

**UJI AGLUTINASI KANDIDAT VAKSIN *Aeromonas hydrophila*  
MENGUNAKAN METODE *FORMALIN-KILLED* DENGAN KONSENTRASI  
BERBEDA PADA SERUM IKAN LELE (*Clarias sp.*)**

**SKRIPSI  
PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

Oleh :  
**IWIS**  
NIM. 135080500111100



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2017**

**UJI AGLUTINASI KANDIDAT VAKSIN *Aeromonas hydrophila*  
MENGUNAKAN METODE *FORMALIN-KILLED* DENGAN KONSENTRASI  
BERBEDA PADA SERUM IKAN LELE (*Clarias sp.*)**

**SKRIPSI  
PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan  
di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan  
Universitas Brawijaya

Oleh :  
**IWIS**  
NIM. 135080500111100



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2017**

**UJI AGLUTINASI KANDIDAT VAKSIN *Aeromonas hydrophila*  
MENGUNAKAN METODE FORMALIN-KILLED DENGAN KONSENTRASI  
BERBEDA PADA SERUM IKAN LELE (*Clarias sp.*)**

Oleh :

**IWIS**  
NIM. 135080500111100

Telah dipertahankan di depan penguji  
Pada tanggal 13 April 2017  
dan dinyatakan memenuhi syarat

Dosen Penguji I

**Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS.**  
NIP. 19611106 198602 2 001  
TANGGAL: 21 APR 2017

Menyetujui,  
Dosen Pembimbing I

**Dr. Ir. Maftuch, M.Si**  
NIP. 19660825 199203 1 001  
TANGGAL: 21 APR 2017

Dosen Penguji II

**Ir. Heny Suprastyani, MS.**  
NIP. 19620904 198701 2 001  
TANGGAL: 21 APR 2017

Dosen Pembimbing II

**Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc**  
NIP. 19621014 198701 1 001  
TANGGAL: 21 APR 2017



Mengetahui,  
Ketua Jurusan MSP

**Dr. Ir. Arning Wijjeng Ekawati, MS.**  
NIP. 19620805 198603 2 001  
TANGGAL: 21 APR 2017

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyadari bahwa penulisan laporan skripsi tidak terlepas dari dukungan moril dan materil semua pihak. Melalui kesempatan ini, dengan kerendahan hati penulis mengucapkan terima kasih kepada:

- Allah SWT yang telah meridhoi dan memberi kelancaran dalam penyusunan laporan skripsi.
- Bapak Rifa'i dan Ibu Saniar selaku kedua orang tua yang senantiasa memberikan doa, dukungan dan motivasi serta kakak-kakak saya yang selalu memberikan semangat.
- Bapak Dr. Ir. Maftuch, M.Si. selaku dosen pembimbing I dan Bapak Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc. selaku dosen pembimbing II yang telah banyak memberikan saran, bimbingan, arahan dan nasehat bagi penulis.
- Ibu Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS. selaku penguji I dan Ibu Ir. Heny Suprastyani, MS. Selaku dosen penguji II yang telah memberikan saran, arahan dan nasehat bagi penulis.
- Teman saya satu tim penelitian Cucun Herlina, Ulva Choirul dan Mariana Rahmatika yang senantiasa bekerjasama dalam menyelesaikan penelitian.
- Teman-teman AquaGT'13 yang selalu memberi semangat dan motivasi mulai awal menuntut ilmu di FPIK UB hingga penyusunan laporanini selesai.

Malang, April 2017  
Mahasiswa,

Iwis

## RINGKASAN

**Iwis.** Uji Aglutinasi Kandidat Vaksin *Aeromonas hydrophila* Menggunakan Metode *Formalin-Killed* Dengan Konsentrasi Berbeda pada Serum Ikan Lele (*Clarias* sp.). **Dr. Ir. Maftuch, M.Si.** dan **Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc.**

---

Budidaya secara intensif merupakan sistem budidaya yang dapat diterapkan untuk meningkatkan produksi perikanan. Semakin tinggi intensifikasi budidaya juga dapat menyebabkan semakin tinggi resiko ikan terinfeksi oleh penyakit. Penyakit ikan muncul karena ketidakseimbangan antara ikan, patogen dan lingkungannya. *Aeromonas hydrophila* merupakan bakteri yang dapat menyebabkan penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) pada ikan lele (*Clarias* sp.). Pengendalian MAS telah banyak menggunakan bahan antibiotik. Antibiotik dapat menimbulkan residu pada ikan, sehingga dapat membahayakan kesehatan konsumen apabila dikonsumsi. Salah satu alternatif yang dapat dilakukan untuk mencegah penyakit tersebut yaitu melalui vaksinasi. Vaksinasi dapat memproduksi serum antibodi spesifik yang akan memberikan imunoproteksi ketika diberikan imunisasi pasif pada ikan.

Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui potensi kandidat vaksin *A. hydrophila* melalui uji aglutinasi untuk meningkatkan titer antibodi menggunakan metode *formalin-killed* dengan konsentrasi berbeda, serta mengetahui pengaruh dari perlakuan terbaik.. Penelitian dilakukan di Laboratorium Budidaya Ikan divisi Penyakit dan Kesehatan Ikan, divisi Reproduksi Ikan, serta di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan divisi Pengelolaan Hasil Perikanan Universitas Brawijaya, Malang pada 03 Januari – 26 Februari 2017.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental, sedangkan rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian ini terdiri dari tiga perlakuan dan satu kontrol dengan tiga ulangan. Pemberian perlakuan kandidat vaksin *A. hydrophila* yang diinaktif dengan formalin konsentrasi berbeda melalui injeksi intramuskular yaitu A (2%), B (3%), C (4%) dan K (tanpa vaksinasi). Vaksinasi dilakukan dengan menyuntikkan antigen H 0,1 ml/ekor ikan. Parameter utama pada penelitian ini adalah produksi titer antibodi ikan lele (*Clarias* sp.) sebelum dilakukan vaksinasi, setelah dilakukan vaksinasi dan setelah vaksinasi ulang (*booster*), serta sebagai parameter penunjang adalah pH, suhu dan oksigen terlarut.

Hasil uji menunjukkan tidak terjadi aglutinasi pada serum ikan yang belum divaksinasi, tetapi terjadi peningkatan pada ikan yang divaksinasi dan vaksinasi ulang. Titer antibodi tertinggi pada ikan yang divaksinasi 1 minggu yaitu pada perlakuan C1 dan C3 sebesar 16,667, sedangkan yang terendah pada perlakuan A sebesar 8. Hal yang sama juga terlihat pada titer antibodi setelah vaksinasi ulang (*booster*). Titer antibodi tertinggi setelah vaksinasi ulang yaitu pada perlakuan C1, C2, dan C3 sebesar 128, sedangkan terendah pada perlakuan A sebesar 16. Sehingga dapat disimpulkan bahwa kandidat vaksin *A. hydrophila* yang diinaktif dengan formalin konsentrasi berbeda berpotensi digunakan melalui uji aglutinasi, serta dapat memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap peningkatan titer antibodi ikan lele (*Clarias* sp.) ( $P < 0,05$ ) dengan hasil terbaik pada perlakuan C (4%).

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis ucapkan kehadiran Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya, penulis dapat menyajikan laporan skripsi yang berjudul "Uji Aglutinasi Kandidat Vaksin *Aeromonas hydrophila* Menggunakan Metode *Formalin-Killed* dengan Konsentrasi Berbeda pada Serum Ikan Lele (*Clarias* sp.)." Laporan skripsi disusun sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

Penulis menyadari dalam penulisan laporan ini masih terdapat kekurangan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun demi kesempurnaan laporan ini.

Malang, April 2017

Mahasiswa,

Iwis

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Ikan Lele ( <i>Clarias</i> sp.) .....	6
2. <i>A. hydrophila</i> .....	7
3. Denah ( <i>Lay Out</i> ) Rancangan Penelitian .....	18
4. a. Vaksin inaktif <i>A. hydrophila formalin-killed</i> . b. Ikan lele ( <i>Clarias</i> sp.) setelah vaksinasi .....	27
5. Hubungan pengaruh konsentrasi formalin berbeda dalam menghasilkan antigen H <i>Aeromonas hydrophila</i> terhadap nilai titer antibodi ikan lele ( <i>Clarias</i> sp.) .....	32
6. Hubungan pengaruh formalin dengan konsentrasi berbeda dalam menghasilkan antigen H <i>A. hydrophila</i> terhadap nilai titer antibodi ikan lele ( <i>Clarias</i> sp.) setelah booster .....	36



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Peralatan Penelitian .....	15
2. Bahan-bahan Penelitian .....	16
3. Hasil uji aglutinasi serum darah ikan lele ( <i>Clarias s.</i> ) sebelum vaksinasi (minggu I) .....	30
4. Hasil uji aglutinasi serum darah ikan lele ( <i>Clarias s.</i> ) 1 minggu setelah vaksinasi (minggu II) .....	30
5. Rerata titer antibodi setelah 1 minggu vaksinasi.....	31
6. Sidik ragam produksi titer antibodi ikan lele ( <i>Clarias sp.</i> ) setelah 1 minggu vaksinasi .....	31
7. Uji BNT produksi titer antibodi ikan lele ( <i>Clarias sp.</i> ) setelah 1 minggu vaksinasi .....	32
8. Hasil uji aglutinasi serum darah ikan lele ( <i>Clarias sp.</i> ) 1 minggu setelah vaksinasi (minggu II) .....	34
9. Rerata Produksi titer antibodi ikan lele ( <i>Clarias sp.</i> ) setelah vaksinasi ulang ( <i>booster</i> ).....	34
10. Sidik ragam produksi titer antibodi ikan lele ( <i>Clarias sp.</i> ) setelah vaksinasi ulang ( <i>booster</i> ).....	35
11. Uji BNT produksi titer antibodi ikan lele ( <i>Clarias sp.</i> ) setelah vaksinasi ulang ( <i>booster</i> ) .....	35

## DAFTAR LAMPIRAN

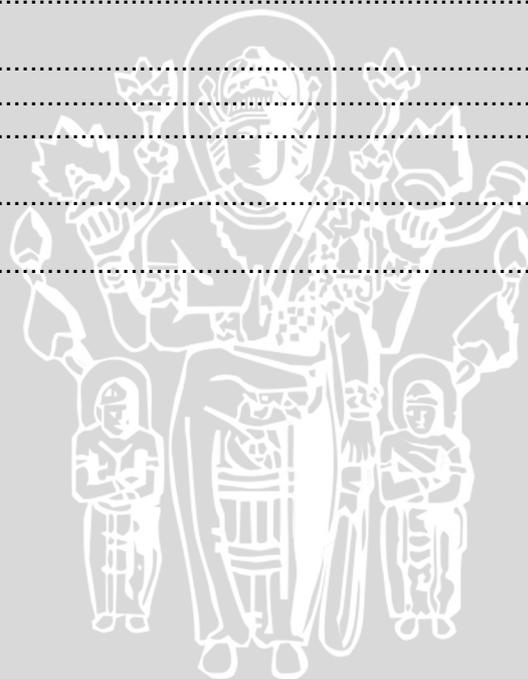
Lampiran	Halaman
1. Alat dan bahan penelitian.....	45
2. Komposisi Media.....	51
3. Proses pembuatan antigen H.....	52
4. Hasil uji biokimia <i>A. hydrophila</i> .....	53
5. Hasil perhitungan kepadatan bakteri menggunakan spektrofotometer.....	55
6. Skema kerja uji aglutinasi.....	56
7. Visualisasi Hasil Aglutinasi.....	57
8. Perhitungan statistik titer antibodi ikan Lele ( <i>Clarias sp.</i> ) selama proses vaksinasi.....	60
9. Data Kualitas Air.....	67



## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>PERNYATAAN ORISINALITAS</b> .....	iii
<b>UCAPAN TERIMAKASIH</b> .....	iv
<b>RINGKASAN</b> .....	v
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vi
<b>DASTAR ISI</b> .....	vii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	ix
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	x
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	ix
<b>1. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Hipotesis.....	3
1.5 Kegunaan Penelitian.....	3
1.6 Tempat dan Waktu Penelitian.....	4
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
2.1 Biologi Ikan Lele ( <i>Clarias</i> sp.).....	5
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	5
2.1.2 Habitat.....	6
2.2 Bakteri <i>A. hydrophila</i> .....	7
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	7
2.2.2 Habitat dan Penyebaran.....	8
2.2.3 Patogenisitas.....	8
2.2.4 Virulensi.....	9
2.3 Antigen H.....	10
2.4 Vaksinasi.....	10
2.5 Uji Aglutinasi.....	11
2.6 Potensi Vaksin.....	12
2.7 Kualitas Air.....	12
2.3.1 Suhu.....	12
2.3.2 DO ( <i>Dissolved Oxygen</i> ).....	13
2.3.3 pH.....	13
<b>3. METODE PENELITIAN</b> .....	15

3.1 Materi Penelitian.....	15
3.1.1 Peralatan Penelitian.....	15
3.1.2 Bahan Penelitian.....	16
3.2 Metode dan Rancangan Penelitian.....	17
3.2.1 Metode Penelitian.....	17
3.2.2 Rancangan Penelitian.....	17
3.3 Prosedur Penelitian.....	18
3.3.1 P ersiapan Penelitian.....	18
3.3.2 Pelaksanaan Penelitian.....	22
3.4 Parameter Uji.....	24
3.4.1 Parameter Utama.....	24
3.4.2 Parameter Penunjang.....	24
3.5 Analisis Data.....	24
<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>26</b>
4.1 Hasil Pembuatan Kandidat Vaksin <i>A. hydrophila</i> .....	26
4.2 Vaksinasi.....	27
4.3 Uji Aglutinasi.....	29
4.3 Kualitas Air.....	37
<b>5. PENUTUP.....</b>	<b>40</b>
5.1 Kesimpulan.....	40
5.2 Saran.....	40
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>41</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>45</b>



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Budidaya ikan secara intensif merupakan salah satu upaya yang dapat dilakukan dalam meningkatkan produksi. Menurut Pasaribu *et al.* (2015), sistem budidaya ikan secara intensif dapat memberikan dampak negatif terhadap kesehatan ikan jika tidak dilakukan penanganan dengan baik. Padat penebaran ikan yang terlalu tinggi dapat menyebabkan ikan stres, sehingga mudah terinfeksi oleh patogen. Penyakit merupakan masalah utama yang dapat menurunkan produksi budidaya, menurunkan kualitas air bahkan menyebabkan kematian total pada ikan budidaya. Penyakit dapat disebabkan oleh beberapa jenis patogen seperti virus, parasit, jamur, dan bakteri (Ashari *et al.*, 2014).

Penyakit ikan muncul akibat ketidakseimbangan antara ikan sebagai inang, patogen, dan lingkungan. Sistem pertahanan tubuh ikan dapat terganggu akibat adanya perubahan lingkungan serta berkembangnya patogen dalam suatu wadah budidaya. Bakteri *Aeromonas hydrophila* merupakan jenis bakteri yang bersifat patogen dan dapat menyebabkan penyakit sistemik serta mengakibatkan kematian secara masal (Haryani *et al.*, 2012). Bakteri ini dapat menginfeksi ikan air tawar pada semua umur dan dapat mematikan sampai 100%. Penyakit yang diakibatkan oleh bakteri *A. hydrophila* yaitu *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS).

Komoditas perikanan budidaya yang sering mengalami penyakit MAS yaitu ikan lele (*Clarias* sp.). Ikan lele yang mengalami penyakit MAS ditandai dengan gejala klinis berupa kerusakan pada bagian sirip, lesi pada kulit, dan gerakan renang lemah. Pengendalian penyakit MAS pada awalnya banyak menggunakan antibiotik. Antibiotik dapat menimbulkan residu pada ikan,

sehingga dapat membahayakan kesehatan konsumen apabila dikonsumsi. Salah satu alternatif yang dapat dilakukan untuk mencegah penyakit tersebut yaitu melalui vaksinasi.

Vaksinasi merupakan cara yang efektif dan efisien untuk mencegah penyakit MAS. Tingkat perlindungan yang ditimbulkan oleh vaksinasi sangat tergantung pada jenis vaksin, kondisi ikan, dan lingkungan (Mulia dan Purbomartono, 2007). Vaksinasi dapat memproduksi serum antibodi spesifik yang akan memberikan immunoproteksi ketika diberikan imunisasi pada ikan. Hal tersebut akan memegang peranan dalam membuktikan bahwa vaksinasi pada ikan dapat mengontrol penyakit MAS pada lingkungan budidaya (Sugiani, 2012). Preparasi antigen vaksin dibuat dari organisme patogen yang telah dibuat menjadi non-patogen dengan berbagai macam metode. Tujuan melakukan vaksinasi adalah untuk menstimulasi sistem imun dengan cara meningkatkan resistensi ikan terhadap jenis patogen tertentu.

Vaksin pada industri budidaya ikan umumnya menggunakan formula dari bakteri yang diinaktif dengan formalin atau pemanasan bakteri sel utuh. Inaktivasi bakteri sebagai kandidat vaksin menggunakan formalin disebut juga dengan metode *formalin-killed*. Metode ini menggunakan formalin untuk menghasilkan antigen H. Antigen H (Ag H) merupakan vaksin sel utuh (*whole cell*) yang dilemahkan dengan formalin. Ag H masih mengandung flagelum dan protein yang memungkinkan reaksi kuat terhadap antibodi (Mulia, 2007).

Berdasarkan permasalahan di atas, perlu dilakukan penelitian mengenai potensi bakteri *A. hydrophila* sebagai vaksin inaktif menggunakan metode *formalin-killed* dengan konsentrasi berbeda melalui uji aglutinasi. Peran vaksin inaktif bakteri *A. hydrophila* sebagai antigen dapat meningkatkan aktivitas sistem imun pada ikan budidaya melalui peningkatan titer antibodi, sehingga dapat mencegah infeksi bakteri *A. hydrophila*.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan permasalahan di atas, maka rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu bagaimana potensi kandidat vaksin inaktif *formalin-killed A. hydrophila* terhadap peningkatan titer antibodi ikan lele (*Clarias sp.*) melalui uji aglutinasi.

## 1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, tujuan penelitian yaitu untuk mengetahui potensi kandidat vaksin inaktif *formalin-killed A. hydrophila* terhadap peningkatan titer antibodi ikan lele (*Clarias sp.*) melalui uji aglutinasi, serta mengetahui hasil terbaik dari perlakuan.

## 1.4 Hipotesis

Hipotesis yang mendasari penelitian ini yaitu:

H<sub>0</sub> : diduga kandidat vaksin inaktif *formalin-killed A. hydrophila* tidak berpengaruh nyata terhadap peningkatan titer antibodi ikan lele (*Clarias sp.*) melalui uji aglutinasi.

H<sub>1</sub> : diduga kandidat vaksin inaktif *formalin-killed A. hydrophila* berpengaruh sangat nyata terhadap peningkatan titer antibodi ikan lele (*Clarias sp.*) melalui uji aglutinasi.

## 1.5 Kegunaan Penelitian

Kegunaan penelitian ini yaitu dapat memperluas wawasan dan keterampilan mahasiswa dalam melakukan kegiatan pembuatan Ag H dan uji aglutinasi dengan memanfaatkan bakteri sebagai upaya penentuan potensi kandidat vaksin. Selain itu, diharapkan dari hasil uji aglutinasi dapat digunakan dalam uji lanjutan sebagai potensi vaksin dari bakteri *A. hydrophila* sehingga dapat digunakan oleh pembudidaya ikan.

### 1.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Budidaya Ikan divisi Penyakit dan Kesehatan Ikan, divisi Reproduksi Ikan, dan Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan divisi Pengelolaan Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang pada 03 Januari – 26 Februari 2017.



## 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Biologi Ikan Lele (*Clarias sp.*)

#### 2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi ikan lele menurut Darseno (2010) adalah:

Filum	: Chordata
Klas	: Pisces
Ordo	: Siluriformes
Famili	: Clariidae
Genus	: Clarias
Spesies	: <i>Clarias batrachus</i>

Ikan lele merupakan ikan air tawar yang mempunyai bentuk tubuh memanjang. Bagian tengah badannya mempunyai potongan membulat dengan kepala pipih ke bawah (*depressed*). Bagian belakang tubuh ikan lele berbentuk pipih ke samping (*compressed*). Mulut terletak pada ujung moncong (terminal) dengan dihiasi 4 sungut (kumis). Sirip ekor ikan lele berbentuk bulat, tidak bergabung dengan sirip punggung dan anal. Sirip dada dilengkapi dengan sepasang duri tajam yang umumnya disebut patil (Kordi, 2010).

Ikan lele memiliki tubuh bulat dan memanjang. Kulitnya licin, berlendir, tetapi tidak bersisik. Warna tubuh ikan lele berbeda-beda setiap jenisnya. Ukuran mulut ikan lele relatif lebar, hampir membelah setengah dari lebar kepalanya. Bagian kepala berbentuk pipih ke bawah yang dilapisi tulang pelat. Ciri khas pada ikan lele yaitu kumis yang berada di sekitar mulut. Kumis lele berfungsi untuk meraba dan mencari makanan (Suyanto, 2008). Ikan lele memiliki sepasang patil yang tajam pada bagian bawah dari sirip dada. Selain sebagai senjata, patil juga digunakan lele untuk melompat dari kolam atau berjalan di atas tanah.



**Gambar 1.** Ikan Lele (*Clarias* sp.) (Darseno, 2008).

### 2.1.2 Habitat

Habitat ikan lele adalah di semua perairan tawar, seperti sungai yang airnya tidak deras atau di perairan tenang (danau, waduk, rawa), dan genangan air lainnya. Ikan lele yang hidup di sungai biasanya dapat ditemukan pada tempat-tempat yang arusnya tidak terlalu deras, yaitu pada kelokan aliran sungai. Ikan ini tidak menyukai tempat yang tertutup rapat oleh tanaman air, tetapi lebih menyukai tempat yang terbuka. Ikan lele hidup dengan baik di dataran rendah sampai ketinggian 600 meter di atas permukaan laut (m dpl) dengan suhu 25-30°C. Pertumbuhan lele akan terhambat jika hidup pada perairan dengan ketinggian 700 m dpl (Kordi, 2010).

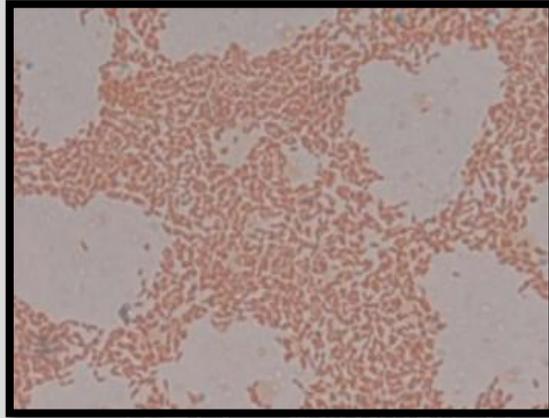
Ikan lele dapat ditemukan hampir di semua perairan tawar, mulai dari waduk, sungai, danau dan dapat dibudidayakan di kolam terpal. Lele merupakan jenis ikan yang hidup dan mencari makanan di dasar perairan. Lele termasuk ke dalam jenis hewan nokturnal karena kebiasaan aktifitas dan mencari makannya pada malam hari. Lele menyukai perairan yang banyak didiami organisme yang dapat dimanfaatkan sebagai makanannya, seperti cacing, jentik serangga, dan belatung (Hendriana, 2010).

## 2.2 Bakteri *A. hydrophila*

### 2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Berikut adalah klasifikasi *A. hydrophila* menurut Mulyani *et al.* (2013):

Filum	: Protophyta
Kelas	: Schizomycetes
Ordo	: Pseudanonadeles
Family	: Vibrionaceae
Genus	: Aeromonas
Spesies	: <i>Aeromonas hydrophila</i>



**Gambar 2.** Bakteri *A. hydrophila* pada mikroskop perbesaran 1000x (Herupradoto dan Yuliani, 2010).

*A. hydrophila* merupakan bakteri heterotrofik uniseluler, tergolong protista prokaryot yang dicirikan dengan tidak adanya membran yang memisahkan inti sel dan sitoplasma. Bakteri ini biasanya berukuran 0,7-1,8 x 1,0-1,5 mikron. *A. hydrophila* bersifat motil dengan flagel tunggal di salah satu ujungnya. Bakteri ini berbentuk batang sampai kokus dengan ujung membulat, fakultatif anaerob, dan bersifat mesofilik dengan suhu optimum 20-30°C. *A. hydrophila* bersifat gram negatif, oksidasi positif dan katalase positif (Haryani *et al.*, 2012).

*A. hydrophila* termasuk gram negatif, berbentuk batang pendek, bersifat aerob dan fakultatif anaerob, tidak berspora, motil, mempunyai satu flagel, hidup

pada kisaran suhu 25-30°C (Lukistyowati dan Kurniasih, 2012). Morfologi koloni dari *A. hydrophila* yaitu berwarna krem, elevasi cembung, dan tepiannya halus. Morfologi sel *A. hydrophila* berbentuk batang dan bersifat gram negatif. Uji sifat biokimia menunjukkan *A. hydrophila* bersifat motil dan membentuk H<sub>2</sub>S, positif uji oksidatif, oksidase dan katalase (Wahjuningrum *et al.*, 2013).

### 2.2.2 Habitat dan Penyebaran

*A. hydrophila* biasanya menyerang hampir semua ikan air tawar, seperti ikan Mas, Gurami, Mujair serta ikan Nila. Penyakit yang diakibatkan oleh bakteri ini mengakibatkan kematian di atas 80% dalam waktu relatif singkat (Tantu *et al.*, 2013). Bakteri ini menginfeksi jaringan sehingga terjadi luka-luka pada permukaan tubuh, pendarahan pada insang, perut membesar berisi cairan, sisik lepas, sirip ekor lepas, jika dilakukan pembedahan akan terlihat pembengkakan.

Bakteri *A. hydrophila* menyebabkan penyakit menular pada beberapa jenis ikan air tawar diantaranya ikan Mas (*Cyprinus carpio*), Patin (*Pangasius sp.*), Lele (*Clarias batrachus*), Betutu (*O. marmorata*) dan Gurame (*Osphronemus gouramy*). Penularannya sangat cepat dapat berlangsung melalui perantara air, kontak badan, kontak dengan peralatan tercemar. Penularan penyakit juga dapat terjadi karena pemindahan ikan yang telah terinfeksi *A. hydrophila* dari satu tempat ke tempat lainnya (Simatupang dan Anggraini, 2013).

### 2.2.3 Patogenisitas

Patogenisitas ialah kemampuan suatu organisme untuk menimbulkan penyakit. *A. hydrophila* yang patogen, diduga memproduksi faktor-faktor eksotoksin dan endotoksin. Faktor tersebut sangat berpengaruh pada patogenitas bakteri ini. Enzim protease merupakan enzim yang mampu melawan pertahanan tubuh inang untuk berkembangnya penyakit dan mengambil persediaan nutrisi. Hemolisin yang terlarut dalam darah lebih lanjut mampu melisis sel darah merah dan membebaskan hemoglobinnya sehingga darah

banyak yang keluar melewati luka pada permukaan tubuh yang terinfeksi. Hal ini menyebabkan terjadinya haemoragi. Haemoragi yang terjadi pada tubuh Lele Dumbo disebabkan oleh toksin hemolisin dengan target memecah sel darah merah, sehingga sel keluar dari pembuluh darah dan menimbulkan warna kemerahan pada permukaan kulit (Triyaningsih, 2014).

Ikan yang terinfeksi *A. hydrophila* mengalami pendarahan pada organ yang terinfeksi. Keberadaan bakteri yang kemungkinan menghasilkan eksotoksin maupun endotoksin menyebabkan penurunan Hb. Adanya infeksi *A. hydrophila* juga dapat menurunkan kadar eritrosit. Hal ini dimungkinkan karena bakteri ini dapat melisis eritrosit. Keberadaan *A. hydrophila* menyebabkan perubahan pada jumlah Hb ikan nila pada jam ke-120 (Hardi *et al.*, 2014).

#### 2.2.4 Virulensi

*A. hydrophila* merupakan bakteri patogen oportunistik yang dapat menyebabkan kematian tinggi pada ikan budidaya. Hal ini dimungkinkan oleh sifat virulen yang diakibatkan oleh produk ekstraseluler seperti endotoksin, sitotoksin, hemolisin, dan protease. Produk tersebut dapat mendegradasi jaringan dan menimbulkan luka, sehingga terjadi pendarahan pada inang (Lukistyowati dan Kurniasih, 2012). Berdasarkan hasil penelitian Suryaningsih *et al.* (2014), infeksi *A. hydrophila* mampu mematikan 50% ikan uji dengan kepadatan  $1,25 \times 10^8$  Cfu/ml. Hal ini membuktikan bahwa *A. hydrophila* mempunyai tingkat virulensi yang tinggi.

Berdasarkan hasil uji virulensi *A. hydrophila* terhadap ikan Lele, dapat diketahui bahwa bakteri ini mempunyai tingkat virulensi yang tinggi. Uji virulensi dilakukan melalui uji LC<sub>50</sub> dan mendapatkan hasil bahwa tingkat virulensi *A. hydrophila* pada kepadatan  $10^8$  cfu/ml. Hal ini membuktikan bahwa *A. hydrophila* mampu mematikan 50% ikan lele pada kepadatan  $10^8$  cfu/ml (Wahjuningrum *et al.*, 2013).

### 2.3 Antigen H

Antigen H (Ag H) merupakan vaksin sel utuh (*whole cell*) yang dilemahkan dengan formalin. Vaksin ini merupakan sub unit protein yang membentuk polimer. Antigen H masih mengandung flagelum dan protein yang memungkinkan terjadinya reaksi kuat terhadap antibodi (Mulia, 2007).

Antigen H (*whole cell*) merupakan antigen yang dibuat dengan cara menginaktifkan bakteri patogen *A. hydrophila* menggunakan formalin 2% (Mulia *et al.*, 2015). Penggunaan antigen *whole cell A. hydrophila* dapat meningkatkan respons imun berupa titer antibodi. Antigen H merupakan antigen yang terdapat pada flagel bakteri yang bersifat tidak tahan panas, sehingga dapat diinaktifkan dengan formalin.

### 2.4 Vaksinasi

Vaksinasi merupakan salah satu upaya penanggulangan penyakit pada organisme dengan cara pemberian vaksin ke dalam tubuh, sehingga tubuh dapat memiliki ketahanan terhadap serangan penyakit. Salah satu tujuan vaksinasi yaitu untuk meningkatkan antibodi spesifik. Meningkatnya antibodi dapat meningkatkan kemampuan pertahanan humoral dan pertahanan seluler (*cell mediated immunity*), sehingga hasil kerja keduanya dapat meningkat (Sugiani, 2012).

Prinsip dasar vaksinasi pada ikan adalah memasukkan antigen yang diperoleh dari patogen yang telah dihilangkan sifat patogenitasnya, dimatikan atau berupa ekstrak ke dalam tubuh ikan untuk merangsang sel-sel limfosit membentuk antibodi. Antibodi yang terbentuk berfungsi sebagai sistem pertahanan spesifik terhadap suatu patogen tertentu, sehingga ketika patogen menyerang maka tubuh akan merespon untuk mempertahankan diri dari serangan patogen tersebut. Respon pertahanan tubuh terhadap patogen akan

berlangsung cukup lama karena tubuh memiliki memori terhadap patogen tersebut (Tizard, 1988).

## 2.5 Uji Aglutinasi

Uji aglutinasi merupakan salah satu uji serologi yang digunakan untuk mendiagnosa suatu penyakit. Uji aglutinasi dapat diterapkan untuk menguji potensi dari suatu vaksin. Prinsip dasar aglutinasi yaitu penggumpalan partikel atau sel yang tidak larut menjadi gumpalan yang lebih besar (Setiawan *et al.*, 2012). Hal ini ditandai dengan terbentuknya gumpalan bakteri yang dibentuk dengan adanya penambahan antigen sejenis. Metode uji aglutinasi biasanya digunakan untuk mencari titer antibodi dari serum darah organisme. Pengujian titer antibodi dilakukan di mikrotiter plate menggunakan metode aglutinasi (Sari *et al.*, 2013). Uji aglutinasi dapat digunakan untuk menguji potensi dari suatu vaksin inaktif bakteri. Potensi dari vaksin inaktif bakteri dapat diamati secara visual melalui perubahan warna menjadi keruh dan menggumpal seperti awan.

Aglutinasi bakteri diartikan sebagai suatu respon kekebalan tahap kedua dengan jalan menggumpalkan bakteri yang masuk dengan bantuan antiserum dalam darah. Antibodi dapat berikatan silang dengan butiran antigen, menghasilkan gumpalan atau aglutinasi. Aglutinasi dapat dihasilkan dengan pencampuran suspensi partikel antigen, seperti bakteri dengan antiserum. Antibodi berhubungan dengan cepat dengan partikel tersebut (interaksi primer) tetapi aglutinasi adalah proses yang jauh lebih lambat, karena pelekatan partikel hanya terjadi bila masing-masing bersentuhan. Adanya aktivitas aglutinasi terhadap bakteri oleh antiserum dapat dibuktikan melalui uji aglutinasi bakteri (*Bacterial Agglutination*) secara *in vitro* (Hastuti, 2010).

## 2.6 Potensi Vaksin

Vaksinasi untuk mencegah penyakit mempunyai prospek yang baik karena tidak menimbulkan dampak negatif pada ikan, lingkungan, dan konsumen. Efektivitas vaksin sangat tergantung pada jenis dan kualitas vaksin, cara vaksinasi, kondisi ikan, dan lingkungan. Berdasarkan penelitian Olga *et al.* (2007), menunjukkan bahwa penggunaan protein *A. hydrophila* sebagai vaksin dapat meningkatkan titer antibodi pada jambal siam. Protein merupakan makromolekul yang dapat merangsang limfosit untuk menghasilkan antibodi.

Vaksinasi diyakini dapat memberikan kekebalan spesifik pada ikan terhadap penyakit tertentu. Beberapa penelitian terdahulu telah membuktikan bahwa ikan lele memberikan respon terhadap vaksin inaktif formalin. Vaksin merupakan suatu produk biologis yang terbuat dari kuman, komponen kuman atau racun kuman yang telah dilemahkan atau dimatikan sehingga dapat merangsang timbulnya kekebalan tubuh spesifik secara aktif terhadap penyakit tertentu (Roza *et al.*, 2010).

## 2.7 Kualitas Air

Air merupakan salah satu elemen yang sangat erat hubungannya dalam kegiatan akuakultur. Kualitas air yang baik dapat mempengaruhi komoditas perikanan yang sedang dibudidayakan. Berikut ini adalah parameter fisika dan kimia air yang berpengaruh terhadap kehidupan dan pertumbuhan ikan diantaranya suhu, oksigen terlarut (DO), dan pH.

### 2.3.1 Suhu

Suhu memiliki peranan dalam mengendalikan kondisi ekosistem perairan. Perubahan suhu dapat berpengaruh terhadap seluruh komponen yang berada di dalamnya. Pada umumnya, ikan lele menyukai perairan dengan suhu air berkisar 20-30°C. Pada kisaran suhu tersebut ikan lele dapat hidup dan berkembang biak

dengan baik. Bila suhu air kurang atau lebih dari kisaran tersebut, pertumbuhan ikan dapat terhambat bahkan menemui kematian (Salmin, 2005).

Ikan lele hidup dengan baik di dataran rendah sampai pada ketinggian 600 meter di atas permukaan laut (dpl) dengan suhu 25-30°C. Pada ketinggian di atas 700 dpl, pertumbuhan ikan lele kurang baik. Lele tidak cocok hidup di air payau atau asin, walaupun sering berenang hingga ke bagian air yang agak payau (Kordi, 2010).

### 2.3.2 DO (*Dissolved Oxygen*)

Kandungan oksigen air merupakan oksigen yang terlarut dalam air. Oksigen yang terlarut dalam air tersebut dapat berasal dari udara atau hasil fotosintesis tanaman air. Pada perairan yang mengalir terdapat vegetasi air atau tanaman air, yang umumnya memiliki kandungan oksigen yang sangat tinggi, yaitu sekitar 6-8 mg/l. Di kolam pemeliharaan, oksigen terlarut dapat berasal dari udara yang dihembuskan ke dalam air (Mantau dan Sudarty, 2011).

Oksigen terlarut (*Dissolved Oxygen*) dibutuhkan oleh semua jasad hidup untuk proses metabolisme atau pertukaran zat yang kemudian menghasilkan energi untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan. Oksigen terlarut dapat berasal dari proses fotosintesis tumbuhan air dan dari udara yang masuk ke dalam air. Pada suhu 20°C tekanan udara satu atmosfer konsentrasi DO dalam keadaan jenuh 9,2 ppm dan pada suhu 50°C (tekanan udara sama) konsentrasi DO adalah 5,6 ppm (Salmin, 2005).

### 2.3.3 pH

Menurut Effendie (1997), ikan atau biota air lainnya memiliki toleransi sendiri terhadap derajat keasaman. Pada umumnya nilai pH turun bersama dengan turunnya kandungan mineral yang ada dalam perairan. pH yang optimal dalam pembenihan ikan adalah 6,7-8,2 biasanya berada pada ketinggian 150-1000 m di atas permukaan laut.

Menurut Cahyono (2000) derajat keasaman air (pH) dapat mempengaruhi pertumbuhan ikan. Derajat keasaman air sangat rendah atau sangat asam dapat menyebabkan kematian ikan dengan gejala gerakannya tidak teratur, tutup insang bergerak aktif dan berenang sangat cepat di permukaan air. Perairan yang asam juga berpengaruh terhadap nafsu makan ikan.



### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Peralatan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada Tabel 1, beberapa gambar peralatan yang digunakan disajikan pada Lampiran 1.

**Tabel 1.** Peralatan Penelitian

No	Alat	Kegunaan
1	Autoklaf	Sebagai alat untuk mensterilisasi peralatan yang akan digunakan.
2	Kulkas	Sebagai tempat penyimpanan bahan pada suhu dingin.
3	Cawan Petri	Sebagai tempat untuk uji viabilitas dan pembiakan bakteri.
4	Erlenmeyer 500 ml	Sebagai tempat pembuatan media
5	Erlenmeyer 250 ml	Sebagai tempat formalin
6	Gelas ukur 100 ml	Sebagai alat untuk mengukur larutan
7	Bunsen	Untuk mencegah terjadinya kontaminasi pada saat perlakuan
8	Tabung Reaksi	Sebagai tempat untuk peremajaan bakteri dan pengenceran.
9	<i>Hot Plate</i>	Sebagai alat pemanas media
10	Timbangan Digital	Sebagai alat untuk menimbang bahan dengan ketelitian $10^{-2}$
11	Timbangan Analitik	Sebagai alat untuk menimbang bahan dengan ketelitian $10^{-3}$
12	<i>Vortex Mixer</i>	Sebagai alat untuk menghomogenkan larutan
13	Falcon	Tempat pembuatan antigen
14	Mikropipet 10-100 $\mu$ l	Sebagai alat untuk mengambil bahan yang berbentuk cairan
	Mikropipet 100-1000 $\mu$ l	
15	Nampan	Sebagai tempat menyimpan alat
16	Spektrofotometer	Sebagai alat untuk mengukur kekeruhan
17	<i>Washing bottle</i>	Sebagai tempat menyimpan akuades
18	<i>Sprayer</i>	Sebagai tempat menyimpan alkohol untuk sterilisasi
19	Masker	Untuk menutup bagian muka (mulut dan hidung) agar tidak terjadi kontaminasi pada saat perlakuan
20	Sarung Tangan	Sebagai alat untuk mencegah kontaminasi
21	<i>Sentrifuge</i>	Untuk memisahkan supernatan dan pellet
22	LAF ( <i>Laminary Air Flow</i> )	Sebagai tempat dilakukannya perlakuan
23	Inkubator	Sebagai alat untuk menginkubasi
24	Sendok Bahan	Sebagai alat untuk mengambil sampel
25	Oven	Sebagai alat untuk mengeringkan cawan petri

26	Jarum ose	Untuk menginokulasi bakteri saat penanaman dan peremajaan
27	Toples 16L	Untuk wadah pemeliharaan ikan
28	Aerator set	Untuk mensuplai oksigen
29	Seser	Untuk mengambil ikan
30	Sprit 1ml	Untuk menginjeksi dan mengambil darah ikan
31	Mikroplate	Untuk wadah uji aglutinasi
32	Yellowtip	Untuk memindahkan larutan skala kecil

### 3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada

Tabel 2 di bawah ini :

**Tabel 2.** Bahan-Bahan Penelitian

No	Bahan	Kegunaan
1	Ikan lele ( <i>Clarias</i> sp.)	Sebagai bahan yang akan diuji aglutinasi
2	Aquadest	Sebagai bahan pelarut media
3	Air	Sebagai bahan media hidup ikan
4	Tisu	Sebagai bahan pembersih
5	Aluminium Foil	Sebagai bahan untuk menutupi seluruh bagian beaker glass dan erlenmeyer saat sterilisasi
6	Alkohol 70%	Sebagai bahan pengkondisian aseptis
7	Kapas	Sebagai bahan untuk menutupi alat pada saat sterilisasi
8	Kertas Label	Sebagai bahan penanda
9	Bakteri <i>A. hydrophila</i>	Sebagai bakteri yang digunakan pada saat perlakuan pembuatan antigen
10	TSA ( <i>Tryptone Soya Agar</i> )	Sebagai media agar
11	TSB ( <i>Tryptone Soya Broth</i> )	Sebagai media cair
12	Plastik 2 Kg	Sebagai bahan untuk menyimpan petri pada saat diinkubasi
13	Kertas bekas	Sebagai bahan untuk membungkus peralatan yang akan di sterilisasi
14	Formalin 37%	Sebagai bahan untuk membuat konsentrasi formalin yang diinginkan
16	Tali Kasur	Sebagai bahan untuk mengikat peralatan yang akan di sterilisasi
18	NaCl	Sebagai bahan pembuatan Na Fisiologis
19	Spiritus	Sebagai bahan bakar untuk Bunsen
20	Plastik Wrap	Sebagai pembungkus botol sampel
21	PBS ( <i>Phosphat Buffer Saline</i> )	Untuk mencuci pellet dan pelarut antigen

## 3.2 Metode dan Rancangan Penelitian

### 3.2.1 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan yaitu metode eksperimen. Penelitian eksperimen adalah penelitian yang dilakukan terhadap variabel yang data-datanya belum ada sehingga perlu dilakukan proses manipulasi melalui pemberian treatment/perlakuan tertentu terhadap subjek penelitian yang kemudian diamati/diukur dampaknya (data yang akan datang) (Jaedun, 2011).

### 3.2.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian merupakan gambaran umum penelitian yang akan dilaksanakan oleh peneliti untuk mencapai tujuan tertentu. Rancangan penelitian disajikan dalam satu kesatuan naskah yang ringkas dan utuh. Rancangan penelitian menunjukkan adanya format penulisan yang disusun secara sistematis dan operasional meliputi langkah-langkah dan tahapan yang harus dijalani oleh peneliti. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL).

Menurut Hanafiah (2013), Rancangan Acak Lengkap (RAL) merupakan rancangan yang paling sederhana jika dibandingkan dengan rancangan-rancangan lainnya. Dalam rancangan ini tidak terdapat kontrol, sehingga sumber keragaman yang diamati hanya perlakuan dengan galat. Kondisi ini hanya dicapai di ruangan-ruangan terkontrol seperti di laboratorium. Adapun model rancangan acak lengkap yang secara umum dinyatakan dalam model matematika adalah sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan :

$Y_{ij}$  = Respon atau nilai pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

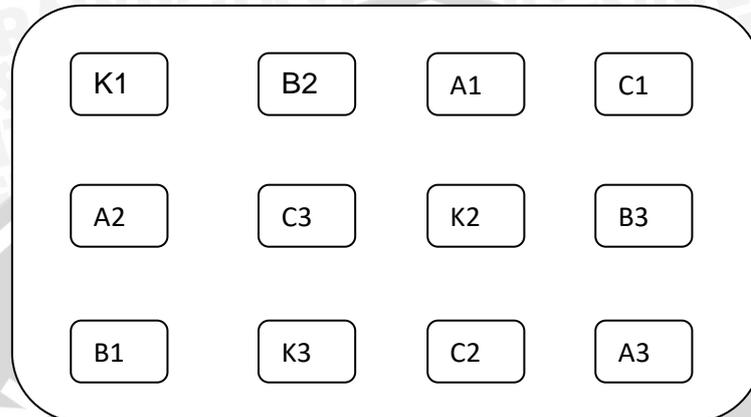
$\mu$  = Nilai tengah umum

$T_i$  = Pengaruh perlakuan ke-i

$\varepsilon_{ij}$  = Pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Rancangan percobaan yang digunakan menggunakan RAL yang terdiri dari 3 perlakuan konsentrasi formalin, yaitu A=2%, B=3%, C=4%, dan 1 kontrol yang masing-masing dilakukan 3 kali ulangan.

Denah penelitian yang digunakan dapat dilihat pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Denah (*Lay Out*) Rancangan Penelitian

Keterangan :

- Kontrol : Ikan tanpa pemberian antigen.
- Perlakuan A : Ikan yang diberi antigen dengan konsentrasi formalin 2%.
- Perlakuan B : Ikan yang diberi antigen dengan konsentrasi formalin 3%.
- Perlakuan C : Ikan yang diberi antigen dengan konsentrasi formalin 4%.
- 1,2,3 : Ulangan perlakuan.

### 3.3 Prosedur Penelitian

#### 3.3.1 P ersiapan Penelitian

##### a. Sterilisasi Alat Bahan

Sterilisasi adalah suatu cara untuk membebaskan benda dari jasad hidup, baik terkait dengan wadah atau alat yang digunakan, media bagi jasad mikro, spesimen (benda yang menjadi sumber diperolehnya jasad mikro yang dikehendaki), maupun lingkungan/ruang kerja. Proses sterilisasi alat dan bahan adalah sebagai berikut:

- Alat-alat yang akan disterilisasi dibungkus dengan menggunakan kertas bekas, kemudian diikat dengan menggunakan benang (untuk tabung reaksi dan erlenmeyer bagian atas diberi kapas).
- Air dituang secukupnya dalam autoklaf, kemudian alat yang telah dibungkus kertas Koran dimasukkan ke dalam autoklaf dan ditutup rapat secara diagonal.
- Saklar dinyalakan, kemudian tombol sirine yang berwarna merah pada autoklaf diputar sampai batas lampu yang berwarna merah.
- Ditunggu 15 menit, setelah mencapai suhu  $121^{\circ}\text{C}$  alarm akan berbunyi lalu dimatikan.
- Ditunggu beberapa saat sampai termometer dan manometer menunjukkan angka 0.
- Saklar listrik dimatikan dan dibuka tutup autoklaf.
- Diambil alat yang sudah disterilisasi lalu disimpan dalam inkubator, bahan yang telah disterilisasi disimpan dalam lemari pendingin.

#### **b. Pembuatan Media Agar Miring**

Media agar miring digunakan sebagai media untuk peremajaan bakteri.

Adapun proses pembuatan media agar miring adalah sebagai berikut:

- Media TSA (*Trypticase Soy Agar*) ditimbang dengan komposisi 37 gr per 1000 ml akuades dengan menggunakan timbangan digital.
- Media dimasukkan ke dalam *beaker glass*.
- Media dilarutkan dengan akuades dan dihomogenkan.
- Media yang sudah homogen dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 7 ml disetiap tabung reaksinya.
- Tabung reaksi ditutup kapas dan dibungkus aluminium foil serta diikat oleh benang.

- Media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.
- Tabung reaksi yang berisi media steril dimiringkan dengan kemiringan 30°.
- Media ditunggu sampai menjadi padat.

#### c. Pembuatan Media TSB (*Tryptic Soy Broth*)

Media TSB adalah media cair yang digunakan untuk kultur bakteri.

Adapun proses pembuatan media TSB adalah sebagai berikut:

- Media ditimbang dengan komposisi 30 gr per 1000 ml akuades dengan menggunakan timbangan digital.
- Media dimasukkan ke dalam erlenmeyer.
- Media dilarutkan dengan aquades lalu dihomogenkan.
- Media yang sudah homogen ditutup kapas dan dibungkus alumunium foil serta diikat oleh tali, kemudian dididihkan di atas *hot plate*.
- Media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.
- Media steril ditunggu hingga media tidak terlalu panas.
- Media dituangkan pada 9 tabung falcon sebanyak masing-masing  $\pm$  10 ml.

#### d. Peremajaan Bakteri *A. hydrophila*

Isolat bakteri *A. hydrophila* didapatkan dari Balai Karantina Ikan (BKI) Juanda. Bakteri tersebut sudah dilakukan uji biokimia terlebih dahulu seperti yang ditunjukkan pada Lampiran 4. Peremajaan bakteri *A. hydrophila* dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- Media TSA miring yang sudah dibuat disiapkan terlebih dahulu.
- Bakteri diambil dengan menggunakan jarum ose dari stok bakteri.
- Bakteri yang terdapat pada jarum ose digoreskan ke dalam media TSA miring dengan metode gores.

- Media TSA miring diinkubasi di dalam inkubator dengan suhu 32<sup>0</sup>C selama 24 jam.

#### **e. Kultur Bakteri *A.hydrophila***

Kultur bakteri *A. hydrophila* dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- Biakan bakteri yang sudah diremajakan pada media agar miring diambil dengan menggunakan jarum ose sebanyak 1 gores.
- Ose yang sudah ada bakterinya digoreskan pada media TSA yang sudah di persiapkan pada cawan petri.
- Media disimpan pada inkubator dengan suhu 30<sup>0</sup>C selama 24 jam.
- Semua kegiatan pengkulturan dilakukan secara steril.

#### **f. Penentuan Kepadatan Bakteri *A.hydrophila***

Kepadatan bakteri yang akan dijadikan vaksin dapat diperoleh dengan metode spektrofotometer sebagai berikut:

- Kultur bakteri pada media TSB di dalam erlenmeyer selama 18-24 jam.
- Memindahkan bakteri sebanyak 4 ml ke dalam tabung reaksi.
- Menyediakan 4 tabung reaksi yang berisi masing-masing 5 ml TSB steril.
- Dilakukan pengenceran beseri dari tabung reaksi 1 sampai dengan 5 sebanyak 4 ml.
- Diukur kepadatan bakteri pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm.
- Dilakukan penanaman stok bakteri pada PCA untuk dihitung kepadatannya.
- Nilai hasil spektrofotometer dan kepadatan TPC dimasukkan pada grafik regresi (Lampiran 5).
- Didapat hasil kepadatan bakteri.

### g. Pembuatan Kandidat Vaksin Inaktif Formalin Bakteri *A. hydrophila*

Skema kerja pembuatan kandidat vaksin dapat dilihat pada Lampiran 3.

Adapun prosedur pembuatan kandidat vaksin sebagai berikut:

- Koloni bakteri dari media TSA dipindahkan ke dalam media TSB cair 10 ml dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 - 24 jam.
- Biakan bakteri disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit untuk membersihkan bakteri dari media.
- Supernatan yang terbentuk pada bagian atas dibuang, sedangkan pellet (endapan) ditambahkan formalin dengan 3 perlakuan yaitu A=2%, B=3%, dan C=4%, kemudian dihomogenkan dan diinkubasi selama 24 jam.
- Dilakukan uji viabilitas untuk mengetahui daya hidup bakteri dengan cara diinkubasi 18-24 jam.
- Apabila tidak terjadi pertumbuhan bakteri, maka pelarut formalin dibuang dengan cara disentrifugasi 3000 rpm 4°C selama 20 menit dan dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali untuk menghilangkan sisa formalin.
- Pellet yang terbentuk sebagai antigen H dilarutkan kembali dengan PBS dan disimpan pada refrigerator -70°C sampai digunakan kembali.

#### 3.3.2 Pelaksanaan Penelitian

##### a. Vaksinasi Ikan Lele (*Clarias sp.*)

Vaksinasi dilakukan mengacu pada penelitian Mulia *et al.* (2015), yaitu:

- Antigen *whole cell A. hydrophila* diinjeksikan pada lele dumbo berukuran panjang 7-9 cm.
- Setiap antigen disuntikkan secara intramuscular dengan dosis 0,1 ml/ekor.
- Masing-masing perlakuan antigen dan kontrol (PBS) disuntikkan pada 5 ekor ikan dengan 2 kali ulangan. *Booster* (vaksinasi ulang) dengan dosis yang sama dilakukan 7 hari berikutnya.

## b. Uji Aglutinasi

Uji aglutinasi digunakan untuk mengetahui potensi kandidat vaksin bakteri yang diinaktif dengan cara mengambil darah ikan lele (*Clarias sp.*) dengan prosedur sebagai berikut:

- Darah ikan diambil dengan spuit 1 ml dan dimasukkan ke *eppendorf*.
- Darah disentrifugasi untuk memisahkan antara serum dan sel darah merah, kemudian disimpan dalam refrigerator pada suhu 4°C selama 18-24 jam.
- Serum darah yang terbentuk pada lapisan atas diambil sebanyak 25 µl dan dimasukkan pada sumur ke 1 dan ke 2.
- PBS sebanyak 25 µl dimasukkan ke sumuran ke-2 sampai dengan sumur ke-12.
- Serial pengenceran dilakukan dengan cara mengambil 25 µl larutan dengan menggunakan mikropipet dari sumur ke-2 sampai ke-11.
- Sumur ke-1 sampai ke-12 ditambahkan 25 µl antigen *A. hydrophila*.
- Lempeng mikroplate ditutup kemudian digoyang-goyangkan secara perlahan selama 3 menit dengan gerakan memutar. Kemudian didiamkan pada suhu kamar selama 18-24 jam.
- Cara menghitung titer antibodi : 12 sumur pada mikrotiter plate diamati. Sumur paling kiri adalah kontrol positif, sedangkan sumur yang paling kanan adalah kontrol negatif. Terbentuknya titer antibodi ditandai dengan terjadinya aglutinasi antara antigen dengan antibodi yang tampak dari munculnya lapisan keruh seperti awan dalam sumur mikroplate, sedangkan pada sumur yang tidak terbentuk antibodi ditandai dengan dot pada dasar sumur yang menunjukkan adanya antigen yang mengendap (tidak terjadi aglutinasi).
- Perhitungan titer antibodi dimulai dari pengenceran pertama (1) sampai 10 (1/512) (dari sumur ke-2 sampai 11). Nilai titer antibodi merupakan kebalikan

dari seri pengenceran. Sebagai contoh apabila terjadi aglutinasi sampai sumur ke-6 (pengenceran 1/32), maka titer antibodi yang terbentuk adalah 32. Tujuan dilakukan pengenceran yaitu untuk mengetahui kemampuan antibodi spesifik mengikat antigen yang terlarut, sehingga diketahui kemampuan tersebut merupakan nilai titer antibodi.

### **3.4 Parameter Uji**

#### **3.4.1 Parameter Utama**

Parameter utama dalam penelitian ini yaitu pengamatan hasil titer antibodi yang terlihat pada hasil aglutinasi antara antigen dan antibodi spesifik.

#### **3.4.2 Parameter Penunjang**

Parameter penunjang pada penelitian ini yaitu kualitas air selama pemeliharaan yang meliputi suhu, DO dan pH. Kualitas air sangat mempengaruhi kondisi fisiologis ikan, sehingga harus selalu dalam kondisi normal. Kualitas air diukur dua kali sehari yaitu pada pagi pukul 08.00 WIB dan sore pukul 16.00 WIB.

### **3.5 Analisis Data**

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dilakukan pengujian statistik sesuai dengan metode yang digunakan yaitu rancangan acak lengkap (RAL). Pengujian data statistik (uji f) menggunakan selang kepercayaan 95%. Jika data sidik ragam memperlihatkan pengaruh berbeda nyata maka untuk membandingkan nilai antar perlakuan dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT). Uji polinomial orthogonal digunakan untuk mengetahui hubungan antara variabel bebas dan variabel ikat yang dilihat melalui grafik regresi. Analisis menggunakan RAL dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut:

#### **1. Menghitung JK**

$$\begin{aligned} \text{Faktor Koreksi} &= \frac{\text{Total}^2}{n \times r} \\ \text{Jumlah Kuadrat Total} &= \sum Y_{ij}^2 - \text{FK} \\ \text{JK Perlakuan} &= \frac{\sum(\text{Total Perlakuan})^2}{r} - \text{FK} \\ \text{JK Galat} &= \text{JKT} - \text{JKP} \\ \text{Derajat Bebas (db) Total} &= t * r - 1 \\ \text{Db Perlakuan} &= t - 1 \\ \text{Db Galat} &= \text{db Total} - \text{db Acak} \end{aligned}$$

**2. Analisa Sidik Ragam**

SK	Db	JK	KT	Fhit	Ftab 0,05	Ftab 0,01
Perlakuan	t - 1	JKP	JKP/(t-1)	KTP/KTG	Tabel	Tabel
Galat	(rt-t)	JKG	JKG/(rt-t)			
Total	rt - 1					

**3. Kesimpulan**

- $F_{hit} > F_{tabel 1\%}$  = berbeda sangat nyata
- $F_{hit} > F_{tabel 5\%}$  = berbeda nyata
- $F_{hit} < F_{tabel 5\%}$  = tidak berbeda sangat nyata

**4. Menentukan Varietas yang Paling Potensial**

Apabila  $F_{hit} > F_{tabel 5\%}$  atau  $F_{tabel 1\%}$  dilakukan uji lanjut yaitu uji BNT untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.

$$\text{BNT} = t \text{ db galat} \times \sqrt{\frac{2 \times \text{KTG}}{r}}$$

**5. Uji Polinomial Orthogonal**

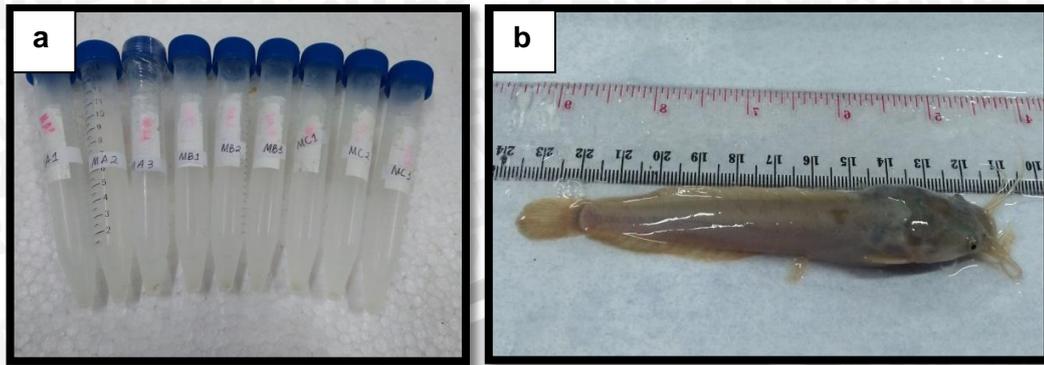
Uji polinomial orthogonal digunakan untuk mengetahui hubungan antara variable bebas dan variable ikat dengan grafik regresi.

## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Hasil Pembuatan Kandidat Vaksin *A. hydrophila*

Kandidat vaksin inaktif formalin *A. hydrophila* dibuat dari hasil kultur bakteri pada media TSB dengan kepadatan  $10^{18}$  cfu/ml. Kepadatan bakteri diperoleh dengan metode spektrofotometer panjang gelombang 600 nm (Putri *et al.*, 2013). Perhitungan kepadatan dapat dilihat pada Lampiran 5. Formalin yang digunakan untuk menginaktif bakteri, dicuci dengan PBS sampai bau dari formalin hilang untuk meminimalisir akumulasi formalin saat masuk ke dalam tubuh ikan. Cara kerja formalin dalam menginaktif bakteri yaitu dengan mendehidrasikan sel bakteri dan mengganti cairan dalam sel dengan komponen yang menyerupai gel (Purwaningsih, 2013). Penambahan formalin menyebabkan protoplasma menjadi kehilangan kelembaban sehingga sel pecah. Jenis kandidat vaksin yang dihasilkan dengan metode *formalin-killed* disebut vaksin inaktif sel utuh (antigen H). Keuntungan dari penggunaan vaksin utuh yaitu bersifat imunogenik dan merangsang respon imun secara alami. Sedangkan keterbatasan organisme utuh yaitu mempunyai campuran kompleks dari protein, lipid dan karbohidrat yang dapat mempersulit proses produksi, karakterisasi, dan kontrol kualitas vaksin.

Kandidat vaksin dapat digunakan setelah dilakukan uji viabilitas. Uji viabilitas menghasilkan pertumbuhan bakteri 0 koloni pada setiap konsentrasi. Menurut Alifuddin (2002), sebagai tindakan pengamanan sebelum digunakan, perlu dilakukan uji viabilitas vaksin. Vaksin aman digunakan apabila pada media kultur tidak terjadi pertumbuhan bakteri. Hasil pembuatan kandidat vaksin terlihat berwarna seperti pada Gambar 4 di bawah ini. Kandidat vaksin yang sudah jadi siap dipakai langsung maupun disimpan di suhu  $-70^{\circ}\text{C}$  sampai saat digunakan.



**Gambar 4. a.** Vaksin inaktif *A. hydrophila formalin-killed*. **b.** Ikan lele (*Clarias sp.*) setelah vaksinasi.

#### 4.2 Vaksinasi

Vaksinasi merupakan salah satu cara yang efektif dan efisien untuk mengatasi penyakit MAS pada ikan lele (*Clarias sp.*). Vaksinasi pada penelitian ini dilakukan melalui injeksi pada intramuskular. Vaksinasi melalui injeksi ini diharapkan agar semua vaksin dapat masuk ke dalam tubuh ikan dan dapat bekerja secara efektif dan efisien. Antigen yang digunakan dalam penelitian berasal dari *A. hydrophila* yang diinaktif dengan formalin. Antigen yang diinaktif dengan formalin disebut sebagai antigen H. Penggunaan antigen H dapat meningkatkan sistem imun berupa antibodi dibandingkan ikan kontrol yang tidak divaksinasi.

Vaksinasi dilakukan untuk meningkatkan antibodi spesifik sebagai respon imun. Pembentukan antibodi dirangsang oleh epitop, sedangkan epitop sendiri dihasilkan oleh hapten. Hapten merupakan determinan antigen dengan berat molekul yang lebih kecil. Hapten akan menjadi imunogen apabila diikat oleh molekul yang lebih besar (*carrier*). Imunogen inilah yang dapat merangsang sistem imun dengan sangat kuat terutama dalam proses imunisasi untuk proteksi terhadap organisme patogen (Baratawidjaja, 2002). Antibodi yang terbentuk sebagai hasil dari vaksinasi digolongkan dalam protein yang disebut globulin (imunoglobulin). Imunoglobulin dibentuk oleh sel plasma yang berasal dari

proliferasi sel B sebagai akibat kontak dengan antigen. Antibodi ini akan mengikat antigen baru yang sejenis, sehingga terjadi peningkatan antibodi.

Penggunaan dosis vaksin dilakukan mengacu pada penelitian Mulia *et al.* (2004), yaitu vaksin disuntikkan ke dalam tubuh ikan dengan dosis 0,1 ml/ekor ikan yang ukumannya 10-13 cm. Vaksinasi pada penelitian ini dilakukan sebanyak dua kali, yaitu vaksinasi pertama dan vaksinasi ulang (*booster*). Setelah dilakukan vaksinasi, ikan dipelihara selama 1 minggu. Ikan yang sudah divaksinasi memiliki perbedaan tingkah laku dengan ikan yang tidak divaksin. Setelah divaksin, ikan berenang lebih cepat dan bergerak lebih agresif. Terjadi pembengkakan pada bagian tubuh ikan yang disuntik sesaat setelah injeksi. Namun bengkak tersebut hilang setelah dua hari. Vaksinasi kedua dilakukan 1 minggu setelah vaksinasi pertama. Tujuan dilakukan vaksinasi kedua yaitu untuk meningkatkan respon imun ikan melalui meningkatnya antibodi (*booster*). Selama proses vaksinasi hanya terdapat 1 ikan yang mati pada perlakuan A2 dan 1 ikan pada perlakuan C3. Ikan tersebut mati pada hari kedua setelah vaksinasi pertama. Kematian ikan diduga diakibatkan oleh kesalahan teknik saat injeksi, hal ini karena terdapat luka dan pembusukan pada bagian tubuh bekas injeksi.

Vaksin yang diinjeksikan ke dalam tubuh ikan akan masuk ke ginjal bagian depan dan dapat menghasilkan respon imun. Vaksin yang telah masuk dalam ginjal akan difagosit oleh makrofag dan neutrofil kemudian dibawa ke timus yang mengandung sel T. Sel T akan merespon antigen tersebut ke reseptor khusus. Antigen tersebut akan dibawa menuju limfa dan terjadi pelepasan sitokin membentuk sel B. Sebagian dari sel B akan melakukan proliferasi, sedangkan sebagian lagi akan berdeferensiasi menjadi sel plasma dan sel B memori sebagai sistem kekebalan humoral (Putri *et al.*, 2013). Antibodi akan terbentuk apabila sel penghasil antibodi (sel B) telah berfungsi dengan baik.

### 4.3 Uji Aglutinasi

Interaksi antara antigen dan antibodi dapat menimbulkan berbagai akibat, salah satunya yaitu aglutinasi. Hasil uji aglutinasi digunakan untuk mengetahui kemampuan vaksin dalam meningkatkan titer antibodi ikan lele (*Clarias sp.*). Aglutinasi terjadi ditandai dengan terbentuknya gumpalan berbentuk awan pada mikropate. Gumpalan terbentuk karena adanya ikatan antara antigen dan antibodi spesifik pada serum darah. Antigen dan antibodi dapat berikatan karena pada antibodi terdapat reseptor, sedangkan pada antigen terdapat epitop. Keduanya dapat berikatan karena dipengaruhi oleh gaya hidrofobik, ionik, dan hidrogen (Suryani, 2015). Interaksi antigen dan antibodi pada mikropate aglutinasi dapat dilihat pada Lampiran 7.

Uji aglutinasi yang dilakukan terhadap antibodi ikan lele (*Clarias sp.*) menjelaskan terjadi peningkatan titer antibodi selama pemeliharaan. Titer antibodi ikan lele (*Clarias sp.*) sebelum dilakukan vaksinasi (minggu ke-1) tidak dapat dihitung karena tidak terjadi aglutinasi pada sampel serum darah ikan lele (*Clarias sp.*). Aglutinasi tidak terbentuk pada semua perlakuan sehingga nilai titer antibodi 0. Hal ini karena tidak terbentuknya antibodi spesifik pada sampel darah yang diambil. Titer antibodi mencerminkan kemampuan pertahanan tubuh ikan terhadap infeksi bakteri melalui respon imun spesifik. Semakin tinggi nilai titer antibodi, maka diharapkan kemampuan perlindungan terhadap infeksi juga semakin tinggi. Antibodi yang beredar dalam darah akan menetralkan molekul toksik yang diproduksi oleh bakteri (Purwaningsih, 2013). Hasil uji aglutinasi yang terjadi pada sampel minggu 1 dapat dilihat pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Hasil uji aglutinasi serum darah ikan lele (*Clarias s.*) sebelum vaksinasi (minggu I)

Perlaku-an	Pengenceran ke-									
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
K1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan: - = tidak terjadi reaksi aglutinasi antara antigen dan antibodi spesifik.

Peningkatan titer antibodi lele terjadi secara signifikan melalui metode injeksi pada intramuskular (Mulia *et al.*, 2013). Antibodi spesifik dapat terbentuk 1 minggu setelah vaksinasi. Peningkatan titer antibodi setelah 1 minggu dapat dilihat dengan terjadi aglutinasi antara antibodi spesifik dan antigennya melalui uji aglutinasi seperti yang dapat dilihat pada Tabel 4 berikut:

**Tabel 4.** Hasil uji aglutinasi serum darah ikan lele (*Clarias s.*) 1 minggu setelah vaksinasi (minggu II)

Perlaku-an	Pengenceran ke-									
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
K1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
A2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
A3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
B1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
B2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
B3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
C1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
C2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
C3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Keterangan: - = tidak terjadi reaksi aglutinasi antara antigen dan antibodi spesifik, + = terjadi aglutinasi antara antigen dan antibodi spesifik.

Berdasarkan tabel di atas, nilai titer antibodi ikan lele (*Clarias sp.*) setelah 1 minggu vaksinasi mengalami peningkatan dari sebelum dilakukan vaksinasi. Titer antibodi merupakan kebalikan dari nilai pengenceran pada sumuran terakhir

terjadinya aglutinasi. Adapun hasil perhitungan rerata titer antibodi yang dihasilkan setelah 1 minggu vaksinasi tersaji dalam Tabel 5 berikut:

**Tabel 5.** Rerata titer antibodi setelah 1 minggu vaksinasi.

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata $\pm$ SD
	1	2	3		
A	8	8	8	24	8
B	16	8	16	40	13,333 $\pm$ 4,619
C	32	16	32	80	16,667 $\pm$ 9,238
<b>Total</b>				144	

Nilai rerata produksi titer antibodi ikan lele (*Clarias* sp.) setelah 1 minggu vaksinasi terendah terdapat pada perlakuan A (formalin 2%) yaitu sebesar 8, kemudian diikuti dengan perlakuan B (formalin 3%) dan C (formalin 4%) berturut-turut sebesar 13,333 dan 16,667. Selanjutnya untuk mengetahui pengaruh pemberian vaksin inaktif *A. hydrophila* yang diinaktif dengan konsentrasi formalin yang berbeda terhadap produksi titer antibodi, maka dilakukan uji sidik ragam pada Tabel 6 berikut:

**Tabel 6.** Sidik ragam produksi titer antibodi ikan lele (*Clarias* sp.) setelah 1 minggu vaksinasi

SK	Db	JK	KT	Fhit	Ftab 5%	Ftab 1%
Perlakuan	2	554,667	277,333		5,14	10,92
Galat	6	213,333	35,556	7,8*		
<b>Total</b>	8					

Keterangan : \* = Berbeda nyata

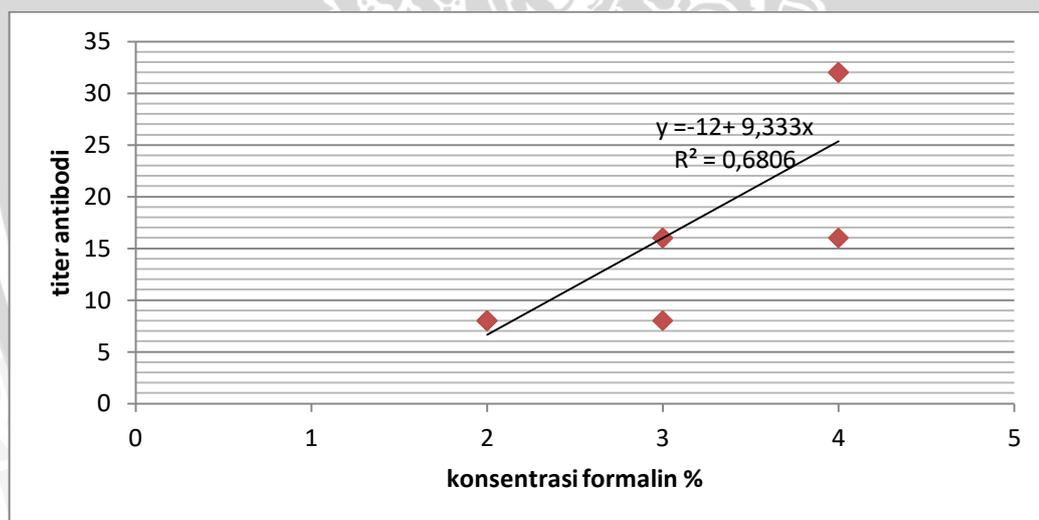
Tabel analisa sidik ragam di atas menunjukkan bahwa nilai  $F_{5\%} < F_{hitung}$ , yaitu sebesar 7,8, sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian kandidat vaksin inaktif *A. hydrophila* yang diinaktif dengan konsentrasi formalin yang berbeda memberikan pengaruh berbeda nyata terhadap produksi titer antibodi ikan lele (*Clarias* sp.) setelah 1 minggu vaksinasi. Perhitungan lengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 8. Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan, maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) seperti pada Tabel 7 berikut:

**Tabel 7.** Uji BNT produksi titer antibodi ikan lele (*Clarias* sp.) setelah 1 minggu vaksinasi

Perlakuan				Notasi
	A	B	C	
	8	13,333	26,667	
A	8	-	-	a
B	13,333	5,333 <sup>ns</sup>	-	a
C	26,667	24 <sup>**</sup>	18,667 <sup>**</sup>	b

Keterangan : ns = tidak berbeda nyata, \*\* = berbeda sangat nyata

Berdasarkan Tabel 7 di atas dapat terlihat perbedaan rerata produksi titer antibodi dengan notasi a, a, dan b. Hal tersebut dapat diartikan bahwa perlakuan C berbeda sangat nyata dengan B dan A, akan tetapi B tidak berbeda nyata dengan A. Selanjutnya untuk mengetahui regresi pemberian kandidat vaksin A. *hydrophila* yang diinaktif dengan konsentrasi formalin berbeda dilakukan uji polynomial orthogonal (Gambar 5).



**Gambar 5.** Grafik hubungan pengaruh konsentrasi formalin berbeda dalam menghasilkan antigen H A. *hydrophila* terhadap nilai titer antibodi ikan lele (*Clarias* sp.)

Grafik linear hubungan pengaruh konsentrasi formalin dalam menghasilkan antigen H A. *hydrophila* terhadap nilai titer antibodi lele (*Clarias* sp.) di atas didapatkan persamaan linear  $y = -12 + 9,333x$  yang memiliki nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 0,68. Junaidi (2014) menyatakan bahwa R



*square* ( $R^2$ ) sering disebut dengan koefisien determinasi, adalah mengukur kebalikan dari persamaan regresi; yaitu memberikan proporsi atau persentase variasi total dalam variabel terikat yang dijelaskan oleh variabel bebas, sedangkan persamaan regresi merupakan kekuatan yang menjelaskan kekuatan antara variabel ikat dan bebas. Nilai  $R^2$  dikatakan lebih baik jika semakin mendekati 1. Nilai koefisien determinasi 0,68 menunjukkan bahwa penggunaan formalin dengan konsentrasi berbeda dalam menghasilkan antigen H A. *hydrophila* memberikan pengaruh sebesar 68% terhadap jumlah antibodi yang dihasilkan setelah uji *in vivo*. Perhitungan yang lebih lengkap dapat dilihat pada Lampiran 8.

Titer antibodi pada ikan yang tidak divaksinasi (kontrol) tidak terjadi peningkatan dikarenakan antigen tidak dapat berikatan dengan serum ikan kontrol. Serum ikan yang tidak divaksinasi diduga tidak terdapat antibodi spesifik karena belum ada rangsangan oleh antigen sejenis, sehingga antigen yang ditetaskan ke dalam serum tidak mampu mengikat molekul yang terdapat pada serum tersebut. Berdasarkan pengamatan terhadap sumuran aglutinasi, tidak terjadi penggumpalan pada perlakuan kontrol, namun antigen mengendap di dasar sumur mikrolate dan membentuk titik (Lampiran 7).

Kemampuan antigen untuk menghasilkan antibodi spesifik akan semakin terlihat setelah dilakukan vaksinasi ulang (*booster*). Peningkatan antibodi pada ikan yang divaksin mengindikasikan adanya pengaktifan respon imun spesifik terhadap antigen (Setyawan, *et al.*, 2007). Vaksinasi ulang pada penelitian ini dilakukan 1 minggu setelah vaksinasi pertama. Vaksinasi booster dilakukan selama 1 minggu, setelah 1 minggu dilakukan uji aglutinasi untuk mengetahui titer antibodi yang dihasilkan. Hasil aglutinasi menunjukkan bahwa vaksinasi ulang memberikan peningkatan titer antibodi seperti yang terlihat pada Tabel 8.

**Tabel 8.** Hasil uji aglutinasi serum darah ikan lele (*Clarias sp.*) 1 minggu setelah vaksinasi (minggu II)

Perlaku-an	Pengenceran ke-									
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
K1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
A2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
A3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
B1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
B2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
B3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
C1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
C2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
C3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Keterangan: - = tidak terjadi reaksi aglutinasi antara antigen dan antibodi spesifik,  
 + = terjadi aglutinasi antara antigen dan antibodi spesifik.

Berdasarkan tabel di atas, nilai titer antibodi ikan lele setelah vaksinasi ulang (*booster*) selama 1 minggu mengalami peningkatan dari sebelum dilakukan vaksinasi dan vaksinasi satu minggu pertama. Setyawan *et al.*, (2007), dalam penelitian menyebutkan bahwa titer antibodi ikan mas (*Clarias sp.*) meningkat dari vaksinasi suntik minggu pertama 58,67 meningkat menjadi 85,33 setelah vaksinasi kedua. Adapun rerata produksi titer antibodi ikan lele (*Clarias sp.*) setelah vaksinasi ulang tersaji pada Tabel 9 berikut:

**Tabel 9.** Rerata Produksi titer antibodi ikan lele (*Clarias sp.*) setelah vaksinasi ulang (*booster*)

Perlakuan	Ulangan			Total	Rearat ± SD
	1	2	3		
A	16	16	16	48	16
B	32	16	32	80	27 ± 9,238
C	128	128	128	384	128
<b>Total</b>				512	

Pemberian ulang vaksin inaktif dengan konsentrasi yang berbeda mampu meningkatkan produksi titer antibodi ikan lele (*Clarias sp.*). Nilai rerata produksi titer antibodi ikan lele (*Clarias sp.*) setelah vaksinasi ulang terendah terdapat pada perlakuan A (formalin 2%) yaitu sebesar 16, kemudian diikuti dengan perlakuan B (formalin 3%) dan C (formalin 4%) berturut-turut sebesar 27 dan 128. Selanjutnya untuk mengetahui pengaruh pemberian vaksin inaktif A.

*hydrophila* yang diinaktif dengan konsentrasi formalin yang berbeda terhadap produksi titer antibodi, maka dilakukan uji sidik ragam pada Tabel 10 berikut:

**Tabel 10.** Sidik ragam produksititer antibodi ikan lele (*Clarias* sp.) setelah vaksinasi ulang (*booster*)

SK	Db	JK	KT	Fhit	F tab 0,05	F tab 0,01
Perlakuan	2	22926,22	11463,11	403**	5,14	10,92
Galat	6	170,667	28,444			
Total	8					

Keterangan: \*\* = Berbeda sangat nyata

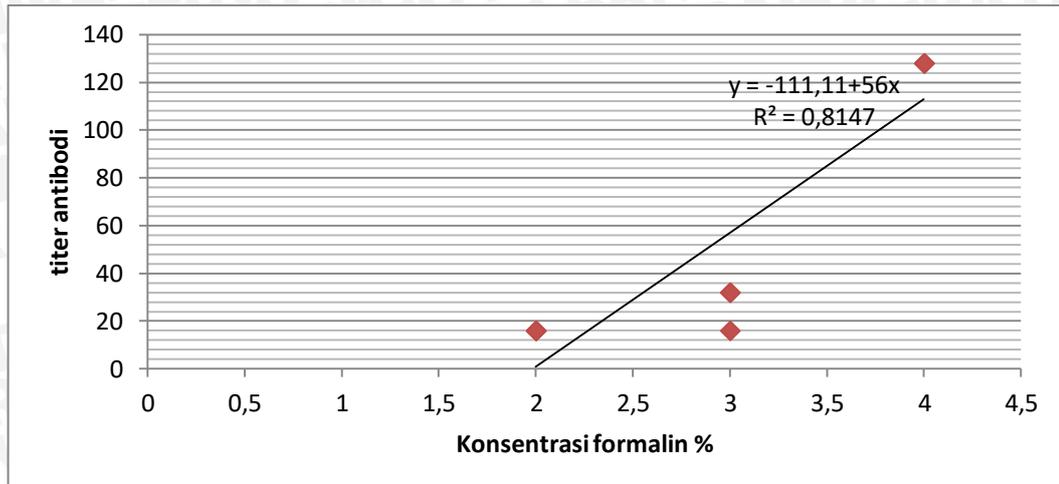
Tabel analisa sidik ragam di atas menunjukkan bahwa nilai F hitung > F 5% dan F 1% yaitu sebesar 403, sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian kandidat vaksin inaktif A. *hydrophila* yang diinaktif dengan konsentrasi formalin yang berbeda memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap produksi titer antibodi ikan lele (*Clarias* sp.) setelah vaksinasi ulang. Perhitungan lengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 8. Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan, maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) seperti pada Tabel 11 berikut:

**Tabel 11.** Uji BNT produksi titer antibodi ikan lele (*Clarias* sp.) setelah vaksinasi ulang (*booster*)

Perlakuan		A	B	C	Notasi
		16	27	128	
A	16	-	-	-	a
B	27	10,667*	-	-	b
C	128	112**	101,333**	-	c

Keterangan: \* = Berbeda nyata, \*\* = Berbeda sangat nyata

Berdasarkan tabel 11 di atas dapat terlihat perbedaan rerata produksi titer antibodi dengan notasi a, b, dan c. Hal tersebut dapat diartikan bahwa perlakuan C berbeda sangat nyata dengan B dan A, serta B berbeda nyata dengan A. Selanjutnya untuk mengetahui regresi pemberian kandidat vaksin A. *hydrophila* yang diinaktif dengan konsentrasi formalin berbeda dilakukan uji polynomial orthogonal (Gambar 6).



**Gambar 6.** Hubungan pengaruh formalin dengan konsentrasi berbeda dalam menghasilkan antigen H A. *hydrophila* terhadap nilai titer antibodi ikan lele (*Clarias* sp.) setelah booster.

Grafik linear hubungan pengaruh konsentrasi formalin dalam menghasilkan antigen H A. *hydrophila* terhadap nilai titer antibodi lele (*Clarias* sp.) di atas didapatkan persamaan linear  $y = -111,11 + 56x$  yang memiliki nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 0,8147. Nilai koefisien determinasi ini menunjukkan bahwa penggunaan formalin dengan konsentrasi berbeda dalam menghasilkan antigen H A. *hydrophila* memberikan pengaruh sebesar 81,47% terhadap jumlah antibodi yang dihasilkan setelah uji *in vivo*. Perhitungan yang lebih lengkap dapat dilihat pada Lampiran 8.

Menurut IPCS (*International Programme on Chemical Safety*) lembaga khusus dari tiga organisasi di PBB, yaitu ILO, UNEP, serta WHO, dalam Hastuti (2010), yang mengkhususkan pada keselamatan penggunaan bahan kimiawi, secara umum ambang batas aman formalin di dalam tubuh adalah 1 miligram per liter. Sementara formalin yang boleh masuk ke tubuh dalam bentuk makanan untuk orang dewasa adalah 1,5-14 mg per hari. Bila formalin masuk ke tubuh melebihi ambang batas tersebut maka dapat mengakibatkan gangguan pada organ dan sistem tubuh manusia. Akibat yang ditimbulkan tersebut dapat terjadi

dalam waktu singkat atau jangka pendek dan dalam jangka panjang, bisa melalui hirupan, kontak langsung atau tertelan.

Formalin yang digunakan untuk menginaktif bakteri dalam pembuatan vaksin dicuci terlebih dahulu menggunakan PBS sampai aroma dari formalin sudah tidak tercium. Apabila semakin banyak formalin yang dipaparkan ke tubuh ikan terutama ikan konsumsi, maka dapat merusak jaringan dan sel ikan bahkan dapat merusak sel manusia yang mengkonsumsinya. Berdasarkan penelitian yang dikemukakan oleh Taukhid *et al.* (2014), evaluasi keamanan vaksin (*vaccine safety*) didasarkan pada jumlah kematian pasca vaksinasi. Evaluasi ini dihitung berdasarkan jumlah kematian yang terjadi secara akut selama 2 x 24 jam pada kelompok ikan yang divaksin dan dibandingkan dengan kelompok ikan kontrol.

#### 4.3 Kualitas Air

Efektifitas vaksinasi ikan dipengaruhi oleh beberapa faktor yang salah satunya adalah kualitas air. Kualitas air dapat mempengaruhi fisiologi ikan dalam hubungannya dengan pembentukan antibodi (Sari, *et al.*, 2013). Perairan merupakan tempat hidup ikan dan merupakan aspek terpenting yang perlu diamati dalam melakukan budidaya. Air sebagai media hidup organisme harus mempunyai daya dukung kehidupan dan pertumbuhan bagi organisme yang hidup di dalamnya (Lesmanawati, 2006). Parameter yang perlu diamati adalah parameter fisika dan parameter kimia. Parameter fisika adalah parameter yang digunakan untuk mengukur kadar kualitas air yang berhubungan dengan fisika seperti suhu, kecepatan arus, kecerahan dan tinggi air. Pada penelitian ini salah satu parameter fisika perairan yang diamati adalah suhu. Suhu berperan penting bagi kehidupan organisme karena dapat mempengaruhi metabolisme. Parameter kimia adalah parameter yang digunakan untuk mengukur kadar kualitas air yang

berhubungan dengan kimia dan sangat penting untuk menentukan air tersebut dikatakan baik atau tidak dalam budidaya ikan. Parameter kimia yang diamati meliputi pH dan oksigen terlarut.

#### 4.2.1 Suhu

Pengukuran suhu selama penelitian dilakukan setiap 2 kali sehari, yaitu pagi pada pukul 08.00 WIB dan sore pada pukul 16.00 WIB. Suhu air pemeliharaan ikan selama penelitian berkisar antara 23-27°C. Data lengkap suhu air media selama penelitian dapat dilihat pada Lampiran 9. Perubahan naik turunnya suhu air media sangat dipengaruhi oleh kondisi cuaca selama penelitian. Namun, kondisi suhu selama penelitian masih dianggap dalam kategori optimal untuk kehidupan ikan lele. Menurut Mulia dan Purbamartono (2007), lele sangat toleran terhadap perubahan suhu air yang cukup tinggi. Ikan lele masih dapat tumbuh pada rentang suhu 20-35°C.

#### 4.2.2 Derajat Keasaman (pH)

pH air sebagai media hidup ikan juga diukur setiap 2 kali sehari, yaitu pada pagi dan sore hari. Pengukuran dilakukan untuk mengetahui tingkat asam atau basa suatu perairan, karena pH sangat penting untuk mengontrol tipe dan laju reaksi beberapa bahan di dalam air (Mambrasar *et al.*, 2015). pH yang rendah dapat menyebabkan turunnya laju pertumbuhan, dan yang tinggi akan meningkatkan amoniak yang secara tidak langsung membahayakan.

Hasil pengukuran pH yang didapatkan selama penelitian berkisar antara 8,00-8,54. Nilai pH untuk setiap hari selama penelitian dapat dilihat pada Lampiran 9. Nilai pH selama penelitian masih dikatakan dalam kondisi normal berdasarkan pendapat Hermawan *et al.* (2014), yang menyatakan bahwa derajat keasaman air media hidup ikan lele optimal pada kisaran 6,5-9. Derajat kesaman tertinggi terdapat pada perlakuan C1 hari ke 5 minggu ke-2 yaitu sebesar 8,89,

sedangkan terendah pada perlakuan A2 hari ke 4 minggu ke-3 yaitu sebesar 8,07.

#### 4.3.3 DO (*Disolved Oksigen*)

Penurunan kualitas air dapat mempengaruhi kelangsungan hidup ikan. Menurut Fadli dan Bahri (2012), batas minimum kadar oksigen terlarut yang bisa mematikan benih ikan lele adalah 1,24 mg/l. Adanya pemberian aerasi sangat membantu dalam memenuhi kebutuhan oksigen terlarut dalam pemeliharaan benih lele. Tinggi rendahnya kandungan oksigen terlarut sangat dipengaruhi oleh jumlah buangan metabolisme oleh ikan. Semakin tinggi limbah yang dihasilkan, maka kandungan oksigen akan semakin menurun diakibatkan oleh oksigen lebih banyak digunakan bakteri untuk dekomposisi bahan organik.

Hasil pengukuran oksigen terlarut selama penelitian berkisar antara 4,78-6,61 mg/L. Data lengkap pengukuran oksigen terlarut dapat dilihat pada Lampiran 9. Selama penelitian kandungan oksigen terlarut pada air media hidup ikan masih tergolong dalam kategori normal berdasarkan pendapat Stickney (2005), yang menyatakan bahwa konsentrasi oksigen yang baik untuk ikan lele tidak boleh kurang dari 3 mg/l.

## 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa kandidat vaksin inaktif *formalin-killed A. hydrophila* berpotensi meningkatkan titer antibodi ikan lele (*Clarias sp.*) dan memberikan pengaruh berbeda sangat nyata setelah uji aglutinasi. Titer antibodi tertinggi terdapat pada perlakuan C = 4%, yaitu menghasilkan rata-rata titer antibodi dari 16,667 pada minggu pertama meningkat menjadi 128 setelah vaksinasi ulang.

### 5.2 Saran

Saran yang diberikan pada penelitian ini yaitu:

- Dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui konsentrasi formalin yang optimum dalam menginaktif *A. hydrophila*, sehingga didapatkan titer antibodi yang optimal.
- Dilakukan uji residu formalin terhadap vaksin sebelum digunakan agar tidak berbahaya.
- Dilakukan uji SEM untuk mengetahui struktur dari antigen yang diinginkan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alifuddin, M. 2002. Imunostimulan pada hewan akuatik. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. **1**(2): 87-92.
- Ashari, C., R. A. Tumbol dan M. E. F. Kolopita. 2014. Diagnosa penyakit bakterial pada ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) yang dibudidaya pada jaring tancap di Danau Tondano. *Budidaya Perairan*. **2** (3): 24–30.
- Baratawidjaja, K.G. 2002. Immunologi. Balai Penerbit FKUI. Jakarta. 457 hlm.
- Cahyono, B. 2000. Budidaya Air Tawar. Kanisius. Jakarta. 54 hlm.
- Darseno. 2010. Buku Pintar Budi Daya dan Bisnis Lele. Agromedia Pustaka. Jakarta. 120 hlm.
- Effendie, I. M. 1997. Biologi Perikanan. Yayasan Pustaka Nusantara. 163 hlm.
- Fadli, A dan A. S. Bahri. 2012. Pengaruh padat penebaran benih lele dumbo (*Clarias gariepinus*) terhadap *Survival Rate* (SR), pertumbuhan berat badan harian, dan pertumbuhan panjang mutlak. *Sakamia*. **3**(2): 17-20.
- Hanafiah, K. A.. 2013. Rancangan Percobaan: Teori dan Aplikasi Edisi 3. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta. 259 hlm.
- Hardi, E. H., C. A. Pebrianto, T. Hidayanti dan R. T. Handayani. 2014. Infeksi *Aeromonas hydrophila* melalui jalur yang berbeda pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) di Loa Kulu Kutai Kartanegara Kalimantan Timur. *Jurnal Kedokteran Hewan*. **8** (2): 130-133.
- Haryani, A., R. Grandiosa, I. D. Buwono dan A. Santika. 2012. Uji efektivitas daun pepaya (*Carica papaya*) untuk pengobatan infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan mas koki (*Carassius auratus*). *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. **3** (3): 213-220.
- Hastuti, S. 2010. Analisis kualitatif dan kuantitatif formaldehid pada ikan asin di Madura. *Agrointek*. **4**(2): 132-137.
- Hendriana, A. 2010. Pembesaran Lele di Kolam Terpal. Penebar Swadaya. Jakarta. 82 hlm.
- Hermawan, T. E. S. A., A. Sudaryono dan S. B. Prayitno. 2014. Pengaruh padat tebar berbeda terhadap pertumbuhan dan kelulushidupan benih lele (*Clarias gariepinus*) dalam media bioflok. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. **3** (3): 35-42.
- Herupradoto, B, G. A. Yuliani. 2010. Karakterisasi Protein Spesifik *Aeromonas hydrophila* Penyebab Penyakit Ulser pada Ikan Mas. *Jurnal Veteriner*. **11** (3) : 158-162.

- Jaedun, A. 2011. Metodologi Penelitian Eksperimen. Artikel. Fakultas Teknik UNY. Yogyakarta. 120 hlm.
- Junaidi, C. 2014. Memahami Output Regresi dari Excel. <http://Junaidichainogo.wordpress.com>.
- Kordi, M.G.H. 2010. Budi Daya Ikan Lele. Andi Offset. Yogyakarta. 114 hlm.
- Lesmanawati, W. 2006. Potensi Mahkota Dewa *Phaleria macropora* Sebagai Antibakteri dan Imunostimulan pada Ikan Patin *Pangasianodon hypophthalmus* yang Diinfeksi dengan *Aeromonas hydrophila*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Lukistyowati, I dan Kurniasih. 2012. Pelacakan gen aerolysin dari *Aeromonas hydrophila* pada ikan mas yang diberi pakan ekstrak bawang putih. *Jurnal Veteriner*. **13**(1): 43-50.
- Mambrasar, P., R. Monijung, O. Kalesaran dan J. C. Watung. 2015. Sintasan dan pertumbuhan larva ikan lele (*Clarias* sp.) hasil penetasan telur melalui penambahan madu dalam pengenceran sperma. *Jurnal Budidaya Perairan*. **3**(1) : 101-107.
- Mantau, Z dan Sudarty. 2011. Buku Terlengkap Pembenihan Ikan Mas yang Efektif dan Efisien. Pustaka Mina. Jakarta. 63 hlm.
- Mulia, D. S. 2007. Keektivan vaksin *Aeromonas hydrophila* untuk mengendalikan penyakit MAS (*Motile Aeromonas Septicemia*) pada gurami (*Osphronemus gouramy*). *Jurnal Pembangunan Pedesaan*. **7**(1): 43-52.
- Mulia, D. S. dan C. Purbomartono. 2007. Perbandinga efikasi vaksin produk intra dan ekstraseluler *Aeromonas hydrophila* untuk menanggulangi penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) pada lele dumbo (*Claris* sp.). *Jurnal Perikanan*. **9**(2): 173-181.
- Mulia, D. S., S. Wahyuningsih, H. Maryanto dan C. Purbamartono. 2015. Uji lapang pakan bervaksin *Aeromonas hydrophila* pada lele dumbo di daerah Cilacap. *Techno*. **16**(2): 85-97.
- Mulyani, Y., B. Eri, dan K. A. Untung. 2013. Peranan senyawa metabolit sekunder tumbuhan mangrove terhadap infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.). *Jurnal Akuatika* **4**: 1-10.
- Olga, R. K. Rini, J. Akbar, A. Isnansetyo dan L. Sembiring. 2007. Protein *Aeromonas hydrophila* sebagai vaksin untuk pengendalian MAS (*Motile Aeromonas Septicemia*) pada jamal siam (*Pangasius hypophthalmus*). *Jurnal Perikanan*. **9** (1): 12-25.
- Pasaribu, W., S. N. J. Longdong dan J. D. Mudeng. 2015. Efektivitas ekstrak daun Pacar Air (*Impatiens balsamina* L.) untuk meningkatkan respon imun non spesifik ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Budidaya Perairan*. **3** (1): 83-92.

- Purwaningsih, U. 2013. Vaksin koktail sel utuh untuk pencegahan penyakit Mycoacteriosis dan *Motile Aeromonas Septicemia* pada ikan gurame (*Osphronemus gouramy*). Tesis. IPB:Bogor.
- Putri, R. A., Wardiyanto dan A. Setyawan. 2013. Penyimpanan vaksin inaktif *whole cell* dengan penambahan gliserol. *Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan*. 1(2): 79-86.
- Roza, D., P. Johnny dan Zafran. 2010. Pengembangan vaksin bakteri untuk meningkatkan imunitas ikan kerapu macan, *Epinepgelus fuscoguttatus* terhadap penyakit infeksi. *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur*. 939-944.
- Salmin. 2005. Oksigen Terlarut (DO) dan Kebutuhan Oksigen Biologi (BOD) Sebagai Salah Satu Indikator Untuk Menentukan Kualitas Air. *Oseana*. 30(2): 21-26.
- Sari, R. H., A. Setyawan dan Suparmono. 2013. Peningkatan imunogenisitas vaksin inaktif *Aeromonas salmonicida* dengan penambahan adjuvant pada ikan mas (*Cyprinus carpio*). *Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan*. 1(2): 87-94.
- Setiawan, R. B., D. Iriana dan Rosidah. 2012. Efektivitas vaksin dari bakteri *Mycobacterium fortuitum* yang diinfeksi dengan pemanasan untuk pencegahan penyakit mycobacteriosis pada ikan gurami (*Osphronemus gouramy*). *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. 3(1): 25-40.
- Setyawan, A., S. Hudaidah, Z. Z. Ronapati dan Sumino. 2007. Imunogenitas vaksin inaktif *whole cell Aeromonas salmonicida* pada ikan mas (*Cyprinus carpio*). *Jurnal Ilmu Perikanan dan Sumberaya Perairan*. 17-21.
- Simatupang, N dan D. Anggraini. 2013. Potensi tanaman hebal sebagai antimikrobal pada ikan lele Sangkuriang (*Clarias sp.*). *Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia*. 1(2): 216-225.
- Stickney, R. R. 2005. *Aquaculture: An Introductory Text*. Oxford: CABI Publishing, 265 p.
- Sugiani, D. 2012. Vaksin Bivalen untuk Pencegahan Penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* dan *Streptococcosis* pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Disertasi*. IPB: Bogor.
- Suryani, L. 2015. Deteksi titer antibodi dan identifikasi faktor penyebab kegagalan vaksinasi terhadap *newcastle disease* pada ayam petelur di Desa Bulu Kabupaten Sidenreng, Rappang. *Skripsi*. Universitas Hasanudiin. Makassar.
- Suryaningsih, Sarjitno dan B. Prayitno. 2014. Studi Histopatologi pada Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) yang Terinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Mina Laut Indonesia*. 3(12): 13-21.
- Suyanto, R. 2008. *Budi Daya Ikan Lele*. Penebar Swadaya, Depok. 109 hlm.

- Tantu, W., R. A. Tumbol dan S. N. J. Longdong. 2013. Deteksi keberadaan bakteri *Aeromonas* sp. pada ikan nila yang dibudidayakan di karamba jaring apung danau Tandon. *Budidaya Perairan*. **1**(3): 74-80.
- Taukhid, A. M. Lusiastuti dan T. Sumiati. 2014. Aplikasi vaksin *Streptococcus agalactiae* untuk pencegahan penyakit streptococcosis pada budiaya ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Berita Biologi*. **13**(3): 245-253.
- Tizard, I. R. 1988. Pengantar Immunologi Veteriner. Terjemahan: Partadireja M. Surabaya: Airlangga University.
- Triyaningsih, Sarjito dan S. B. Prayitno. 2014. Patogenitas *Aeromonas hydrophila* yang diisolasi dari lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) yang berasal dari Boyolali. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. **3**(2): 11-17.
- Wahjuningrum, D., R. Astrini dan M. Setiawati. 2013. Pencegahan infeksi *Aeromonas hydrophila* pada benih ikan lele *Clarias* sp. yang berumur 11 hari menggunakan bawang putih *Allium sativum* dan meniran *Phyllanthus niruri*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. **12**(1): 94-104.



## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Alat dan bahan penelitian

#### a. Alat Penelitian

**Inkubator**



**Autoklaf**



**Kulkas**



**Inkubator shaker**



**Sentrifuge**



**Spektrofotometer**



**Hot plate**



**Timbangan digital**



**Vortex mixer**



Lampiran 1. (Lanjutan)

Bunsen



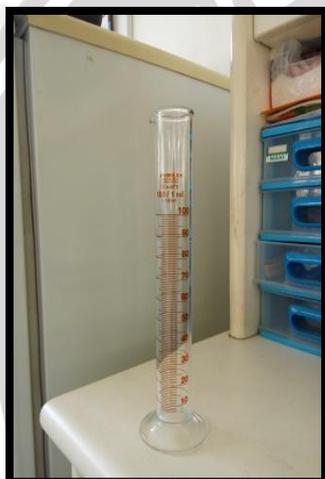
Cawan petri



Erlenmeyer



Gelas ukur



Beaker glass



Rak tabung reaksi



Bola hisap



Pipet volume



Tabung reaksi



Lampiran 1. (Lanjutan)  
Tabung falcon



Mikropipet



Bluetip



Yellowtip



Toples



Jarum ose



Mikro plate



Nampan



Aerator set



Lampiran 1. (Lanjutan)  
**Sprit**



**Spatula**



**Sprayer**



**Thermometer**



**pH meter**



**Eppendorf**



Lampiran 1. (Lanjutan)

b. Bahan Penelitian

**Aquades**



**Alumunium Foil**



**Alkohol 70%**



**TSA (Trypton Soya Agar)**



**TSB (Trypton Soya Broth)**



**Benang kasur**



**Plastik warp**



**Kapas**



**Spiritus**



Lampiran 1. (Lanjutan)  
Kertas label



Kantong plastik



Sensi gloves



Masker



Ikan lele



Formalin 37%



Na sitrat



PBS (Phosphat Buffer Salin)



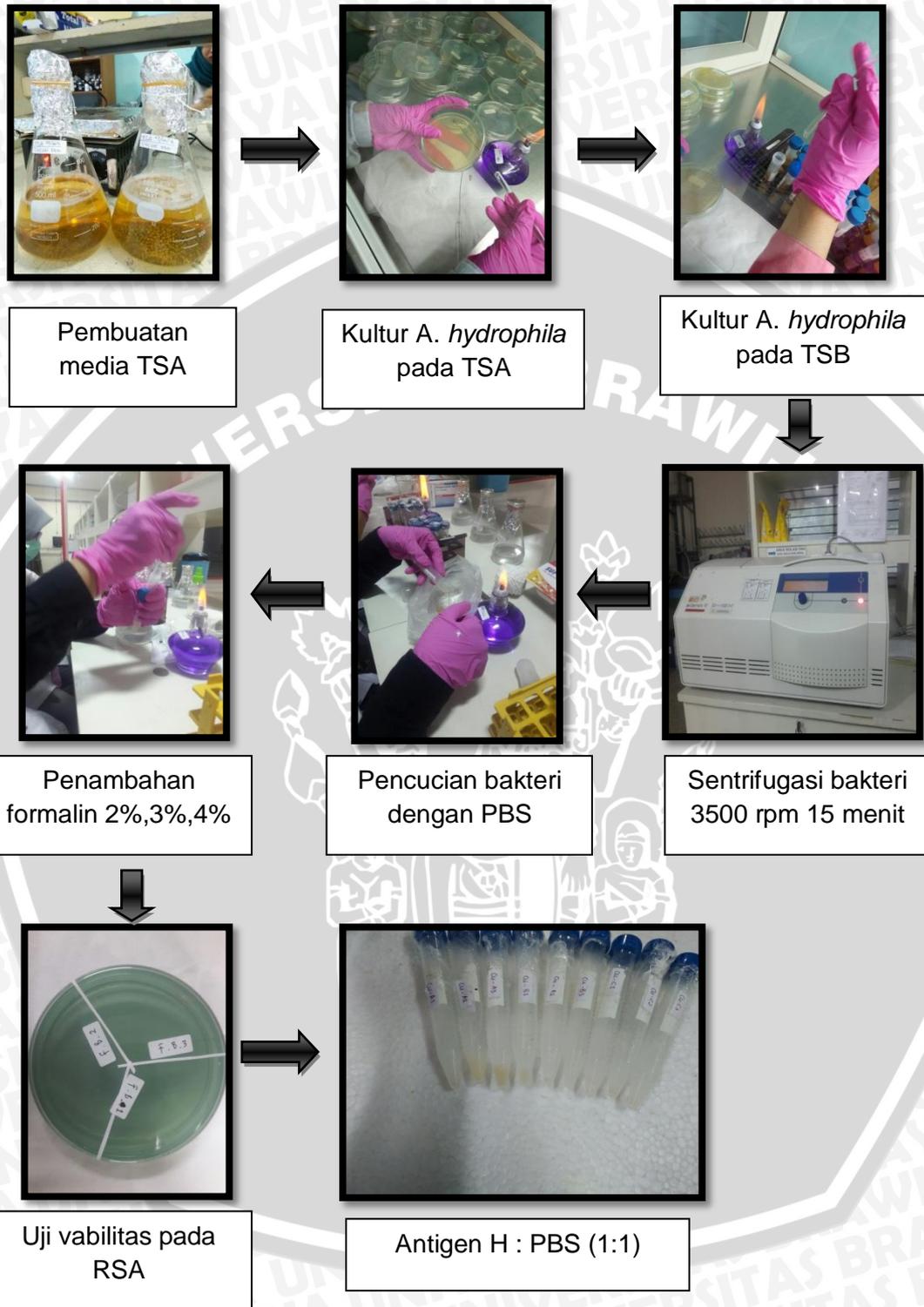
Tisu



## Lampiran 2. Komposisi Media

No.	Komposisi Media	Jumlah (gram)
1	Media <i>Rimler-Shott</i>	
	• L-ornithine hydrochloride	6,5
	• L-cystine hydrochloride	3,5
	• Maltose	0,3
	• Sodium thiosulfate	3,5
	• Bromothymol blue	6,8
	• Ferric ammonium citrate	0,03
	• Sodium deoxycholate	0,8
	• Novobiocin	1,0
	• Yeast extract	0,005
	• Sodium chloride	3,0
	• Agar	5,0
	13,5	
2	<i>Tryptic Soy Agar (TSA)</i>	
	• Pepton dari kasein	15,0
	• Pepton dari kedelai	5,0
	• Sodium chl	5,0
	15,0	
3	<i>Tryptic Soy Broth (TSB)</i>	
	• Pepton dari kasein	17,0
	• Pepton dari kedelai	3,0
	• Sodium chlorida	5,0
	• Dextrose	2,5
	• Dipotassium Phosphate	2,5

### Lampiran 3. Proses pembuatan antigen H



Lampiran 4. Hasil uji biokimia *A. hydrophila*



KEMENTERIAN KELAUTAN DAN PERIKANAN  
LABORATORIUM PENGUJI  
BALAI KARANTINA IKAN PENGENDALIAN MUTU  
DAN KEAMANAN HASIL PERIKANAN KELAS I SURABAYA I



Jl. Raya Bandar Udara Ir. H. Juanda No. 23, Sidoarjo, 61254  
Telp/fax : 031 – 8688099 – 8688118 – 8678471 E-mail : bkijuanda@yahoo.co.id

**LAPORAN HASIL UJI**

Report of Analysis

No. IKM/5.4.13/BKI-JS/XII/2016

KODE SAMPEL : 5.4.13/A.10  
*Sample Code*  
NAMA/JENIS SAMPEL : Isolat Tube  
*Type of Sample*  
NAMA PELANGGAN : IWIS  
*Customer*  
ALAMAT : Mahasiswa Universitas Brawijaya  
*Address*  
TANGGAL PENERIMAAN : -  
*Received Date*  
TANGGAL ANALISA : 11 – 14 Desember 2016  
*Date of Analysis*  
PARAMETER ANALISA : Identifikasi spesies Bakteri  
*Analysis of Parameters*  
SPESIFIKASI METODE : Konvensional  
*Method Specification*  
HASIL ANALISA : Terlampir  
*Test Result*  
CATATAN : Analisa dengan Metode Konvensional  
*Note*  
*Conventional method analysis*



Surabaya, 14 Desember 2016  
a/n. Penanggung Jawab  
Laboratorium Uji  
Penyelia,

Andi Jumriq, S.P  
NIP. 19820611 200312 2 001



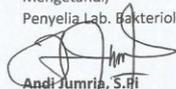
Lampiran 4. (Lanjutan)

**IDENTIFIKASI ISOLAT**  
**PARAMETER UJI *Aeromonas hydrophila* (IKM/5.4.13/BKI-JS)**  
 Tanggal : 11 - 14 Desember 2016

Karakteristik	Acuan (IKM)	CRM/RM <i>Aeromonas hydrophila</i>	Isolat Tube
Morfologi			
- Warna	Krem	Krem	Krem
- Bentuk	-	-	-
- Tepi	-	-	-
- Elevasi	-	-	-
- Struktur dalam	-	-	-
Uji gram, Morf. Sel	-, Batang	-, Batang	-, Batang
Oksidase	+	+	+
Katalase	+	+	+
Uji Biokimia	-	-	-
O/F	F	F	F
TSA 37°C	+	+	+
TSIA, Gas, H <sub>2</sub> S	As/As, H <sub>2</sub> S	As/Ak, H <sub>2</sub> S	As/As, H <sub>2</sub> S
L I A	d	-	v
Motilitas	+	+	+
Gelatin (22°C)	+	+	+
Indole	+	+	+
Ornithine	-	-	-
MR	+	+	+
Vp	+	-	-
Arginin	+	+	+
Simmons Citrate	d	-	-
Urease	-	-	-
TCBS	-	-	-
Mac Konkey	G	G	G
Muler Hilton / Novo	R	R	R
Uji Karbohidrat			
* Glukosa	+	+	+
* Laktosa	v	-	-
* Sukrosa	+	+	+
* Arabinosa	+	+	+
* Manitol	+	+	+
* Inositol	-	-	-
* Maltosa	+	+	+

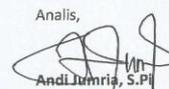
Catatan : Identifikasi menggunakan Cowan and steel's Manual For the Identification of Medical Bacteria and G. Nicholas Frerichs Manual for The Isolation and Identification of Fish Bacterial Pathogens

Mengetahui,  
 Penyelia Lab. Bakteriologi



Andi Jumria, S.Pi  
 NIP. 19820611 200312 2 001

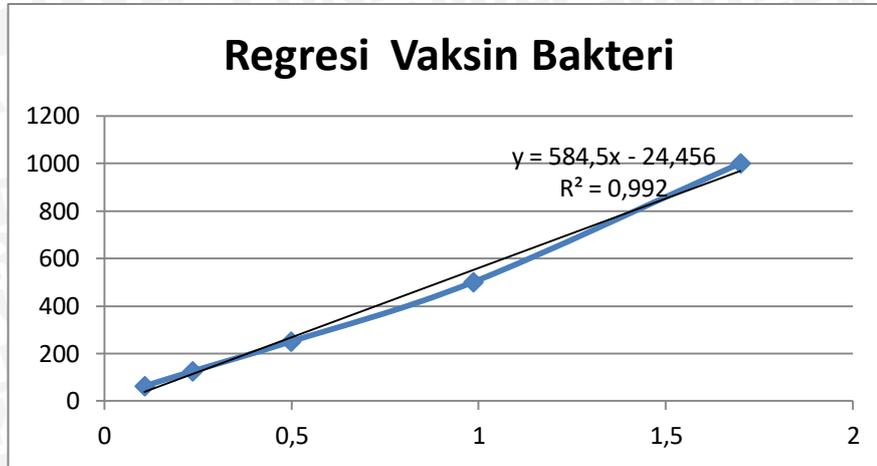
Analisis,



Andi Jumria, S.Pi  
 NIP. 19820611 200312 2 001



**Lampiran 5.** Hasil perhitungan kepadatan bakteri menggunakan spektrofotometer



Hasil Pengukuran Spektrofotometer

$$OD_1 = 1,699$$

$$OD_2 = 0,985$$

$$OD_3 = 0,498$$

$$OD_4 = 0,235$$

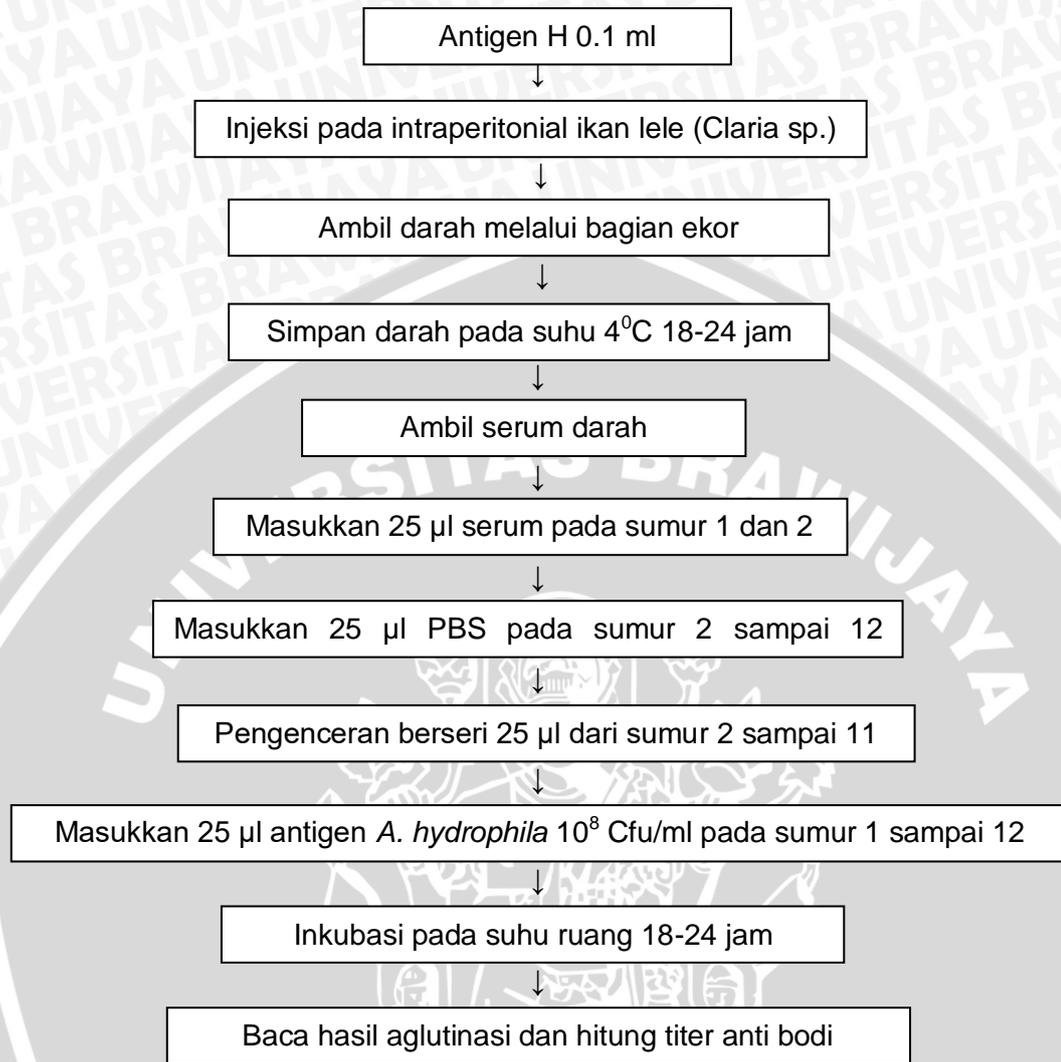
$$OD_5 = 0,107$$

Rumus *Total Plate Count* (TPC) (SNI, 2006)

$$= \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)] \times d}$$

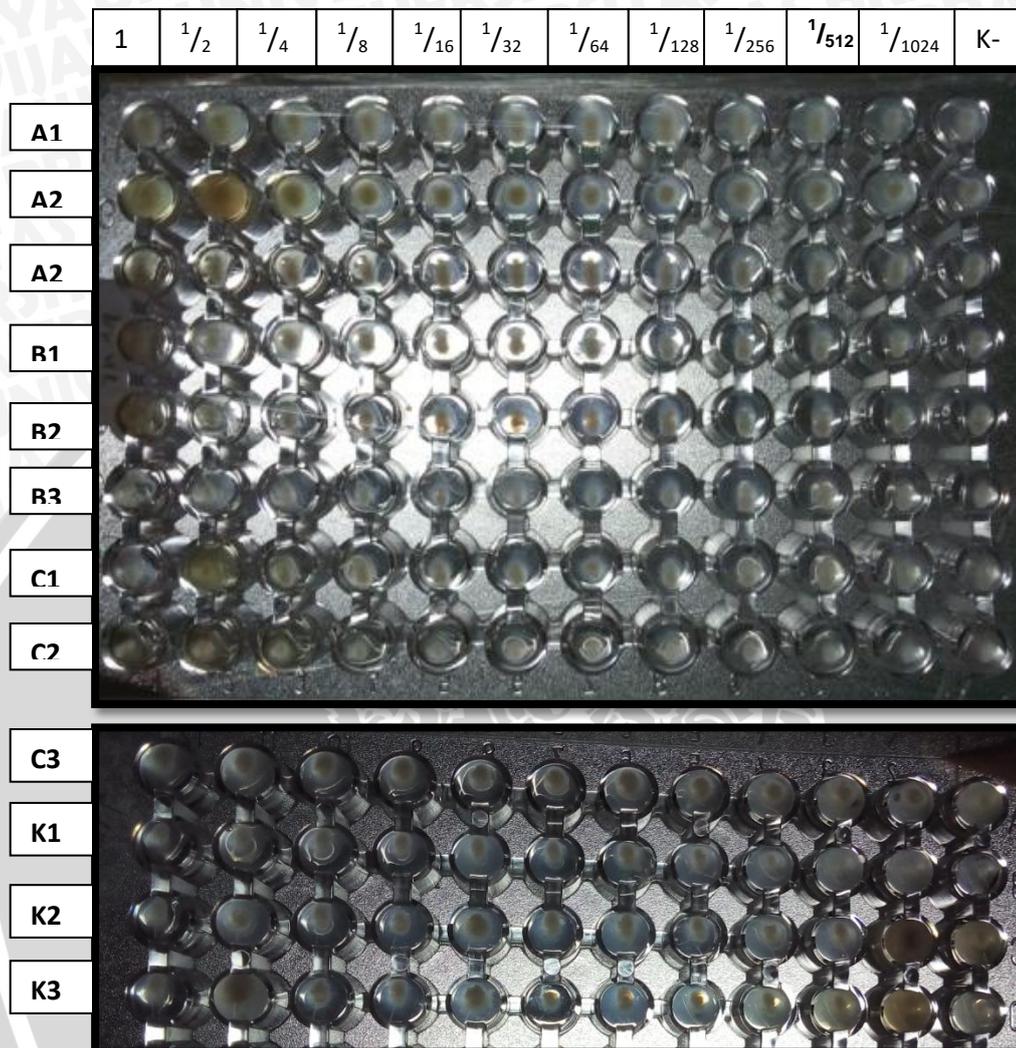
$$= \frac{58 + 52}{[(1 \times 1) + (0,1 \times 1)] \times 10^{-27}}$$

$$= 10 \times 10^{28} \text{ cfu/ml}$$

**Lampiran 6.** Skema kerja uji aglutinasi

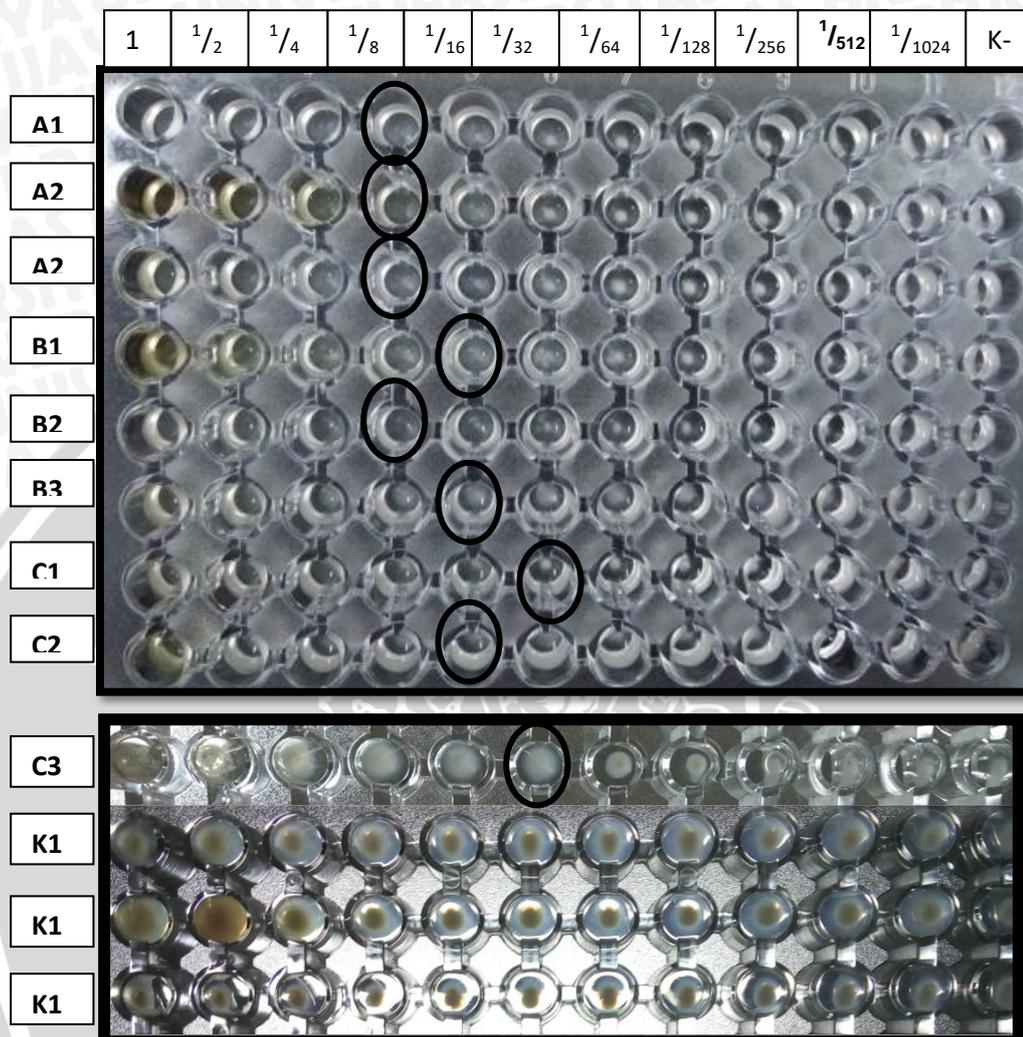
**Lampiran 7.** Visualisasi Hasil Aglutinasi

a. Hasil aglutinasi serum darah ikan lele (*Clarias sp.*) sebelum vaksinasi.



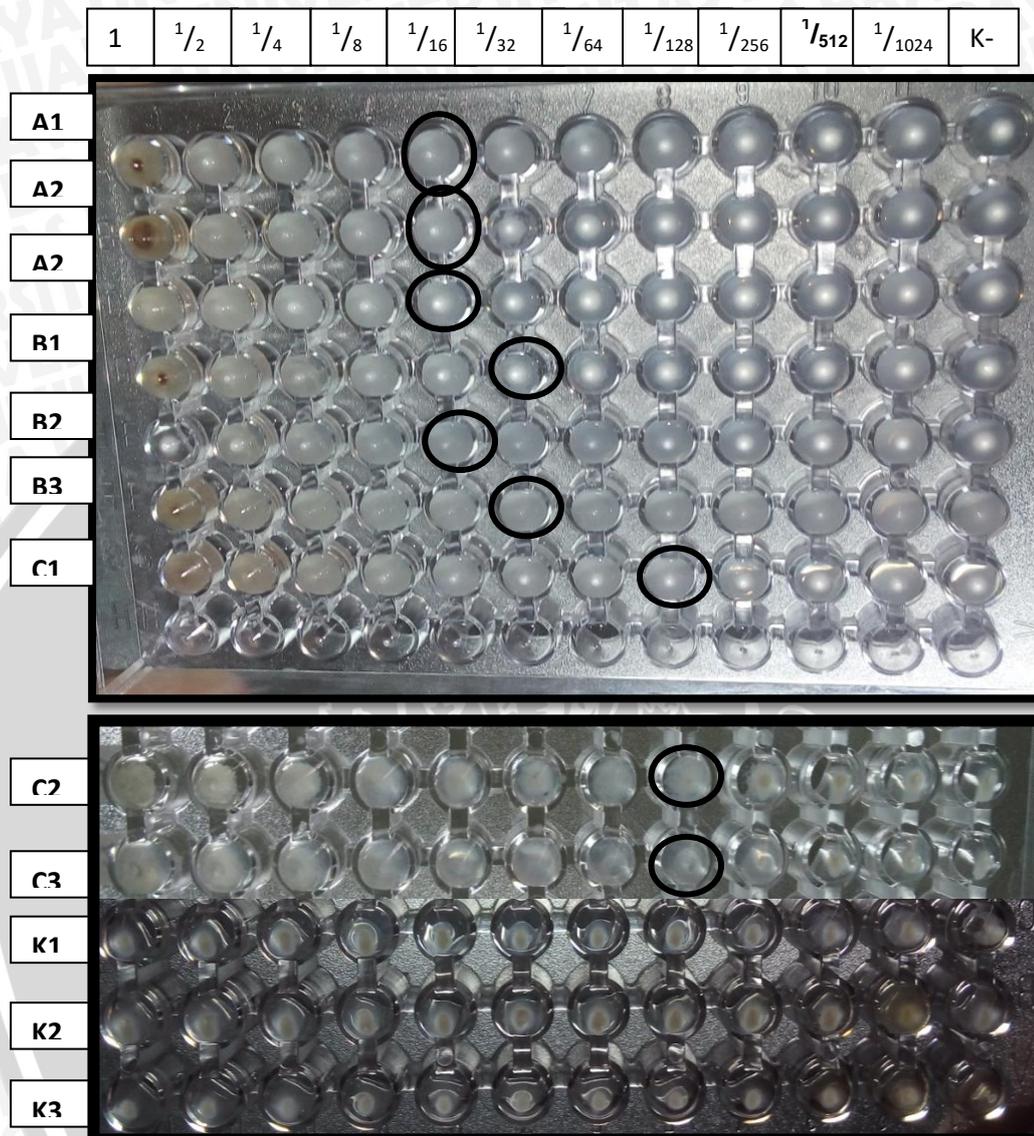
Lampiran 7. (Lanjutan)

b. Hasil aglutinasi serum darah ikan lele (*Clarias sp.*) pasca vaksinasi ke 1.



Lampiran 7. (Lanjutan)

c. Hasil aglutinasi serum darah ikan lele (*Clarias sp.*) pasca vaksinasi booster.



**Lampiran 8. Data Titer Antibodi**  
**Hasil Uji Aglutinasi Minggu 1**

Perlakuan	Pengenceran ke-									
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
K1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Hasil Uji Aglutinasi Minggu 2**

Perlakuan	Pengenceran ke-									
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
K1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
A2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
A3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
B1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
B2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
B3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
C1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
C2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
C3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

**Perhitungan titer antibodi minggu 2**

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata ± SD
	1	2	3		
A	8	8	8	24	8
B	16	8	16	40	13,333 ± 4,619
C	32	16	32	80	16,667 ± 9,238
<b>Total</b>				144	

$$\begin{aligned} \text{Faktor Koreksi} &= TJ^2/n.r \\ &= 144^2/9 \\ &= 2304 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Jumlah Kuadrat Total} &= (A1^2)+(A2^2)+(A3^2)+\dots+(C3^2) - \text{FK} \\ &= (8^2)+(8^2)+(8^2)+\dots+(32^2) - 2304 \\ &= 768 \end{aligned}$$

**Lampiran 8. (Lanjutan)**

$$\begin{aligned} \text{JK Perlakuan} &= ((24^2)+(40^2)+(80^2))/3 - 2304 \\ &= 554,667 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK Galat} &= \text{JKT} - \text{JKP} \\ &= 768 - 554,667 \\ &= 213,333 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{KT Perlakuan} &= \text{JKP}/r-1 \\ &= 554,667/2 \\ &= 277,333 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{KT Galat} &= \text{JKG}/(r(n-1)) \\ &= 213,333/6 \\ &= 35,556 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{F hitung} &= \text{KTP}/\text{KTG} \\ &= 277,333/35,556 \\ &= 7,8 \end{aligned}$$

**Analisa Sidik Ragam**

SK	Db	JK	KT	Fhit	Ftab 5%	Ftab 1%
<b>Perlakuan</b>	2	554,667	277,333	7,8*	5,14	10,92
<b>Galat</b>	6	213,333	35,556			
<b>Total</b>	8					

Keterangan : \* = Berbeda nyata

Fhit > Ftab 5%, maka uji aglutinasi vaksin inaktif formalin dengan konsentrasi berbeda memberikan pengaruh berbeda nyata terhadap titer antibodi ikan lele, sehingga dilanjutkan ke Uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

**Menghitung nilai BNT**

$$\begin{aligned} \text{SED} &= \sqrt{(2 \times \text{KTG})/n} \\ &= \sqrt{(2 \times 35,556)/3} \\ &= 4,869 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{BNT 5\%} &= 1,943 \times 4,869 \\ &= 9,460 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{BNT 1\%} &= 3,143 \times 4,869 \\ &= 15,302 \end{aligned}$$

Lampiran 8. (Lanjutan)

Perlakuan		A	B	C	Notasi
		8	13,333	26,667	
A	8	-	-	-	a
B	13,333	5,333 <sup>ns</sup>	-	-	a
C	26,667	24 <sup>**</sup>	18,667 <sup>**</sup>	-	b

Keterangan : ns = tidak berbeda nyata, \*\* = Berbeda sangat nyata

Uji polynomial Orthogonal

Perlakuan	Total	Perbandingan Ci	
		Linear	Kuadrat
A	24	-1	1
B	40	0	-2
C	80	1	1
Q		56	24
Hasil kuadrat Ci		2	6
Kr		6	18
JKR		522,667	32

JK Regresi Total = JK Linear + JK Kuadratik  
 = 522,667 + 32  
 = 554,667

Analisa Sidik Ragam Regresi

Sk	Db	Jk	Kt	F Hit	f5%	f1%
Perlakuan	2	554,667				
Linear	1	522,667	522,667	154,7	5,11	10,9
Kuadrat	1	32	32	0,9		
Acak	6	213,333	35,556			
Total	8					

Menghitung R<sup>2</sup>

R<sup>2</sup> Linear = KT Linear / (KT Linear + KT Acak)  
 = 522,667 / (522,667 + 35,556)  
 = 0,936

R<sup>2</sup> Kuadrat = KT Kuadrat / (KT Kuadrat + KT Acak)  
 = 32 / (32 + 35,556)  
 = 0,474

**Lampiran 8.** (Lanjutan)

Perhitungan regresi di atas menyatakan bahwa regresi linear bernilai lebih besar dari pada regresi kuadratik, sehingga dibutuhkan persamaan regresi linear berikut:

Perlakuan	X	Y	XY	X <sup>2</sup>
A1	2	8	16	4
A2	2	8	16	4
A3	2	8	16	4
B1	3	16	48	9
B2	3	8	24	9
B3	3	16	48	9
C1	4	32	128	16
C2	4	16	64	16
C3	4	32	128	16
<b>Total</b>	27	144	488	87
<b>Rerata</b>	3	16	54,222	9,667

**Mencari b1**

$$B1 = (488 - ((27 \cdot 144) / 9)) / (87 - ((27^2) / 9))$$

$$= 9,333$$

$$B0 = 16 - (3 \cdot 9,333)$$

$$= -12$$

$$Y = 9,333X - 12$$

**Hasil Uji Aglutinasi Minggu 3**

Perlakuan	Pengenceran ke-									
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
K1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
A2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
A3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
B1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
B2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
B3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
C1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
C2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
C3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Lampiran 8. (Lanjutan)

Perhitungan Titer Antibodi Minggu ke-3

Perlakuan	Ulangan			Total	Rearat ± SD
	1	2	3		
A	16	16	16	48	16
B	32	16	32	80	27 ± 9,238
C	128	128	128	384	128
<b>Total</b>				<b>512</b>	

$$\begin{aligned} \text{Faktor Koreksi} &= TJ^2/n.r \\ &= 512^2/9 \\ &= 29127,11 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Jumlah Kuadrat Total} &= (A1^2)+(A2^2)+(A3^2)+\dots+(C3^2) - FK \\ &= (16^2)+(16^2)+(16^2)+\dots+(128^2) - 29127,11 \\ &= 23096,89 \end{aligned}$$

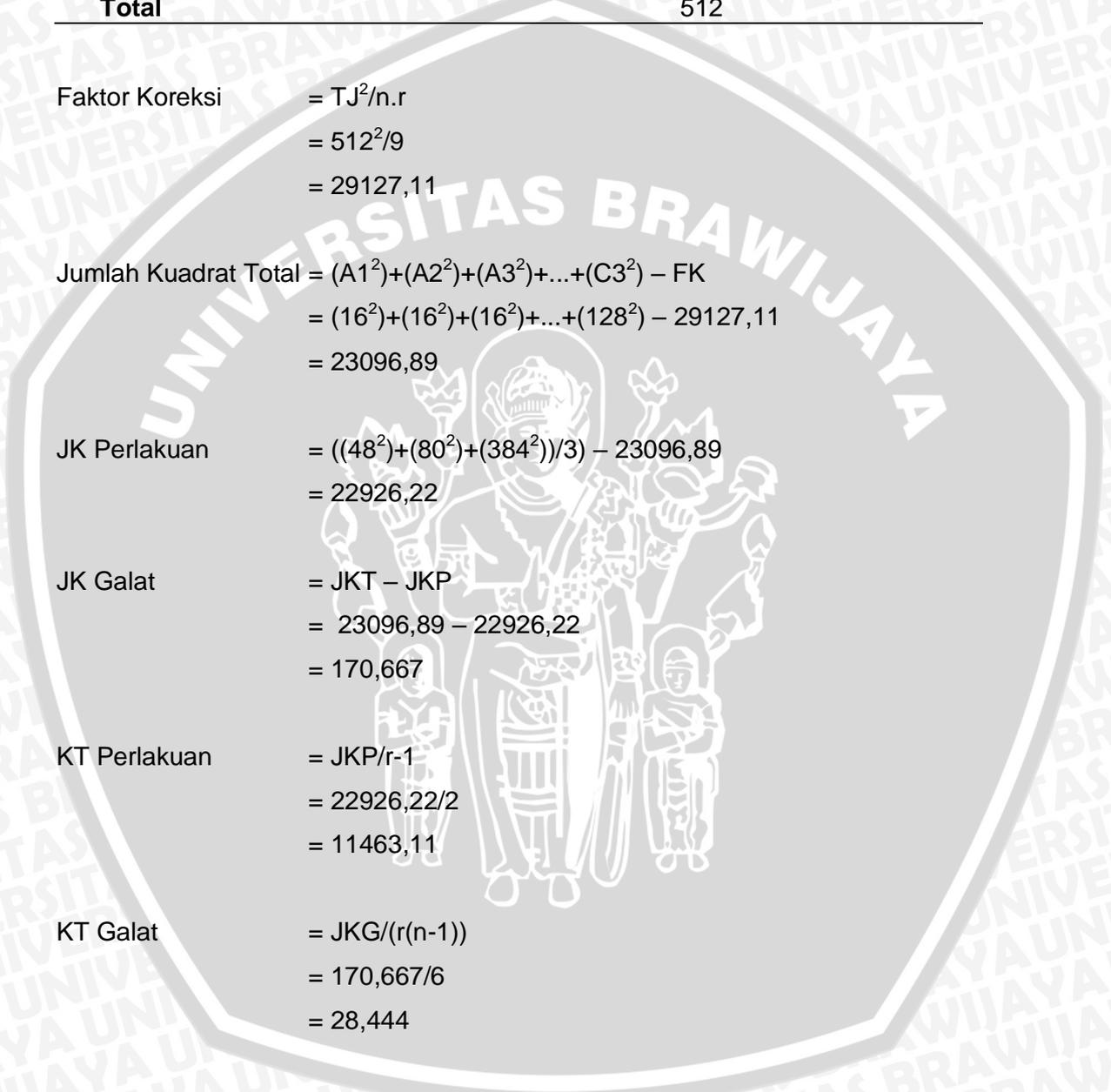
$$\begin{aligned} \text{JK Perlakuan} &= ((48^2)+(80^2)+(384^2))/3 - 23096,89 \\ &= 22926,22 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK Galat} &= \text{JKT} - \text{JKP} \\ &= 23096,89 - 22926,22 \\ &= 170,667 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{KT Perlakuan} &= \text{JKP}/r-1 \\ &= 22926,22/2 \\ &= 11463,11 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{KT Galat} &= \text{JKG}/(r(n-1)) \\ &= 170,667/6 \\ &= 28,444 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{F hitung} &= \text{KTP}/\text{KTG} \\ &= 11463,11/ 28,444 \\ &= 403 \end{aligned}$$



Lampiran 8. (Lanjutan)

Analisa Sidik Ragam

SK	Db	JK	KT	Fhit	Ftab 0,05	Ftab 0,01
Perlakuan	2	22926,22	11463,11	403**	5,14	10,92
Galat	6	170,667	28,444			
Total	8					

Keterangan : \*\* = Berbeda sangat nyata

Fhit > Ftab 0,01, maka uji aglutinasi vaksin inaktif formalin dengan konsentrasi berbeda sangat berbeda nyata terhadap titer antibodi ikan lele, sehingga dilanjutkan ke Uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

Menghitung nilai BNT

$$\begin{aligned}
 \text{SED} &= \sqrt{(2 \times \text{KTG})/n} \\
 &= \sqrt{(2 \times 28,444)/3} \\
 &= 4,355 \\
 \text{BNT 5\%} &= 1,943 \times 4,355 \\
 &= 8,461 \\
 \text{BNT 1\%} &= 3,143 \times 4,355 \\
 &= 13,687
 \end{aligned}$$

Perlakuan		A	B	C	Notasi
		16	27	128	
A	16	-	-	-	a
B	27	10,667*	-	-	b
C	128	112**	101,333**	-	c

Keterangan: \* = Berbeda nyata, \*\* = Berbeda sangat nyata

Uji Polynomial Orthogonal

Perlakuan	Total	Perbandingan Ci	
		Linear	Kuadrat
A	48	-1	1
B	80	0	-2
C	384	1	1
Q		336	272
Hasil kuadrat Ci		2	6
Kr		6	18
JKR		18816	4110,222



**Lampiran 8. (Lanjutan)**

$$\begin{aligned}
 \text{JK Regresi Total} &= \text{JK Linear} + \text{JK Kuadratik} \\
 &= 18816 + 4110,222 \\
 &= 22926,222
 \end{aligned}$$

**Analisa Sidik Ragam**

SK	DB	JK	KT	F HIT	F5%	F1%
Perlakuan	2	22926,222				
Linear	1	18816	18816	661,5		
kuadrat	1	4110,222	4110,222	144,5	5,11	10,9
Acak	6	170,667	28,44			
Total	8					

**Menghitung R<sup>2</sup>**

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Linear} &= \text{KT Linear} / (\text{KT Linear} + \text{KT Acak}) \\
 &= 18816 / (18816 + 28,444) \\
 &= 0,991
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Kuadrat} &= \text{KT Kuadrat} / (\text{KT Kuadrat} + \text{KT Acak}) \\
 &= 4110,222 / (4110,222 + 28,444) \\
 &= 0,960
 \end{aligned}$$

Perhitungan regresi di atas menyatakan bahwa regresi linear bernilai lebih besar dari pada regresi kuadratik dan kubik, sehingga dibutuhkan persamaan regresi linear berikut

Perlakuan	X	Y	XY	X <sup>2</sup>
A1	2	16	32	4
A2	2	16	32	4
A3	2	16	32	4
B1	3	32	96	9
B2	3	16	48	9
B3	3	32	96	9
C1	4	128	512	16
C2	4	128	512	16
C3	4	128	512	16
Total	27	512	1872	87
Rerata	3	56,889	208	9,667

**Mencari b1**

$$\begin{aligned}
 B1 &= (1872 - ((27 \cdot 512) / 9)) / (87 - ((27^2) / 9)) \\
 &= 56
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 B0 &= 56,889 - (3 \cdot 56) \\
 &= -111,111
 \end{aligned}$$

$$Y = 56X - 111,11$$

**Lampiran 9.**Data Kualitas Air  
Kualitas Air Minggu I ( Sebelum Vaksinasi)

Tanggal	Perlakuan	Suhu (°C)		pH		DO (ppm)	
		Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore
24 Jan 2017	K1	24	27	8,37	8,27	5,51	5,85
	K2	24	27	8,25	8,22	5,04	5,67
	K3	24	27	8,31	8,18	5,32	5,84
	A1	24	27	8,21	8,31	5,23	5,68
	A2	24	27	8,24	8,3	5,29	5,24
	A3	24	27	8,24	8,24	5,91	5,43
	B1	24	27	8,28	8,37	5,82	5,62
	B2	24	27	8,35	8,54	6,02	5,05
	B3	24	27	8,25	8,31	5,43	4,93
	C1	24	27	8,28	8,33	5,41	6,02
	C2	24	27	8,30	8,28	5,99	5,11
	C3	24	27	8,25	8,38	6,01	5,65
25 Jan 2017	K1	24	25	8,40	8,51	5,32	5,53
	K2	24	25	8,40	8,45	5,33	5,43
	K3	24	25	8,42	8,51	5,34	5,50
	A1	24	26	8,28	8,24	5,17	5,39
	A2	24	25	8,42	8,35	5,10	5,24
	A3	24	26	8,38	8,28	5,28	5,48
	B1	24	25	8,39	8,19	5,30	5,52
	B2	24	26	8,29	8,21	5,32	5,54
	B3	24	25	8,39	8,26	5,34	5,54
	C1	24	25	8,27	8,22	5,35	5,70
	C2	24	25	8,33	8,19	5,34	5,55
	C3	24	25	8,38	8,30	5,41	5,51
26 Jan 2017	K1	24	26	8,44	8,32	5,39	5,59
	K2	24	26	8,39	8,24	5,28	5,60
	K3	24	26	8,32	8,28	5,33	5,59
	A1	24	26	8,37	8,20	5,33	5,62
	A2	24	26	8,35	8,25	5,38	5,56
	A3	24	26	8,30	8,24	5,34	5,57
	B1	24	26	8,38	8,26	5,33	5,52
	B2	23	26	8,26	8,15	5,31	5,60
	B3	24	26	8,41	8,33	5,35	5,62
	C1	24	26	8,43	8,38	5,32	5,51
	C2	24	26	8,48	8,34	5,32	5,61
	C3	24	26	8,49	8,26	5,27	5,47
27 Jan 2017	K1	24	27	8,26	8,34	5,36	5,63
	K2	24	27	8,24	8,28	5,27	5,61
	K3	24	27	8,24	8,28	5,31	5,69
	A1	24	27	8,26	8,48	5,16	5,51
	A2	24	27	8,24	8,25	5,18	5,53
	A3	24	27	8,23	8,28	5,32	5,54
	B1	24	27	8,05	8,24	5,40	5,54

Lampiran 9. (Lanjutan)

Tanggal	Perlakuan	Suhu (°C)		pH		DO (ppm)	
		Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore
38 Jan 2017	B2	24	27	8,05	8,40	5,40	5,54
	B3	24	27	8,38	8,33	5,35	5,69
	C1	24	27	8,15	8,41	5,34	5,59
	C2	24	27	8,27	8,30	5,38	5,63
	C3	24	27	8,23	8,27	5,27	5,72
	K1	23	26	8,05	8,15	5,30	5,59
	K2	24	26	8,16	8,17	5,54	5,56
	K3	24	26	8,08	8,26	5,20	5,44
	A1	24	26	8,09	8,26	5,22	5,42
	A2	24	26	8,23	8,27	5,25	5,56
	A3	24	26	8,23	8,25	5,23	5,49
	B1	24	26	8,15	8,24	5,43	5,65
	B2	24	26	8,30	8,23	5,28	5,71
	B3	24	26	8,18	8,32	5,24	5,51
	29 Jan 2017	C1	24	26	8,18	8,30	5,29
C2		24	26	8,14	8,28	5,19	5,71
C3		24	25	8,16	8,26	5,20	5,60
K1		24	26	8,15	8,28	5,05	5,51
K2		24	26	8,27	8,31	5,28	5,56
K3		24	26	8,22	8,28	5,21	5,52
A1		24	26	8,24	8,29	5,25	5,46
A2		24	26	8,19	8,28	5,43	5,34
A3		24	26	8,19	8,35	5,60	5,64
B1		24	26	8,24	8,24	5,37	5,26
B2		24	26	8,20	8,31	5,36	5,42
B3		24	26	8,21	8,24	5,39	5,60
C1		24	26	8,18	8,24	5,24	5,65
C2		24	26	8,20	8,28	5,27	5,45
C3		24	26	8,19	8,28	5,38	5,59
30 Jan 2017	K1	24	27	8,27	8,36	5,32	5,59
	K2	24	27	8,25	8,34	5,28	5,69
	K3	24	27	8,24	8,35	5,38	5,59
	A1	24	27	8,23	8,27	5,35	5,61
	A2	24	27	8,19	8,32	5,18	5,62
	A3	24	27	8,26	8,17	5,28	5,60
	B1	24	27	8,15	8,23	5,16	5,52
	B2	24	27	8,16	8,24	5,22	5,60
	B3	24	27	8,15	8,15	5,20	5,50
C1	24	27	8,14	8,28	5,19	5,48	
C2	24	27	8,24	8,27	5,27	5,59	
C3	24	27	8,16	8,32	5,28	5,60	

**Lampiran 9. (Lanjutan)**

Kualitas Air Minggu II (1 minggu setelah vaksinasi)

Tanggal	Perlakuan	Suhu (°C)		pH		DO (ppm)	
		Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore
<b>31 Jan 2017</b>	K1	25	27	8,32	8,22	5,46	5,85
	K2	25	27	8,20	8,17	4,99	5,57
	K3	25	27	8,26	8,13	5,27	5,74
	A1	25	27	8,16	8,26	4,99	5,57
	A2	25	27	8,19	8,28	5,27	5,12
	A3	25	27	8,19	8,24	5,85	5,31
	B1	25	27	8,22	8,32	5,78	5,52
	B2	25	27	8,20	8,49	5,90	4,88
	B3	25	27	8,25	8,20	5,38	4,78
	C1	25	27	8,23	8,25	5,36	5,04
	C2	25	27	8,20	8,23	6,01	5,01
	C3	25	27	8,20	8,32	6,06	5,55
<b>01 Feb 2017</b>	K1	24	26	8,35	8,46	5,28	5,44
	K2	24	26	8,35	8,40	5,28	5,33
	K3	24	26	8,42	8,51	5,29	5,40
	A1	24	26	8,37	8,46	5,12	5,29
	A2	24	26	8,37	8,28	5,05	5,24
	A3	24	26	8,33	8,23	5,23	5,38
	B1	24	26	8,34	8,14	5,25	5,42
	B2	24	26	8,24	8,16	5,28	5,45
	B3	24	26	8,39	8,26	5,29	5,44
	C1	24	26	8,27	8,22	5,30	5,60
	C2	24	26	8,33	8,19	5,29	5,45
	C3	24	26	8,38	8,30	5,36	5,41
<b>02 Feb 2017</b>	K1	24	26	8,44	8,27	5,34	5,54
	K2	24	26	8,34	8,19	5,23	5,55
	K3	24	26	8,27	8,33	5,28	5,54
	A1	24	26	8,32	8,15	5,28	5,57
	A2	24	26	8,30	8,20	5,33	5,51
	A3	24	26	8,25	8,19	5,26	5,52
	B1	24	26	8,33	8,21	5,28	5,47
	B2	23	26	8,21	8,10	5,26	5,55
	B3	24	26	8,36	8,28	5,30	5,57
	C1	24	26	8,38	8,33	5,27	5,46
	C2	24	26	8,43	8,29	5,27	5,56
	C3	24	26	8,44	8,20	5,22	5,42
<b>03 Feb 2017</b>	K1	25	27	8,21	8,29	5,31	5,58
	K2	25	27	8,19	8,23	5,22	5,56
	K3	25	27	8,19	8,24	5,26	5,64
	A1	25	27	8,21	8,43	5,11	5,46
	A2	25	27	8,19	8,20	5,13	5,48
	A3	25	27	8,18	8,23	5,27	5,49
	B1	25	27	8,00	8,19	5,35	5,49

Lampiran 9. (Lanjutan)

Waktu	Perlakuan	Suhu (°C)		pH		DO (ppm)	
		Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore
04 Feb 2017	B2	25	27	8,34	8,19	5,23	5,60
	B3	25	27	8,30	8,21	5,20	5,58
	C1	25	27	8,26	8,15	5,25	5,61
	C2	25	27	8,28	8,17	5,23	5,54
	C3	25	27	8,26	8,17	5,25	5,57
	K1	25	27	8,29	8,18	5,29	5,56
	K2	25	27	8,31	8,20	5,25	5,55
	K3	25	27	8,33	8,21	5,23	5,47
	A1	25	27	8,33	8,12	5,28	5,39
	A2	25	27	8,23	8,11	5,23	5,57
	A3	25	27	8,36	8,21	5,25	5,56
	B1	25	27	8,29	8,18	5,28	5,48
	B2	25	27	8,43	8,23	5,21	5,62
	B3	25	27	8,26	8,17	5,32	5,60
	05 Feb 2017	C1	25	27	8,34	8,20	5,29
C2		25	27	8,33	8,24	5,31	5,59
C3		25	27	8,35	8,31	5,26	5,48
K1		25	27	8,32	8,20	5,27	5,53
K2		25	27	8,28	8,19	5,30	5,47
K3		25	27	8,28	8,16	5,27	5,52
A1		25	27	8,42	8,23	5,34	5,53
A2		25	27	8,47	8,31	5,29	5,69
A3		25	27	8,42	8,22	5,32	5,71
B1		25	27	8,39	8,27	5,38	5,67
B2		25	27	8,33	8,18	5,24	5,58
B3		25	27	8,28	8,21	5,30	5,63
C1		25	27	8,37	8,24	5,28	5,57
C2		25	27	8,35	8,20	5,32	5,74
C3		25	27	8,42	8,17	5,30	5,69
06 Feb 2017	K1	24	27	8,37	8,23	5,33	5,64
	K2	24	27	8,36	8,27	5,28	5,66
	K3	25	27	8,37	8,24	5,41	5,72
	A1	24	27	8,44	8,12	5,29	5,53
	A2	24	27	8,38	8,25	5,32	5,78
	A3	24	27	8,29	8,18	5,29	5,65
	B1	24	27	8,33	8,21	5,34	5,56
	B2	24	27	8,43	8,23	5,29	5,58
	B3	24	27	8,35	8,22	5,27	5,66
C1	24	27	8,33	8,26	5,34	5,57	
C2	24	27	8,45	8,27	5,30	5,62	
C3	24	27	8,41	8,30	5,43	6,87	

**Lampiran 9. (Lanjutan)**  
**Kualitas Air Minggu III (1 minggu setelah vaksinasi ulang)**

Tanggal	Perlakuan	Suhu (°C)		pH		DO (ppm)	
		Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore
<b>07 Feb 2017</b>	K1	24	26	8,35	8,27	5,41	5,83
	K2	24	26	8,25	8,22	5,12	5,62
	K3	24	26	8,31	8,18	5,32	5,71
	A1	24	26	8,21	8,31	5,15	5,57
	A2	24	26	8,24	8,33	5,32	5,43
	A3	24	26	8,25	8,29	5,25	5,36
	B1	24	26	8,27	8,37	5,34	5,47
	B2	24	26	8,25	8,45	5,25	5,88
	B3	24	26	8,30	8,25	5,27	5,65
	C1	24	26	8,28	8,30	5,31	5,54
	C2	24	26	8,25	8,28	5,45	5,51
	C3	24	26	8,25	8,37	5,45	5,60
<b>08 Feb 2017</b>	K1	24	26	8,39	8,41	5,28	5,49
	K2	24	26	8,37	8,45	5,33	5,38
	K3	24	26	8,47	8,46	5,34	5,45
	A1	24	26	8,42	8,41	5,17	5,34
	A2	24	26	8,43	8,33	5,15	5,28
	A3	24	26	8,38	8,28	5,28	5,43
	B1	24	26	8,39	8,19	5,30	5,47
	B2	24	26	8,28	8,21	5,25	5,50
	B3	24	26	8,44	8,31	5,34	5,49
	C1	24	26	8,35	8,27	5,35	5,65
	C2	24	26	8,38	8,24	5,34	5,50
	C3	24	26	8,42	8,35	5,31	5,46
<b>09 Feb 2017</b>	K1	25	27	8,49	8,32	5,33	5,59
	K2	25	27	8,38	8,24	5,28	5,60
	K3	25	27	8,32	8,38	5,25	5,59
	A1	25	27	8,37	8,20	5,25	5,62
	A2	25	27	8,35	8,25	5,32	5,56
	A3	25	27	8,30	8,26	5,31	5,57
	B1	25	27	8,38	8,26	5,33	5,52
	B2	25	27	8,26	8,18	5,31	5,60
	B3	25	27	8,41	8,33	5,25	5,62
	C1	25	27	8,42	8,38	5,22	5,51
	C2	25	27	8,38	8,34	5,32	5,61
	C3	25	27	8,37	8,26	5,27	5,47
<b>10 Feb 2017</b>	K1	24	27	8,26	8,34	5,36	5,63
	K2	24	27	8,26	8,28	5,27	5,61
	K3	24	27	8,25	8,29	5,31	5,68
	A1	24	27	8,27	8,47	5,15	5,51
	A2	24	27	8,27	8,25	5,18	5,53
	A3	24	27	8,25	8,28	5,33	5,54
	B1	24	27	8,36	8,26	5,30	5,54

Lampiran 9. (Lanjutan)

Waktu	Perlakuan	Suhu ( $^{\circ}\text{C}$ )		pH		DO (ppm)	
		Pagi	Sore	Pagi	Sore	Pagi	Sore
11 Feb 2017	B2	24	27	8,49	8,35	5,38	5,49
	B3	24	27	8,38	8,31	5,33	5,38
	C1	24	27	8,32	8,27	5,30	5,45
	C2	24	27	8,37	8,27	5,30	5,34
	C3	24	27	8,35	8,23	5,38	5,28
	K1	24	27	8,30	8,24	5,36	5,43
	K2	24	27	8,38	8,33	5,38	5,47
	K3	24	27	8,26	8,19	5,36	5,50
	A1	24	27	8,41	8,35	5,30	5,49
	A2	24	27	8,43	8,30	5,27	5,65
	A3	24	27	8,47	8,30	5,36	5,50
	B1	24	27	8,42	8,24	5,35	5,46
	B2	24	27	8,33	8,22	5,36	5,73
	B3	24	27	8,34	8,32	5,29	5,61
	C1	24	27	8,36	8,21	5,33	5,45
C2	24	27	8,29	8,24	5,38	5,56	
C3	24	27	8,31	8,28	5,28	5,45	
12 Feb 2017	K1	25	27	8,42	8,37	5,38	5,51
	K2	25	27	8,38	8,34	5,33	5,38
	K3	25	27	8,33	8,27	5,30	5,34
	A1	25	27	8,37	8,32	5,30	5,48
	A2	25	27	8,35	8,30	5,37	5,46
	A3	25	27	8,30	8,33	5,36	5,56
	B1	25	27	8,38	8,27	5,38	5,54
	B2	25	27	8,26	8,24	5,36	5,62
	B3	25	27	8,31	8,35	5,30	5,53
	C1	25	27	8,33	8,37	5,27	5,41
	C2	25	27	8,38	8,34	5,37	5,43
	C3	25	27	8,26	8,42	5,34	5,39
	K1	25	27	8,34	8,41	5,26	5,42
	K2	25	27	8,29	8,30	5,36	5,42
	K3	25	27	8,29	8,35	5,33	5,39
A1	25	27	8,31	8,33	5,31	5,36	
A2	25	27	8,30	8,35	5,28	5,43	
A3	25	27	8,31	8,37	5,36	5,42	
B1	25	27	8,33	8,38	5,27	5,32	
B2	25	27	8,37	8,40	5,29	5,54	
B3	25	27	8,35	8,42	5,28	5,43	
C1	25	27	8,30	8,35	5,28	5,50	
C2	25	27	8,38	8,43	5,24	5,39	
C3	25	27	8,26	8,31	5,29	5,33	

13 Feb  
2017