. 1994. The Phagocytes : Neutrophils and Macrophages. In (Stites DP, Terr AI, Parslow TG. eds.). Basic and clinical immunology Inc. pp: 17-20.
- Pasaribu FH, Dalimunthe N, Poeloengan M. 1990. Pengobatan dan pencegahan penyakit ikan bercak merah. Bogor : Balitkanwar Puslitbang Perikanan. hal : 143-151.
- Plumb JA. 1995. Chemotherapy vs. vaccination : a reality for Asian aquaculture. In (Shariff M, Arthur JR, Subasinghe RP. eds.) Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society. pp : 43-53.
- Raa J, Roerstad G, Engstad R, Robertsen B. 1992. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. In (Shariff M, Subasinghe RP, Arthur JR. eds). Diseases in Asian Aquaculture I. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society. pp: 39-50.
- Rijkers GT, van Oosterom R, van Muiswinkel WB. 1981. The Immune system of cyprinid fish. Oxytetracycline and the regulation of humoral immunity in carp (*Cyprinus carpio*). Vet. Immunol. Immunopathol. 2 : 281-290.
- Rijkers GT. 1982. Kinetics of cellular and humoral immune reactions in fish. Dev. and Comp. Immunol. Suppl. 2: 93-100.
- Roberts RJ. 1989. Fish Pathology. 2nd edition. London : Bailliere Tindall. pp: 135-152, 306-307.

Robertsen B, Rorstad G, Engstad R, Raa J. 1990. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *Journal of Fish Diseases* 13: 391-400.

Ruangpan L, Kitao T, Yoshida T. 1986. Protective efficacy of *Aeromonas hydrophila* vaccines in *Nile tilapia*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 12 : 345-350.

Sakai DK. 1984. Opsonization by fish antibody and complement in the immune phagocytosis by peritoneal exudate cells isolated from salmonid fish. *J. Fish. Dis.* 7 : 29-38.

Sakai M, Kamiya H, Ishii S, Atsuta S, Kobayashi M. 1992. The Immunostimulating effects of chitin in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. In (Shariff M, Subasinghe RP, Arthur JR. eds). *Diseases in Asian Aquaculture I*. Manila : Fish Health Section, Asian Fisheries Society. pp : 413-417.

Sakai M, Atsuta S, Kobayashi M. 1995. The activation of leucocytes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by oral administration of *Clostridium butyricum* bacterin. In (Shariff M, Arthur JR, Subasinghe RP. eds.). *Diseases in Asian Aquaculture II*. Manila : Fish Health Section, Asian Fisheries Society. pp : 427-431.

Santoso B. 1993. Petunjuk praktis budidaya ikan mas. Yogyakarta : Penerbit Kanisius. hal : 11-18.

Smith PD. 1982. Analysis of the hyperosmotic and bath methods for fish vaccination-comparison of uptake of particulate and non particulate antigens. *Dev. Comp. Immunol. Suppl.* 2 : 181-186.

Smith PD, Barun-Nesje R. 1982. Cell-mediated immunity in the salmon lymphocyte and macrophage stimulation, lymphocyte/macrophage interaction and the production of lymphokine-like factors by stimulated lymphocytes. *Dev. Comp. Immunol. Suppl.* 2 : 223-228.

Steel RGD, Torrie JH. 1991. Prinsip dan prosedur statistika (Suatu pendekatan biometrik). Jakarta : PT Gramedia Pustaka Utama. hal : 403-424.

Stoskopf MK. 1993. Bacterial diseases of goldfish, koi, and carp. In (Stoskopf MK, Phelps TH, Bauer BA. eds.) *Fish Medicine*. Philadelphia. London. Toronto. Montreal. Sydney. Tokyo : WB Saunders Comp. pp : 473-475.

- Stoskopf MK. 1993. Environmental requirements and diseases of carp, koi, and goldfish. In (Stoskopf MK, Phelps TH, Bauer BA. eds.) Fish Medicine. Philadelphia. London. Toronto. Montreal. Sydney. Tokyo : WB Saunders Comp. pp : 454- 458.
- Subowo. 1993. Imunobiologi. Bandung: Penerbit Angkasa. hal: 151-160, 207-216.
- Subowo. 1993. Imunologi Klinik. Bandung: Penerbit Angkasa. hal: 222-225.
- Supriyadi H, Rukyani A. 1990. Imunoprofilaksis dengan cara vaksinasi pada usaha budidaya ikan. Bogor: Balitkanwar Puslitbang Perikanan. hal: 191-196.
- Supriyadi H, Shariff M. 1995. Evaluation of the immune response and protection conferred in walking catfish, *Clarias batrachus*, administered inactivated *Aeromonas hydrophila* bacterin by immersion. In (Shariff M, Arthur JR, Subasinghe RP. eds.) Diseases in Asian Aquaculture II. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society. pp : 405-412.
- Tajima K, Ezura K, Kimura T, Torres JL. 1992. Serological relationships of motile *Aeromonas* spp. among Japanese, Malaysian and Philippine isolates. In (Shariff M, Subasinghe RP, Arthur JR. eds). Diseases in Asian Aquaculture I. Manila : Fish Health Section, Asian Fisheries Society. pp : 437-448.
- Tizard I. 1982. Pengantar Imunologi Veteriner (Terjemahan). Surabaya: Airlangga Univ. Press. hal : 62-64, 257-276.
- Torres JL, Shariff M, Tajima K. 1992. Serological relationships among motile *Aeromonas* spp. associated with healthy and epizootic ulcerative syndrome-positive fish. In (Shariff M, Subasinghe RP, Arthur JR. eds). Diseases in Asian Aquaculture I. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society. pp: 451-459.
- Vinitnantharat S, Plumb JA. 1992. Kinetics of the immune response of channel catfish to *Edwardsiella ictaluri*. Journal of Aquatic Animal Health 4: 207-214.
- Ward PD. 1982. The development of bacterial vaccines for fish. (Roberts RJ. ed). Microbial diseases of fish. London : Academic Press. pp : 47-58.
- Wasito. 1995. Penyakit ikan air tawar dan cara penanggulangannya. Primadona ed. April. Jakarta : Laksmi Studio. hal : 14-17.

Wishkovsky A, Avtalion RR. 1982. Induction of helper and suppressor functions in carp (*Cyprinus carpio*) and their possible implication in seasonal disease in fish. Dev. and Comp. Immun. Suppl. 2. pp : 83-91.

L A M P I R A N

Lampiran 1 Data Jumlah Koloni *A. hydrophila* (Y) dan Nilai Absorbance (X) yang Terbaca pada Spektrofotometer

Jumlah Koloni (Y) (ditransfer ke logaritma)	Nilai Absorbance (X)
14,1139	1,490
12,9542	0,920
10,9085	0,510
10,5563	0,275
9,9445	0,129
9,0792	0,078
8,0414	0,038
7,3010	0,019
6,8129	0,004
6,4471	0,001

Lampiran 2 Analisa Varians Kurva Baku yang Menghubungkan Antara Nilai *Absorbance* dan Jumlah Koloni

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	1	32,199464	32,199464
Residuals	8	27,863894	3,482987

F = 9,24479 Signif. F = 0,0161

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
ABS	4,123214	1,356087	0,732183	3,041	0,0161
(Constant)	8,529021	0,689985	-	12,361	0,0000

Lampiran 3 Perhitungan *Lethal Dose-50* dengan Rumus Reed dan Muench

Dil.	Ratio Mati	Mati	Hidup	Total Mati	Total Hidup	Ikan Mati	
						Ratio	%
10 ⁻¹	6/10	6	4	15	4	15/19	79
10 ⁻²	4/10	4	6	11	10	11/21	52
10 ⁻³	2/10	2	8	5	18	5/23	22
10 ⁻⁴	2/10	2	8	3	26	3/29	10
10 ⁻⁵	1/10	1	9	1	35	1/36	3

$$\text{Proportional Distance (PD)} = \frac{52 - 50}{52 - 22} = \frac{1}{15} = 0.07$$

$$\text{Negatif log dari pengenceran terendah (mati > 50 \%)} = - 2,0$$

$$\text{PD (0,07) x faktor pengenceran (log 10)} = - 0,07$$

$$\text{Log LD50 titer} = - 2,07$$

$$\therefore \text{LD50 titer} = 10^{-2,07}$$

Lampiran 4 Pengujian Statistik Data Titer Antibodi Serum Awal (Log2) dengan Kolmogorov-Smirnov Z

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
TITER	50	.24	.43	0	1

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		TITER
N		50
Normal Parameters ^{1,2}	Mean	.24
	Std. Deviation	.43
Most Extreme Differences	Absolute	.471
	Positive	.471
	Negative	-.289
Kolmogorov-Smirnov Z		3.330
Asymp. Sig. (2-tailed)		.000

1. Test distribution is Normal.
2. Calculated from data.

Lampiran 5 Pengujian Statistik dengan Analisis Varians terhadap Variabel Ter-
gantung Titer Antibodi Serum Ikan Mas dari Kelompok Kontrol,
Perendaman, dan Infiltrasi Hiperosmotik

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Titer

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Noncent. Parameter	Observed Power ¹
Corrected Model	107.802 ²	23	4.687	184.440	.000	4242.129	1.000
Intercept	545.374	1	545.374	21461.167	.000	21461.167	1.000
WAKTU	36.719	7	5.246	206.421	.000	1444.949	1.000
TREAT	60.885	2	30.442	1197.949	.000	2395.898	1.000
WAKTU * TREAT	10.197	14	.728	28.663	.000	401.282	1.000
Error	2.440	96	2.541E-02				
Total	655.615	120					
Corrected Total	110.241	119					

1. Computed using alpha = .05

2. R Squared = .978 (Adjusted R Squared = .973)

Lampiran 6 Pengujian Statistik dengan Uji Beda Nyata Terkecil Pengaruh Pemberian Bakteri *A. hydrophila* terhadap Titer Antibodi Serum Ikan Mas

Perlakuan

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Titer

LSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Perendaman	-1.43285*	.036	.000	-1.50361	-1.36209
	I-Hiperosmotik	-1.57862*	.036	.000	-1.64938	-1.50787
Perendaman	Kontrol	1.43285*	.036	.000	1.36209	1.50361
	I-Hiperosmotik	-.14577*	.036	.000	-.21653	-.750E-02
I-Hiperosmotik	Kontrol	1.57862*	.036	.000	1.50787	1.64938
	Perendaman	.14577*	.036	.000	7.502E-02	.21653

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 7 Pengujian Statistik dengan Uji Beda Nyata Terkecil Pengaruh Waktu Pengambilan Serum terhadap terhadap Titer Antibodi Serum Ikan Mas

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Titer

LSD

(I) Waktu	(J) Waktu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Minggu-1	Minggu-2	-.44993*	.058	.000	-.56548	-.33439
	Minggu-3	-.40573*	.058	.000	-.52128	-.29019
	Minggu-4	-.69320*	.058	.000	-.80874	-.57766
	Minggu-5	-1.45533*	.058	.000	-1.57088	-1.33979
	Minggu-6	-1.47053*	.058	.000	-1.58608	-1.35499
	Minggu-7	-1.44300*	.058	.000	-1.55854	-1.32746
	Minggu-8	-1.36960*	.058	.000	-1.48514	-1.25406
Minggu-2	Minggu-1	.44993*	.058	.000	.33439	.56548
	Minggu-3	4.420E-02	.058	.450	-7.13E-02	.15974
	Minggu-4	-.24327*	.058	.000	-.35881	-.12772
	Minggu-5	-1.00540*	.058	.000	-1.12094	-.88986
	Minggu-6	-1.02060*	.058	.000	-1.13614	-.90506
	Minggu-7	-.99307*	.058	.000	-1.10861	-.87752
	Minggu-8	-.91967*	.058	.000	-1.03521	-.80412
Minggu-3	Minggu-1	.40573*	.058	.000	.29019	.52128
	Minggu-2	-4.42E-02	.058	.450	-.15974	7.134E-02
	Minggu-4	-.28747*	.058	.000	-.40301	-.17192
	Minggu-5	-1.04960*	.058	.000	-1.16514	-.93406
	Minggu-6	-1.06480*	.058	.000	-1.18034	-.94926
	Minggu-7	-1.03727*	.058	.000	-1.15281	-.92172
	Minggu-8	-.96387*	.058	.000	-1.07941	-.84832
Minggu-4	Minggu-1	.69320*	.058	.000	.57766	.80874
	Minggu-2	.24327*	.058	.000	.12772	.35881
	Minggu-3	.28747*	.058	.000	.17192	.40301
	Minggu-5	-.76213*	.058	.000	-.87768	-.64659
	Minggu-6	-.77733*	.058	.000	-.89288	-.66179
	Minggu-7	-.74980*	.058	.000	-.86534	-.63426
	Minggu-8	-.67640*	.058	.000	-.79194	-.56086

Lanjutan Lampiran 7

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Titer

LSD

(I) Waktu	(J) Waktu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Minggu-5	Minggu-1	1.45533*	.058	.000	1.33979	1.57088
	Minggu-2	1.00540*	.058	.000	.88986	1.12094
	Minggu-3	1.04960*	.058	.000	.93406	1.16514
	Minggu-4	.76213*	.058	.000	.64659	.87768
	Minggu-6	-1.52E-02	.058	.795	-.13074	.10034
	Minggu-7	1.233E-02	.058	.833	-.10321	.12788
	Minggu-8	8.573E-02	.058	.144	-2.98E-02	.20128
Minggu-6	Minggu-1	1.47053*	.058	.000	1.35499	1.58608
	Minggu-2	1.02060*	.058	.000	.90506	1.13614
	Minggu-3	1.06480*	.058	.000	.94926	1.18034
	Minggu-4	.77733*	.058	.000	.66179	.89288
	Minggu-5	1.520E-02	.058	.795	-.10034	.13074
	Minggu-7	2.753E-02	.058	.637	-8.80E-02	.14308
	Minggu-8	.10093	.058	.086	-1.46E-02	.21648
Minggu-7	Minggu-1	1.44300*	.058	.000	1.32746	1.55854
	Minggu-2	.99307*	.058	.000	.87752	1.10861
	Minggu-3	1.03727*	.058	.000	.92172	1.15281
	Minggu-4	.74980*	.058	.000	.63426	.86534
	Minggu-5	-1.23E-02	.058	.833	-.12788	.10321
	Minggu-6	-2.75E-02	.058	.637	-.14308	8.801E-02
	Minggu-8	7.340E-02	.058	.210	-4.21E-02	.18894
Minggu-8	Minggu-1	1.36960*	.058	.000	1.25406	1.48514
	Minggu-2	.91967*	.058	.000	.80412	1.03521
	Minggu-3	.96387*	.058	.000	.84832	1.07941
	Minggu-4	.67640*	.058	.000	.56086	.79194
	Minggu-5	-8.57E-02	.058	.144	-.20128	2.981E-02
	Minggu-6	-.10093	.058	.086	-.21648	1.461E-02
	Minggu-7	-7.34E-02	.058	.210	-.18894	4.214E-02

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 8 Pengujian Statistik dengan Analisis Varians terhadap Variabel Tergantung Daya Proteksi Ikan Mas dari Kelompok Kontrol, Perendaman, dan Infiltrasi Hiperosmotik

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: **Proteksi**

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Noncent. Parameter	Observed Power ¹
Corrected Model	58056.023 ²	11	5277.820	155.114	.000	1706.253	1.000
Intercept	218153.3	1	218153.3	6411.476	.000	6411.476	1.000
WAKTU	575.923	3	191.974	5.642	.002	16.926	.785
TREAT	57074.153	2	28537.077	838.698	.000	1677.396	1.000
WAKTU * TREAT	405.948	6	67.658	1.988	.086	11.931	.409
Error	1633.221	48	34.025				
Total	277842.6	60					
Corrected Total	59689.245	59					

1. Computed using alpha = .01

2. R Squared = .973 (Adjusted R Squared = .966)

Lampiran 9 Pengujian Statistik dengan Uji Beda Nyata Terkecil Pengaruh Pemberian Bakteri *A. hydrophila* terhadap Daya Proteksi Ikan Mas

Perlakuan

Multiple Comparisons

Dependent Variable: **Proteksi**

LSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Perendaman	-65.4260*	1.845	.000	-70.3736	-60.4784
	I-Hiperosmotik	-65.4260*	1.845	.000	-70.3736	-60.4784
Perendaman	Kontrol	65.4260*	1.845	.000	60.4784	70.3736
	I-Hiperosmotik	.0000	1.845	1.000	-4.9476	4.9476
I-Hiperosmotik	Kontrol	65.4260*	1.845	.000	60.4784	70.3736
	Perendaman	.0000	1.845	1.000	-4.9476	4.9476

*. The mean difference is significant at the .01 level.



Lampiran 10 Pengujian Statistik dengan Uji Beda Nyata Terkecil Pengaruh Waktu Pemberian Infeksi Bakteri *A. hydrophila* terhadap Daya Proteksi Ikan Mas

Post Hoc Tests

Waktu

Multiple Comparisons

Dependent Variable: **Proteksi**

LSD

(I) Waktu	(J) Waktu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Minggu-2	Minggu-4	-4.5507	2.130	.038	-10.2637	1.1623
	Minggu-6	-7.5707*	2.130	.001	-13.2837	-1.8577
	Minggu-8	-7.5707*	2.130	.001	-13.2837	-1.8577
Minggu-4	Minggu-2	4.5507	2.130	.038	-1.1623	10.2637
	Minggu-6	-3.0200	2.130	.163	-8.7330	2.6930
	Minggu-8	-3.0200	2.130	.163	-8.7330	2.6930
Minggu-6	Minggu-2	7.5707*	2.130	.001	1.8577	13.2837
	Minggu-4	3.0200	2.130	.163	-2.6930	8.7330
	Minggu-8	.0000	2.130	1.000	-5.7130	5.7130
Minggu-8	Minggu-2	7.5707*	2.130	.001	1.8577	13.2837
	Minggu-4	3.0200	2.130	.163	-2.6930	8.7330
	Minggu-6	.0000	2.130	1.000	-5.7130	5.7130

*. The mean difference is significant at the .01 level.

Lampiran 11 Pengujian Statistik dengan Uji Korelasi Pearson

Correlations, Computed by SPSS rel 7.5 for Windows 95

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
Titer Ab	2.21675	.93911	60
Proteksi	60.2983	31.8070	60

Correlations

		Titer Ab	Proteksi
Pearson Correlation	Titer Ab	1.000	.809**
	Proteksi	.809**	1.000
Sig. (2-tailed)	Titer Ab	.	.000
	Proteksi	.000	.
N	Titer Ab	60	60
	Proteksi	60	60

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Regression

Variables Entered/Removed^b

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Proteksi ^a	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: Titer Ab

Model Summary^b

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.809 ^a	.654	.648	.55736

a. Predictors: (Constant), Proteksi

b. Dependent Variable: Titer Ab

Lanjutan Lampiran 11

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	34.015	1	34.015	109.496	.000 ^a
	Residual	18.018	58	.311		
	Total	52.033	59			

a. Predictors: (Constant), Proteksi

b. Dependent Variable: Titer Ab

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	.777	.155		5.007	.000
	Proteksi	2.387E-02	.002	.809	10.464	.000

a. Dependent Variable: Titer Ab

Residuals Statistics^a

	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
Predicted Value	.94513	2.75773	2.21675	.75930	60
Residual	-1.09973	.89953	1.12E-15	.55262	60
Std. Predicted Value	-1.675	.712	.000	1.000	60
Std. Residual	-1.973	1.614	.000	.991	60

a. Dependent Variable: Titer Ab

Lampiran 12 Dokumentasi Hasil Uji Mikro-Aglutinas

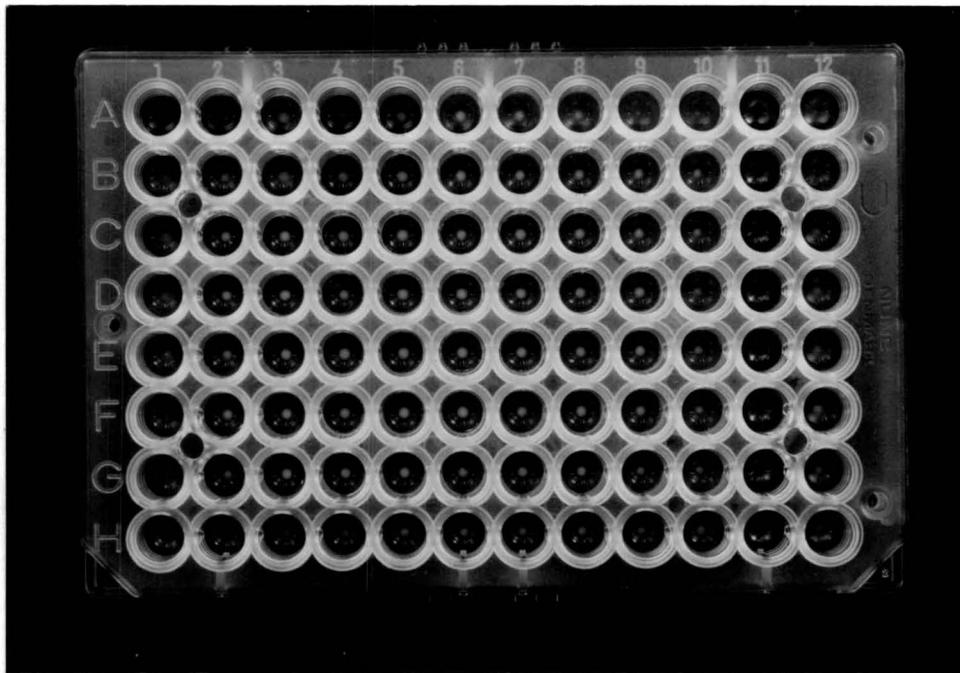


Foto hasil pengukuran titer antibodi serum ikan mas dengan uji mikro-aglutinasi