

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Ikan mas (*Cyprinus carpio*) merupakan salah satu komoditas perikanan air tawar yang saat ini menjadi primadona di sub sektor perikanan. Ikan ini di pasaran memiliki nilai ekonomis tinggi dan jumlah permintaan yang besar terutama untuk beberapa pasar lokal di Indonesia. Ikan mas atau yang juga dikenal dengan sebutan *common carp* adalah ikan yang sudah mendunia. Hal ini tentunya menjadikan peluang untuk pengembangan budidaya ikan mas (Suseno, 2000).

Berbagai sistem budidaya telah diterapkan dan terus berkembang untuk memperoleh produksi ikan mas yang maksimal. Salah satunya dengan menerapkan sistem budidaya intensif yang ditandai dengan padat tebar tinggi dan penggunaan pakan buatan, serta teknologi yang modern. Namun budidaya ikan mas secara intensif juga memiliki dampak negatif, salah satunya adalah ikan rentan terserang penyakit. Penyakit adalah salah satu faktor yang dapat menyebabkan gangguan pada ikan budidaya bahkan dapat menyebabkan kematian hingga 100% dan sangat merugikan terutama secara ekonomi (Kurniastuty dkk., 2004).

Salah satu penyakit yang berbahaya adalah yang disebabkan infeksi bakteri *Aeromonas* sp. seperti *Aeromonas salmonicida*. *A. salmonicida* merupakan penyebab penyakit infeksi pada ikan-ikan salmonid yaitu penyakit furunkulosis. Sejumlah laporan menunjukkan bahwa terdapat juga gejala infeksi bakteri *A. salmonicida* pada ikan – ikan cyprinid, yaitu penyakit *carp erythrodermatitis*. Pada penyakit ini ikan yang terserang akan mengalami pendarahan pada bagian tubuh seperti dada, perut dan pangkal sirip, serta dapat menular dan dapat menyebabkan kematian pada ikan budidaya (Rocco and Graham, 2001).

Saat ini penggunaan obat – obatan dan bahan kimia mulai dihindari karena menyebabkan dampak negatif, seperti timbulnya resistensi pada bakteri, adanya residu dalam tubuh ikan, menyebabkan pencemaran, bahkan bisa menjadi sebab penolakan ekspor oleh negara lain (Astuti dkk., 2003). Oleh karena itu diperlukan langkah-langkah pencegahan dan pengobatan yang lebih alami. Langkah pencegahan yang dapat diaplikasikan yaitu penerapan *biosecurity* secara ketat melalui *screening*, *aging*, serta pemberian probiotik dan vaksinasi (Widodo, 2010).

Usaha vaksinasi dalam budidaya ikan telah memberikan hasil yang memuaskan seperti peningkatan *survival rate* (SR) ikan. Sebagai contoh penggunaan HydroVac®, vaksin inaktif bakteri *Aeromonas hydrophila* isolat lokal untuk pencegahan penyakit *motile aeromonas septisemia* (MAS) atau “penyakit merah” memiliki tingkat keberhasilan SR pada uji tantang (RPS) lebih dari 70% (Taukhid, 2011). Vaksin yang memiliki nilai RPS lebih tinggi dari 50 % termasuk vaksin yang efektif untuk digunakan (Atmomarsono dkk., 2004).

Kriteria vaksin yang baik untuk digunakan adalah memiliki imunogenisitas yang tinggi pada inang. Semakin tinggi tingkat imunogenisitasnya maka vaksin tersebut semakin baik. Selain itu sistem imun pada ikan sangat penting sebagai tolak ukur pertahanan ikan terhadap semua benda asing termasuk penyakit yang masuk ke dalam tubuh ikan tersebut (Ellis, 1988).

Pada penelitian ini diuji tingkat imunogenisitas vaksin inaktif *whole cell A. salmonicida* pada ikan mas dengan berbagai metode (suntik, oral, perendaman dan kontrol) sebagai penelitian awal, selain itu juga untuk mengetahui metode vaksinasi terbaik untuk digunakan dalam pencegahan penyakit yang disebabkan oleh *A. salmonicida* pada ikan mas.

B. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui imunogenisitas vaksin inaktif *whole cell A. salmonicida* dan metode pemberian vaksin yang memberikan gambaran tingkat imunogenisitas tertinggi dan memungkinkan untuk diaplikasikan secara luas pada budidaya ikan mas.

C. Perumusan Masalah

Ikan mas merupakan salah satu jenis komoditas perikanan air tawar yang saat ini menjadi primadona. Ikan ini di pasaran memiliki nilai ekonomis tinggi dan disukai masyarakat karena dagingnya yang enak dan gurih (Suseno, 2000). Selain itu ikan mas juga memiliki pertumbuhan yang relatif cepat, fekunditas dan sintasan yang tinggi, dapat diproduksi secara massal serta memiliki peluang pengembangan skala industri (Cahyono, 2002). Hal – hal tersebut menyebabkan ikan mas mendapat perhatian dan diminati oleh para pengusaha untuk dibudidayakan secara luas (Martin, 2008).

Namun saat ini budidaya ikan mas baik dari hulu hingga ke hilir (pembenihan hingga fase budidaya) sering mengalami kegagalan, diantaranya disebabkan oleh penyakit. Penyakit digolongkan menjadi dua, yaitu penyakit infeksi dan non – infeksi. Salah satu penyakit yang berbahaya pada ikan mas adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri *A. salmonicida* (Irianto, 2006).

Bakteri *A. salmonicida* adalah bakteri yang dapat menyebabkan penyakit *carp erythrodermatitis*, penyakit ini sangat merugikan dalam budidaya ikan karena serangannya yang cepat dan dapat mematikan hewan budidaya, sehingga ikan yang terserang bakteri cukup parah harus segera dimusnahkan (Floyd, 2002). Untuk itu perlu dilakukan pencegahan dan penanganan terhadap penyakit ini. Berbagai upaya penanganan yang telah dilakukan diantaranya adalah penggunaan bahan kimia dan antibiotik.

Namun hal ini ternyata memberikan dampak negatif yang ditimbulkan seperti resistensi mikroorganisme terhadap bahan kimia dan antibiotik yang digunakan. Selain itu, masalah lainnya adalah bahaya yang ditimbulkan terhadap lingkungan sekitarnya, ikan yang bersangkutan, dan manusia yang mengkonsumsinya (Sugianti, 2005).

Berdasarkan hal tersebut diperlukan pendekatan pencegahan yang lebih alami untuk penanggulangan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *A. salmonicida*, salah satunya adalah dengan penggunaan vaksin. Menurut Zhou *et al.*, (2002), salah satu metode penanggulangan penyakit yang dinilai aman untuk manusia adalah dengan vaksinasi dan probiotik. Vaksin adalah adalah satu antigen yang biasanya berasal dari suatu jasad patogen yang telah dilemahkan atau dimatikan, ditujukan untuk meningkatkan ketahanan (kekebalan) ikan atau menimbulkan kekebalan aktif terhadap suatu penyakit tertentu.

Vaksinasi merupakan salah satu upaya penanggulangan penyakit pada hewan (termasuk ikan) dengan cara pemberian vaksin ke dalam tubuh hewan agar memiliki ketahanan terhadap serangan penyakit. Adapun syarat vaksin yang baik adalah memiliki imunogenisitas yang tinggi terhadap inangnya. Oleh karenanya perlu dilakukan uji untuk mengetahui tingkat imunogenisitas suatu vaksin agar dapat efektif dalam pencegahan dan penanggulangan penyakit yang disebabkan oleh bakteri seperti *A. salmonicida*. Pada penelitian ini akan dilakukan uji imunogenisitas vaksin inaktif *whole cell A. salmonicida* pada ikan mas dengan beberapa metode berbeda, yaitu melalui suntik, oral, dan perendaman serta kontrol sebagai pembanding.

D. Hipotesis

1. Aplikasi vaksin inaktif *whole cell A. salmonicida* meningkatkan imunogenisitas ikan mas.
2. Metode aplikasi vaksin (suntik, oral dan rendam) diantaranya ada yang memberikan gambaran terbaik.

E. Manfaat dan Kegunaan Penelitian

Manfaat penelitian yang kami lakukan ini adalah sebagai langkah awal dalam pengembangan vaksin *A. salmonicida*. Serta diharapkan dapat memberi tambahan informasi ilmiah kepada masyarakat akuakultur, serta pihak-pihak yang memerlukan tentang vaksinasi ikan, khususnya pada ikan mas terhadap infeksi *A. salmonicida*.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Ikan Mas

1. Biologi Ikan Mas

Klasifikasi ikan mas menurut Saanin, (1984) adalah sebagai berikut :

Filum : Chordata

Sub filum : Vertebrata

Kelas : Osteichthyes

Sub Kelas : Actinopterygii

Ordo : Cypriniformes

Famili : Cyprinidae

Genus : *Cyprinus*

Spesies : *Cyprinus carpio*

Ikan mas atau yang juga dikenal dengan nama *common carp*, secara garis besar memiliki ciri – ciri bentuk tubuh panjang dan pipih (*compress*) warna tubuh keemasan, dan berbagai warna lainnya, seperti warna putih, kuning, merah, hitam dan corak kombinasi. Mulut ikan mas dapat disembulkan dan terletak di ujung tengah (*terminal*). Memiliki dua buah sungut atau kumis, dan hampir seluruh tubuhnya ditutupi oleh sisik yang berukuran relatif besar dan digolongkan dalam sisik tipe sikloid (Cahyono, 2002).

2. Penyebaran dan Habitat

Ikan mas berasal dari daratan Asia dan telah lama dibudidayakan sebagai ikan konsumsi oleh bangsa Cina sejak 400 tahun sebelum masehi. Penyebarannya merata di daratan Asia juga Eropa, sebagian Amerika Utara dan Australia. Budidaya ikan mas di Indonesia banyak ditemui di Jawa dan Sumatera dalam bentuk empang, balong maupun keramba apung yang diletakan di danau atau waduk besar. Sedangkan contoh lain adalah budidaya secara modern di Jawa Barat menggunakan sistem kolam air deras untuk mempercepat pertumbuhannya. Di Indonesia ada beberapa jenis atau ras ikan mas yang dikenal berdasarkan bentuk, warna dan wilayah penyebarannya, diataranya adalah Mas Majalaya, Puntan, Nyonya, Kaca, Kancra Domas, Kumpay dan lain sebagainya (Cholik, 2005).

Habitat asli ikan mas di alam adalah sungai berarus tenang sampai sedang dan di danau yang dangkal. Perairan dengan kesuburan yang tinggi dan pakan alami melimpah adalah salah satu habitat yang disukai ikan mas. Ikan mas dapat tumbuh normal, pada lokasi pemeliharaan dengan ketinggian antara 150 – 1000 m di atas permukaan laut, dengan kisaran suhu 25°C – 30°C , dengan suhu optimum antara 26°C – 28°C , pH air antara 7 – 8. Ikan mas memerlukan tingkat kadar oksigen yang tinggi untuk kelangsungan hidupnya yaitu lebih dari 3 ppm, dengan kisaran optimun antara 4 hingga 5 ppm, namun ikan ini masih dapat hidup pada kadar oksigen 1 hingga 2 ppm (Cholik, 2005).

B. *Aeromonas salmonicida*

Menurut Buchanan dan Gibbons (1974) dalam Pusat Karantina Ikan (2007), klasifikasi ilmiah bakteri *A. salmonicida* adalah sebagai berikut :

Super Kingdom : Bacteria

Phylum : Proteobacteria

Class : Gammaproteobacteria

Order : Aeromonadales

Family : Aeromonadaceae

Genus : *Aeromonas*

Species : *Aeromonas salmonicida*

A. salmonicida merupakan bakteri gram negatif, yaitu bakteri yang tidak mempertahankan zat warna metil ungu pada metode pewarnaan Gram. *A. salmonicida* berbentuk batang pendek (1,3-2,0 x 0,8-1,3 μm), non motil atau tidak bergerak, tidak membentuk spora, fakultatif anaerob, pertumbuhan optimum pada suhu 22⁰ C (Anonim, 2004).

Bakteri *A. salmonicida* memiliki banyak subspecies yang masing – masing memberikan sifat dan pathogenitas yang berbeda. Secara taksonomi *A. salmonicida* dibagi menjadi 2 jenis yaitu *typical* dan *atypical*. Strain *typical* mempunyai inang dominan ikan-ikan salmonid dan menyebabkan penyakit furunculosis dengan gejala klinis yang khas sedang strain *atypical* mempunyai karakteristik memiliki banyak variasi dari sifat fisiologi, biokimia dan serologi serta ketahanan terhadap antibiotik (Kurniasih, 1999).

Bakteri *A. salmonicida* banyak dijumpai di perairan tawar dan laut serta mempunyai kisaran inang yang luas mulai dari ikan-ikan air tawar dan laut. Bakteri ini dapat bertahan hidup dalam air atau sedimen selama beberapa hari atau beberapa minggu tetapi tidak dapat berbiak, dan bersifat obligat (Kamiso dkk., 1990). *A. salmonicida* dapat bertahan dalam air pada periode waktu yang lama. Lamanya waktu tergantung pada kandungan mineral, pH dan temperatur air. Dengan meningkatnya suhu, virulensinya juga bertambah tinggi (Inglis *et al.*, 1993). Gejala klinis atau tanda-tanda utama serangan *A. salmonicida* pada ikan adalah pembentukan ulkus-ulkus yang menyerupai bisul, perdarahan sirip, sirip putus/patah, perdarahan pada insang, lendir berdarah pada rectum, dan pembentukan cairan berdarah. Usus bagian belakang lengket dan bersatu serta pembengkakan limpa, dan nekrosis pada ginjal (Kurniasih, 1999).

Penyakit *carp erythrodermatitis* pada ikan yang disebabkan oleh bakteri *A. salmonicida* memiliki ciri-ciri luka yang khas yaitu nekrosis pada otot, pembengkakan di bawah kulit, dengan luka terbuka berisi nanah, dan jaringan yang rusak di puncak luka tersebut seperti cekungan (Kamiso, 1993). Penyakit akibat bakteri ini sangat mudah menular pada ikan lain yang berada di sekitar ikan yang terkena penyakit. Penularan penyakit dapat dibagi menjadi 2 (dua), yaitu penularan secara vertikal dan horizontal. Penularan vertikal adalah penularan penyakit dari induk ke progeninya, sedang penularan horizontal adalah penularan penyakit ke ikan lain melalui kontak langsung, vektor, peralatan, atau lingkungan (Afrianto dan Liviawaty, 1992).

Selain itu, penularan ini juga dapat diakibatkan oleh ikan karier, yaitu ikan yang memang sudah membawa patogen. Jika ikan ini bergabung dengan ikan yang sehat, melakukan interaksi, dan bersenggolan, maka kemungkinan besar ikan yang sehat akan terkontaminasi pathogen sehingga akan ikut sakit. Hal ini akan lebih memungkinkan lagi jika ikan mengalami luka pada kulitnya (Kabata, 1985).

Luka pada ikan merupakan sumber terjadinya penularan penyakit, karena ikan yang terluka pasti memiliki daya tahan tubuh yang lebih rendah dari ikan sehat sehingga penyakit dapat dengan mudah menyerangnya. Ikan karier juga dapat menularkan penyakit ini melalui kotoran atau fesesnya. Kotoran yang dikeluarkan ikan karier mengandung bakteri pathogen yang akan mencemari air dan akhirnya mengkontaminasi ikan yang sehat (Kamiso, 1993).

Setelah melihat ciri-ciri tersebut, sebaiknya ikan yang memiliki ciri itu segera diangkat dan diberi penanganan atau dimusnahkan. Ini dilakukan agar ikan-ikan yang lain tidak terkontaminasi dan ikut sakit (Floyd, 2002).

C. Sistem Pertahanan Tubuh Ikan

Ikan merupakan vertebrata yang paling primitif, namun dapat mengembangkan sistem perlindungan tubuhnya dari pathogen, seperti bakteri, virus, fungus, protozoa dan parasit (Ellis, 1997). Sistem ini kemudian dikenal dengan istilah imunitas. Imunitas berasal dari kata imun yang artinya kebal atau resisten. Imunitas adalah kemampuan tubuh untuk melawan semua benda atau organisme asing yang masuk dan merusak ke dalam tubuh.

Berdasarkan sifat responnya dalam menghadapi agen patogen penyerang, sistem imun terbagi menjadi sistem pertahanan alamiah (*innate immunity*) yang bersifat non spesifik dan pertahanan adaptif (*adaptive immunity*) yang bersifat spesifik. Imunitas adaptif atau yang spesifik ini dibedakan lagi menjadi dua, yaitu imunitas humoral (*antibody-mediated*) dan imunitas seluler (*cell-mediated*) (Almendras, 2001).

Pada ikan imunitas seluler bereaksi secara kontak langsung dari sel ke sel untuk mempertahankan tubuh dari serangan patogen yang menyerang sel inang dan sel tumor. Imunitas humoral bereaksi melalui produksi protein atau imunoglobulin atau antibodi yang ikut beredar ke seluruh tubuh bersama cairan darah dan limfa. Antibodi akan bereaksi apabila bertemu dengan antigen, yaitu dengan menetralsirnya (Stefan *et al.*, 2002).

D. Vaksin dan Vaksinasi

Vaksin adalah satu antigen yang biasanya berasal dari suatu jasad patogen yang telah dilemahkan atau dimatikan, untuk meningkatkan ketahanan (kekebalan) ikan atau menimbulkan kekebalan aktif terhadap suatu penyakit tertentu. Vaksinasi merupakan salah satu upaya penanggulangan penyakit pada hewan (termasuk ikan) dengan cara pemberian vaksin ke dalam tubuh hewan agar memiliki ketahanan terhadap serangan penyakit. Salah satu tujuan vaksinasi adalah untuk meningkatkan antibodi spesifik. Meningkatnya antibodi tidak saja akan meningkatkan kemampuan pertahanan humoral tetapi juga pertahanan seluler (*cell-mediated immunity*) sehingga hasil kerja masing-masing maupun hasil kerja antara pertahanan humoral dan seluler meningkat (Widagdo, 2009).

Prinsip dasar vaksinasi pada ikan adalah memasukkan antigen yang diperoleh dari patogen yang telah dihilangkan sifat patogenisitasnya, dimatikan atau berupa ekstrak ke dalam tubuh ikan untuk merangsang sel-sel limfosit membentuk antibodi (Souter, 1984). Salah satu tujuan vaksinasi adalah untuk memunculkan pertahanan spesifik terhadap suatu patogen tertentu. Sehingga ketika patogen tersebut menyerang maka tubuh akan merespon untuk mempertahankan diri dari serangan patogen tersebut. Respon pertahanan tubuh terhadap patogen tersebut akan berlangsung cukup lama karena tubuh memiliki memori terhadap patogen tersebut (Tizard, 1988).

1. Jenis-Jenis Vaksin

Secara umum vaksin dibedakan menjadi dua, yaitu vaksin yang dimatikan seperti vaksin inaktif dan ekstraknya, serta vaksin hidup yang hanya di ambil bagian penyebab penyakit atau virulennya (Ellis, 1988). Masing-masing vaksin tersebut mempunyai kelebihan dan kelemahan. Saat ini di bidang perikanan telah banyak jenis vaksin yang berkembang, diantaranya adalah vaksin polivalen *Vibrio* sp. (Setyawan, 2006), vaksin *A. hydrophila* HydroVac® (Tauhid, 2011), vaksin furunculosis *A. salmonicida* (Hastings dalam Ellis, 1988). Berdasarkan contoh tersebut umumnya vaksin yang digunakan adalah vaksin yang dimatikan, hal tersebut dikarenakan vaksin inaktif lebih mudah dibuat dan lebih aman untuk diaplikasikan (Ellis, 1988).

Menurut Anonim (2004), ada beberapa jenis antigen atau vaksin yang dapat digunakan untuk vaksinasi diantaranya :

- a. Antigen O : bakteri yang dilemahkan melalui pemanasan. Membran hanya mengandung polisakarida (karbohidrat) dan bagian lipid hilang saat pemanasan.

- b. Antigen H : bakteri yang inaktifasi dengan formalin sehingga sel mengalami pengkerutan dan kehilangan cairan sel.
- c. Supernatan, debris sel, dan lain-lain.

2. Metode Pemberian Vaksin

Cara aplikasi vaksin, adalah salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan vaksinasi. Adapun beberapa metode vaksinasi diantaranya adalah dengan injeksi/suntik pada bagian intraperitoneal dan intramuscular, perendaman dalam larutan atau suspensi vaksin, serta penyemprotan larutan vaksin bertekanan tinggi ke tubuh ikan serta melalui makanan atau oral (Kamiso, 1990).

Pada penelitian ini akan dilakukan vaksinasi dengan tiga cara, yaitu penyuntikan pada ikan dibagian *intraperitoneal*-nya (IP), oral dengan cara memasukkan vaksin dalam mulut ikan, dan perendaman vaksin, yaitu dengan menambahkan vaksin dalam wadah seperti baskom atau ember dengan pemberian aerasi kuat agar vaksin dapat terserap oleh ikan.

3. Uji Titer Antibodi

Uji mikro aglutinasi atau uji titer antibodi adalah salah satu uji serologi yang dapat dilakukan untuk mengetahui keberhasilan vaksinasi, berdasarkan reaksi aglutinasi antigen (Ag) dan antibodi (Ab) pada serum darah. Pengujian tersebut berdasar pada proses presipitasi atau aglutinasi atau aktivasi komplemen yang diakibatkan oleh perubahan status fisik kompleks Ag-Ab (Roberson, 1990).

III. METODOLOGI

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober sampai dengan November 2011 di Laboratorium Bioteknologi Lt. 3 Fakultas Pertanian Universitas Lampung dan Stasiun Karantina Ikan Kelas I Panjang Lampung.

B. Alat dan Bahan

1. Penelitian Pendahuluan

- a. Alat : Aquarium ukuran 60 x 40 x 40 cm³ 12 buah (3 perlakuan, 1 kontrol masing – masing 3 ulangan), aerator, selang aerasi, batu aerator.
- b. Bahan : Ikan mas ukuran \pm 30 gr (berasal dari petani ikan, Pringsewu, Lampung), Isolat bakteri *A. salmonicida* (isolat bakteri koleksi Stasiun Karantina Ikan Kelas I Panjang, Lampung), dan pakan ikan komersil dengan kadar protein 30 – 32%.

2. Pembuatan Vaksin

- a. Alat : Petridish (Normax®), tabung reaksi (Iwaki glassTM), jarum ose, spektrofotometer (Genesys-20, Thermospectronic), Erlenmeyer (Pyrex®), heat – stir (Stuart CB162TM), corong, lampu bunsen, sentrifuge^(80–2), inkubator, autoclave, sprayer, vortex (V-1 plus BDECO-GermanyTM).

- b. Bahan : Media TSA (CM0131, OXOIDTM), TSB (CM0129, OXOIDTM), GSP (VM 183430.032, KGaATM), Formalin 1%, alkohol 70%, isolat bakteri *A. salmonicida*, aquades, PBS (*phospat buffer saline*).

3. Uji Vaksinasi

- a. Alat : spuit ukuran 1 ml (TerumoTM), botol falcon (IwakiTM), selang aerasi, batu aerasi, aerator, alat penangkap ikan, baskom.
- b. Bahan : Ikan mas ukuran ± 30 gr, vaksin inaktif *A. salmonicida*, minyak cengkeh 0.01 % (Cap House Brand).

4. Titer Antibodi

- a. Alat : Spuit 1 ml, refrigator, microdilution plate (REF. 650101, Greiner bio – oneTM ; PS – microplate – 96 well), mikropipet (Nesco®), eppendorf, dan sentrifuge.
- b. Bahan : Ikan mas yang akan diambil sampel darahnya per ulangan (oral, suntik, dan rendam, serta kontrol) selama tiga waktu (sebelum vaksin, 7 hari setelah vaksin, dan 7 hari setelah booster), EDTA (LT-BakerTM).

5. Analisis kualitas air

- a. Alat : Termometer, pH meter, dan DO meter.
- b. Bahan : sampel air akuarium pemeliharaan ikan mas.

C. Prosedur Penelitian

1. Penelitian Pendahuluan

a) Persiapan Ikan Uji

- a. Ikan uji disiapkan, yaitu ikan mas ukuran ± 30 gr.
- b. Ikan diadaptasikan terlebih dahulu selama satu minggu.

- c. Ikan dipelihara dalam akuarium dan diberi aerasi, serta diberi pakan pellet 2 – 3 kali sehari.
- d. Dilakukan manajemen kualitas air dan kesehatan ikan selama pemeliharaan, diantaranya siphon, ganti air dan lain - lain.

b) Pembuatan Vaksin *A. salmonicida*

- a. Kultur bakteri *A. salmonicida* di media TSB selama 24 jam.
- b. Pengkayaan dengan media TSA selama 24 jam.
- c. Inaktivasi, penambahan formalin 1% kemudian diinkubasi selama 24 jam.
- d. Uji viabilitas dalam media GSP/TSA (jika tumbuh, dilakukan inaktifasi ulang dengan penambahan konsentrasi formalin), jika tidak tumbuh dilanjutkan dengan pemekatan sampel dengan cara disentrifuse dengan kecepatan 3500 rpm, selama 30 menit, pembilasan dengan PBS sebanyak 3 kali.
- e. Penghitungan kepadatan vaksin inaktif *A. salmonicida* dengan spektrofotometer ($\lambda = 625 \text{ nm}$) mengacu pada standar McFarland.

2. Pelaksanaan Penelitian

a) Vaksinasi

Vaksin yang telah dihitung kepadatannya kemudian akan diujikan, dengan metode vaksinasi yang berbeda masing – masing 3 ulangan.

A : Suntik

B : Oral

C : Rendam

D : Kontrol (tanpa vaksinasi)

Dosis vaksinasi yang digunakan adalah 10^7 sel/ml per ikan untuk vaksinasi secara suntik dan oral serta 10^7 sel/ml air untuk perendaman dengan lama perendaman lebih kurang 30 menit.

b) Titer Antibodi

Pengamatan titer antibodi diperoleh dari pengamatan reaksi aglutinasi antara serum darah pada ikan mas yang direaksikan dengan vaksin inaktif *whole cell A. salmonicida*. Berikut prosedur pengamatan titer antibodi yang dilakukan :

- a. Pengambilan serum pada darah ikan uji : sebelum divaksin, 7 hari setelah vaksinasi I, dan 7 hari setelah booster.
- b. Pengambilan darah dilakukan dengan spuit dari bagian vena caudal.
- c. Serum yang diambil, disimpan pada refrigator. Pengujian dengan metode aglutinasi mengacu pada prosedur standar mikroaglutinasi (Roberson, 1990), dengan sedikit perubahan.

Metode mikroaglutinasi secara lengkap dijelaskan sebagai berikut :

- 1) Serum dimasukkan sebanyak @ 25 μ l ke dalam sumuran 1 dan 2.
- 2) PBS dimasukkan @ 25 μ l ke sumuran 2 – 12. (kecuali sumuran ke – 11, sebagai pembatas).
- 3) Sumuran kemudian direpipeting, dimulai dari sumur 2 dilanjutkan ke sumur ke-3 hingga sumuran ke-10.
- 4) AgH dimasukkan @ 25 μ l pada sumuran 1 – 12.
- 5) Kemudian microdilution plate digoyang – goyangkan selama \pm 3 menit dengan pola membentuk angka 8 atau huruf S.
- 6) Hasil titer diinkubasi dalam refrigator selama 1 malam.

- 7) Pengamatan, dilakukan dengan melihat reaksi aglutinasi pada masing – masing sumur yang ditandai dengan adanya kabut wara keruh/putih atau dot yang menyebar ke seluruh sumuran.
- 8) Hasil pengamatan dicatat berdasarkan reaksi aglutinasi yang terbentuk pada sumuran hingga pengenceran terakhir.

c) Kualitas air

Parameter kualitas air yang diamati adalah oksigen terlarut, pH, dan suhu. Pengukuran parameter kualitas air dilakukan secara harian dan berkala atau mingguan. Parameter kualitas air selama penelitian diharapkan terukur dan masih berada dalam kisaran standar kehidupan ikan uji (ikan mas).

D. Parameter Uji

Parameter utama yang dihitung dalam penelitian ini adalah titer antibodi pada ikan mas dan kualitas air sebagai parameter pendukung.

E. Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini, yaitu parameter utama berupa hasil titer anti bodi setiap perlakuan hingga pengenceran yang tercatat akan dilakukan dengan analisis statistik non parametrik, disajikan dalam bentuk grafik dan tabel. Sedangkan parameter pendukung berupa kualitas air akan dianalisis secara deskriptif.