

**PENGARUH PEMBERIAN VAKSIN BIVALEN
Vibrio parahaemolyticus DAN *Vibrio vulnificus* UNTUK PENGENDALIAN
VIBRIOSIS PADA BAWAL BINTANG (*Trachinotus blochii* Lacepede, 1801)
DENGAN METODE INJEKSI**

Skripsi

Oleh

NINDYA LEONITA ANANDA



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2019**

ABSTRACT

THE EFFECT OF BIVALEN VACCINE *Vibrio parahaemolyticus* AND *Vibrio vulnificus* FOR VIBRIOSIS CONTROL ON SNUBNOSE POMPANO (*Trachinotus blochii* Lacepede, 1801) THROUGH INJECTION

By

NINDYA LEONITA ANANDA

Vaccination is an effort to prevent fish disease as a way to reduce giving antibiotics. Giving bivalent vaccine is because snubnose pompano is one of sea water fish that often infected by *Vibrio* sp. Injection vaccination could improve immune response quickly because it can be absorbed directly and circulated to all fish organs. This research aimed to observe the effect of bivalent vaccine *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* to improve immune response of snubnose pompano. As many as 25 snubnose pompano per container, 8-10 cm in length, were used. There were three treatments, i.e: K+ (control); P1 (10^8 CFU/mL vaccine); and P2 (10^9 CFU/mL vaccine). Immune response parameters observed were included total leukocytes, phagocytic activity, phagocytic index, titre antibody, time of clinical symptoms, survival rate, relative percent survival, and mean time to death. The results showed that the parameters of the immune response both nonspecific and specific for snubnose pompano were significantly increased by the application of 10^8 CFU/mL bivalent vaccination.

Key words: vaccination, immune response specific, immune response nonspecific

ABSTRAK

PENGARUH PEMBERIAN VAKSIN BIVALEN *Vibrio parahaemolyticus* DAN *Vibrio vulnificus* UNTUK PENGENDALIAN VIBRIOSIS PADA BAWAL BINTANG (*Trachinotus blochii* Lacepede, 1801) DENGAN METODE INJEKSI

Oleh

NINDYA LEONITA ANANDA

Vaksinasi merupakan upaya yang dilakukan untuk menanggulangi penyakit ikan sebagai salah satu cara untuk mengurangi pemberian antibiotik. Vaksinasi yang diberikan berupa vaksin bivalen karena ikan bawal bintang merupakan salah satu ikan air laut yang sering terserang bakteri *Vibrio* sp. Pemberian vaksinasi yang dilakukan secara injeksi dapat meningkatkan respon imun secara cepat karena langsung terserap dan diedarkan ke seluruh organ tubuh ikan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian vaksin bivalen *Vibrio parahaemolyticus* dan *Vibrio vulnificus* untuk meningkatkan respon imun ikan bawal bintang. Ikan bawal bintang yang digunakan berukuran 8-10 cm dengan kepadatan 25 individu/kontainer dan terdapat tiga perlakuan yaitu K+ (control); P1 (10^8 CFU/mL); dan P2 (10^9 CFU/mL). Parameter respon imun yang diamati meliputi total leukosit, laju fagositosis, indeks fagositosis, titer antibodi, waktu gejala klinis mulai terlihat, tingkat kelangsungan hidup, *relatif percent survival*, dan *mean time to death*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa parameter respon imun baik nonspesifik maupun spesifik ikan bawal bintang dapat meningkat secara signifikan dengan pemberian vaksinasi bivalen dengan kepadatan 10^8 CFU/mL.

Kata kunci: vaksinasi, respon imun spesifik, respon imun nonspesifik

**PENGARUH PEMBERIAN VAKSIN BIVALEN
Vibrio parahaemolyticus DAN *Vibrio vulnificus* UNTUK PENGENDALIAN
VIBRIOSIS PADA BAWAL BINTANG (*Trachinotus blochii* Lacepede, 1801)
DENGAN METODE INJEKSI**

Oleh

NINDYA LEONITA ANANDA

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA PERIKANAN

pada

**Jurusan Perikanan dan Kelautan
Fakultas Pertanian Universitas Lampung**



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2019**

Judul Skripsi : **Pengaruh Pemberian Vaksin Bivalen *Vibrio parahaemolyticus* dan *Vibrio vulnificus* untuk Pengendalian Vibriosis pada Bawal Bintang (*Trachinotus blochii* Lacepede, 1801) dengan Metode Injeksi**

Nama Mahasiswa : ***Nindya Leonita Ananda***

NPM : 1514111013

Program Studi : Budidaya Perairan

Jurusan : Perikanan dan Kelautan

Fakultas : Pertanian



Esti Harpeni, S. T., MAppSc.
NIP. 197911182002122001

Andrian Garbono, S. Pi., M. Si.
NIP. 19800407 200801 1 020

2. Ketua Jurusan Perikanan dan Kelautan

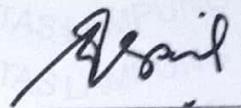
Ir. Siti Hudaidah, M. Sc.
NIP. 196402151996032001



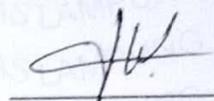
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : **Esti Harpeni, S. T., MAppSc.**

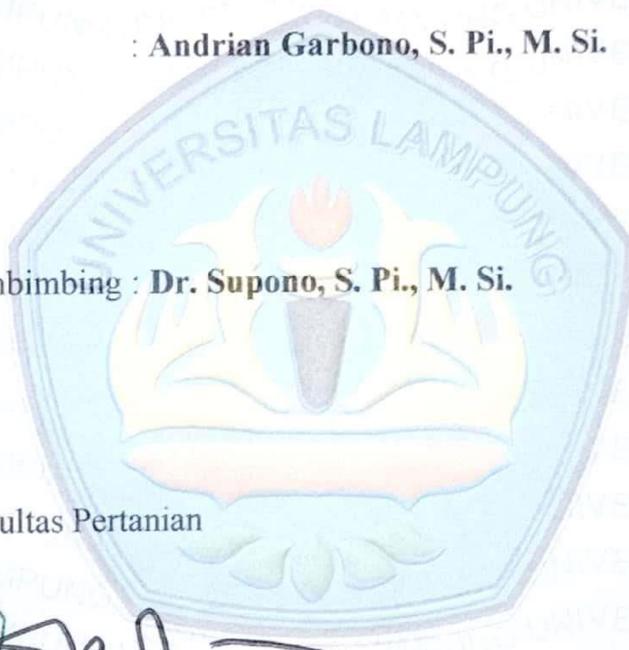
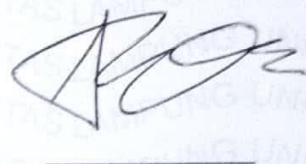


Sekretaris : **Andrian Garbono, S. Pi., M. Si.**



Penguji

Bukan Pembimbing : **Dr. Supono, S. Pi., M. Si.**

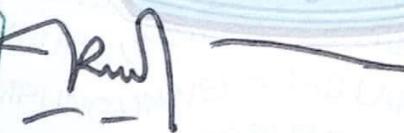


2. Dekan Fakultas Pertanian



Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M. Si.

NIP. 19611020 198603 1 002



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **26 Juli 2019**

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa:

1. Skripsi ini adalah asli dan belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik (Sarjana/ Ahli Madya), baik di Universitas Lampung maupun di perguruan tinggi lainnya.
2. Karya tulis ini murni gagasan, rumusan, dan penelitian saya sendiri, tanpa bantuan pihak lain, kecuali arahan tim pembimbing.
3. Dalam karya tulis ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan naskah, dengan naskah disebutkan nama pengarang dan dicantumkan dalam daftar pustaka.
4. Pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya dan apabila dikemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar yang telah diperoleh karena karya tulis ini serta sanksi lainnya yang sesuai dengan norma yang berlaku di perguruan tinggi ini.

Bandar Lampung, 31 Juli 2019



Nindya Leonita Ananda
NPM. 1514111013

RIWAYAT HIDUP



Nindya Leonita Ananda dilahirkan di Gadingrejo, Pringsewu pada 28 Juli 1997 sebagai anak keempat dari Bapak Yustanto (Alm) dan Ibu Inayati Aena. Penulis memulai pendidikan dari Taman Kanak-Kanak (TK) Pertiwi Gadingrejo (2002-2003), Sekolah Dasar Negeri (SDN) 1 Gadingrejo (2003-2009), Sekolah Menengah Pertama Negeri (SMPN) 1 Gadingrejo (2009-2012), dan Sekolah Menengah Atas Negeri (SMAN) 1 Gadingrejo (2012-2015). Selanjutnya, pada tahun 2015 penulis melanjutkan pendidikan ke perguruan tinggi dan diterima sebagai mahasiswa Program Studi Budidaya Perairan, Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN).

Selama menempuh studi, penulis aktif di organisasi Himpunan Mahasiswa Perikanan dan Kelautan Unila (Himapik) sebagai anggota bidang penelitian dan pengembangan pada tahun 2016/2017 dan menjadi bendahara umum pada tahun 2017/2018. Penulis pernah menjadi asisten dosen mata kuliah Biologi Akuatik, Ikhtiologi, dan Ekologi Perairan pada tahun 2016/2017, Manajemen Kuliatas Air dan Oceanografi Biogeokimia pada tahun 2017/2018. Penulis telah melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Pekon Payung Kecamatan Kotaagung Barat Kabupaten Tanggamus selama 40 hari pada Januari-Maret 2018 dan penulis melaksanakan Praktik Umum (PU) pada Juli-Agustus 2018 di Balai Pengembangan Teknologi Perikanan Budidaya (BPTPB) Cangkringan,

Yogyakarta dengan Judul **“Pembenihan Ikan Nila Merah Nilasa (*Oreochromis sp.*) di Balai Pengembangan Teknologi Perikanan Budidaya (BPTPB) Cangkringan, Yogyakarta”**. Pada tahun 2019, penulis melakukan penelitian dan menyelesaikan tugas akhir dengan menulis skripsi yang berjudul **“Pengaruh Pemberian Vaksin Bivalen *Vibrio parahaemolyticus* dan *Vibrio vulnificus* untuk Pengendalian Vibriosis pada Bawal Bintang (*Trachinotus blochii*, Lacepede 1801) dengan Metode Injeksi”**.

SANWACANA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas berkat, rahmat, hidayah, serta petunjuk-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Pengaruh Pemberian Vaksin Bivalen *Vibrio parahaemolyticus* dan *Vibrio vulnificus* untuk Pengendalian Vibriosis Pada Bawal Bintang (*Trachinotus blochii*, Lacepede 1801) dengan Metode Injeksi” yang merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Perikanan di Universitas Lampung.

Selama proses penyelesaian skripsi, penulis telah memperoleh banyak bantuan dari berbagai pihak. Maka pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M. Si. selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
2. Ir. Siti Hudaidah, M. Sc. selaku Ketua Jurusan Perikanan dan Kelautan Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
3. Limin Santoso, S. Pi., M. Si. selaku Ketua Program Studi Budidaya Perairan Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
4. Esti Harpeni, S. T., M. AppSc. selaku pembimbing utama yang telah membimbing, memberi dukungan, saran, dan ilmu dalam proses penyelesaian skripsi.
5. Andrian Garbono, S.Pi., M.Si. selaku pembimbing pendamping atas kesediaannya memberikan bimbingan, saran dan kritik dalam proses penyelesaian skripsi.

6. Dr. Supono, S.Pi., M.Si., selaku dosen penguji yang telah memberi masukan dan saran dalam penyelesaian skripsi.
7. Tarsim, S.Pi., M.Si. selaku pembimbing akademik atas kesabarannya dalam memberikan bimbingan, ilmu, motivasi, dukungan dan arahan.
8. Bapak dan Ibu dosen Jurusan Perikanan dan Kelautan yang telah memberikan motivasi dan saran selama menjalani studi di Jurusan Perikanan dan Kelautan.
9. Kedua orang tuaku tercinta, Bapak Yustanto (Alm) dan Ibu Inayati Aena atas doa, dukungan, dan motivasi yang diberikan.
10. Keluarga besar yang selalu memberikan dukungan, doa dan semangat serta bantuan demi kelancaran pencapaian ini.
11. Teman-teman Budidaya Perairan angkatan 2015 yang tidak dapat disebutkan satu persatu. Terimakasih untuk saran-saran, perhatian, kebersamaan dan semangat yang diberikan.
12. Semua pihak yang terlibat dalam penyelesaian skripsi yang tidak dapat disebutkan satu persatu.
13. Almamater tercinta Universitas Lampung.

Bandar Lampung, 31 Juli 2019

Penulis

Nindya Leonita Ananda

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang.....	1
B. Tujuan Penelitian	4
C. Manfaat Penelitian	4
D. Kerangka Pemikiran	4
E. Hipotesis	6
II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. Bawal Bintang (<i>Trachinotus blochii</i>)	7
B. Sistem Pertahanan Tubuh Ikan	9
C. Bakteri <i>Vibrio</i>	10
1. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	10
2. <i>Vibrio vulnificus</i>	11
D. Vaksin dan Vaksinasi	12
E. Titer Antibodi	14
F. Parameter Hematologi Darah	15
III. METODE PENELITIAN	
A. Waktu dan Tempat Penelitian.....	17
B. Alat dan Bahan.	17
1. Persiapan Awal Penelitian.	17
2. Pembuatan Vaksin.	17
3. Vaksinasi.....	18
4. Titer Antibodi.....	18
5. Total Leukosit.....	18
6. Laju Fagositosis dan Indeks Fagositosis.....	18

7. Analisis Kualitas Air.....	19
C. Rancangan Penelitian.....	19
D. Prosedur Penelitian.	19
1. Tahap Persiapan.....	19
2. Tahap Pelaksanaan.....	21
3. Tahap Pengamatan.....	24
E. Analisis Data.....	29

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Total Leukosit.....	30
B. Laju dan Indeks Fagositosis.	32
C. Titer Antibodi.	38
D. Tingkat Kelangsungan Hidup (TKH).	40
E. <i>Relative Percent Survival</i> (RPS).....	42
F. <i>Mean Time to Death</i> (MTD).....	43
G. Gejala Klinis.	45
H. Kualitas Air.....	47

V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan.....	49
B. Saran.	49

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Rancangan percobaan pemberian vaksin bivalen.....	19
2. Hasil uji titer antibodi ikan setelah uji tantang.....	39
3. Waktu gejala klinis ikan bawal bintang pasca uji tantang.....	45
4. Hasil pengukuran parameter kualitas air	48
5. Uji normalitas total leukosit vaksinasi 1	66
6. Uji homogenitas total leukosit vaksinasi 1	66
7. Uji T total leukosit vaksinasi1 antara perlakuan K dan A.....	66
8. Uji T total leukosit vaksinasi1 antara perlakuan K dan B.....	67
9. Uji T total leukosit vaksinasi1 antara perlakuan A dan B.....	68
10. Ringkasan hasil analisis uji t total leukosit vaksinasi 1 bawal bintang...	68
11. Uji normalitas total leukosit vaksinasi 2.....	69
12. Uji homogenitas total leukosit vaksinasi 2	69
13. Uji t total leukosit vaksinasi 2 antara perlakuan K dan A.....	69
14. Uji t total leukosit vaksinasi 2 antara perlakuan K dan B.....	70
15. Uji t total leukosit vaksinasi 2 antara perlakuan A dan B.....	70
16. Ringkasan hasil analisis uji t pada total leukosit vaksinasi 2 pada bawal bintang	71
17. Uji normalitas total leukosit setelah uji tantang <i>V. parahaemolyticus</i>	71
18. Uji homogenitas total leukosit setelah uji tantang <i>V. parahaemolyticus</i>	71
19. Uji t total leukosit setelah uji tantang <i>V. parahaemolyticus</i> antara perlakuan K dan A	72
20. Uji t total leukosit setelah uji tantang <i>V. parahaemolyticus</i> antara perlakuan K dan B	72

21. Uji t total leukosit setelah uji tantang <i>V. parahaemolyticus</i> antara perlakuan A dan B	73
22. Ringkasan hasil analisis uji t total leukosit bawal bintang yang diuji tantang dengan <i>V. parahaemolyticus</i>	74
23. Uji normalitas total leukosit setelah uji tantang <i>V. vulnificus</i>	74
24. Uji homogenitas total leukosit setelah uji tantang <i>V. vulnificus</i>	74
25. Uji t total leukosit setelah uji tantang <i>V. vulnificus</i> antara perlakuan K dan A	74
26. Uji t total leukosit setelah uji tantang <i>V. vulnificus</i> antara perlakuan K dan B	75
27. Uji t total leukosit setelah uji tantang <i>V. vulnificus</i> antara perlakuan A dan B	76
28. Ringkasan hasil analisis uji t pada total leukosit bawal bintang yang diuji tantang dengan <i>V. vulnificus</i>	76
29. Uji Uji normalitas laju fagositosis vaksinasi 1.....	77
30. Uji homogenitas laju fagositosis vakinasi 1.....	77
31. Uji t laju fagositosis vaksinasi 1 antara perlakuan K dan A	77
32. Uji t laju fagositosis vaksinasi 1 antara perlakuan K dan B.....	78
33. Uji t laju fagositosis vaksinasi 1 antara perlakuan A dan B.....	78
34. Ringkasan hasil uji t laju fagositosis vaksinasi 1 pada bawal bintang.....	79
35. Uji normalitas laju fagositosis vaksinasi 2.....	79
36. Uji homogenitas laju fagositosis vaksinasi 2	79
37. Uji t laju fagositosis vaksinasi 2 antara perlakuan K dan A	79
38. Uji t laju fagositosis vaksinasi 2 antara perlakuan K dan B.....	80
39. Uji t laju fagositosis vaksinasi 2 antara perlakuan A dan B.....	81
40. Ringkasan hasil uji t laju fagositosis vaksinasi 2 pada bawal bintang.....	81
41. Uji normalitas laju fagositosis vaksinasi setelah uji tantang <i>V. parahaemolyticus</i>	82
42. Uji homogenitas laju fagositosis setelah uji tantang <i>V. parahaemolyticus</i>	82

43. Uji t laju fagositosis setelah uji tantang <i>V. parahaemolyticus</i> antara perlakuan K dan A	82
44. Uji t laju fagositosis setelah uji tantang <i>V. parahaemolyticus</i> antara perlakuan K dan B	83
45. Uji t laju fagositosis setelah uji tantang <i>V. parahaemolyticus</i> antara perlakuan A dan B	83
46. Ringkasan hasil uji t laju fagositosis setelah uji tantang <i>V. parahaemolyticus</i> pada bawal bintang	84
47. Uji normalitas laju fagositosis vaksinasi setelah uji tantang <i>V. vulnificus</i>	84
48. Uji homogenitas laju fagositosis vaksinasi setelah uji tantang <i>V. vulnificus</i>	84
49. Uji t laju fagositosis setelah uji tantang <i>V. vulnificus</i> antara perlakuan K dan A	85
50. Uji t laju fagositosis setelah uji tantang <i>V. vulnificus</i> antara perlakuan K dan B	85
51. Uji t laju fagositosis setelah uji tantang <i>V. vulnificus</i> antara perlakuan A dan B	86
52. Ringkasan hasil uji t laju fagositosis setelah uji tantang <i>V. vulnificus</i> pada ikan bawal bintang.....	87
53. Uji Uji normalitas indeks fagositosis vaksinasi 1	87
54. Uji homogenitas indeks fagositosis vakinasasi 1	87
55. Uji t indeks fagositosis vaksinasi 1 antara perlakuan K dan A.....	87
56. Uji t indeks fagositosis vaksinasi 1 antara perlakuan K dan B	88
57. Uji t indeks fagositosis vaksinasi 1 antara perlakuan A dan B	89
58. Ringkasan hasil uji t indeks fagositosis vaksinasi 1 pada ikan bawal bintang.....	89
59. Uji normalitas indeks fagositosis vaksinasi 2	89
60. Uji homogenitas indeks fagositosis vaksinasi 2.....	90
61. Uji t aktivitas indeks vaksinasi 2 antara perlakuan K dan A	90
62. Uji t aktivitas indeks vaksinasi 2 antara perlakuan K dan B.....	90
63. Uji t aktivitas indeks vaksinasi 2 antara perlakuan A dan B.....	91

64. Ringkasan hasil uji t indeks fagositosis vaksinasi 2 pada ikan bawal bintang.....	92
65. Uji normalitas indeks fagositosis vaksinasi setelah uji tantang <i>V. parahaemolyticus</i>	92
66. Uji homogenitas indeks fagositosis setelah uji tantang <i>V. parahaemolyticus</i>	92
67. Uji t indeks fagositosis setelah uji tantang <i>V. parahaemolyticus</i> antara perlakuan K dan A	92
68. Uji t indeks fagositosis setelah uji tantang <i>V. parahaemolyticus</i> antara perlakuan K dan B	93
69. Uji t indeks fagositosis setelah uji tantang <i>V. parahaemolyticus</i> antara perlakuan A dan B	94
70. Ringkasan hasil uji t indeks fagositosis setelah uji tantang <i>V. parahaemolyticus</i> pada ikan bawal bintang	94
71. Uji normalitas indeks fagositosis vaksinasi setelah uji tantang <i>V. vulnificus</i>	95
72. Uji homogenitas indeks fagositosis vaksinasi setelah uji tantang <i>V. vulnificus</i>	95
73. Uji t indeks fagositosis setelah uji tantang <i>V. vulnificus</i> antara perlakuan K dan A	95
74. Uji t indeks fagositosis setelah uji tantang <i>V. vulnificus</i> antara perlakuan K dan B	96
75. Uji t indeks fagositosis setelah uji tantang <i>V. vulnificus</i> antara perlakuan A dan B	96
76. Ringkasan hasil uji t indeks fagositosis setelah uji tantang <i>V. vulnificus</i> pada ikan bawal bintang.....	97

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kerangka pikir penelitian.....	5
2. Ikan bawal bintang.....	7
3. <i>V. parahaemolyticus</i>	11
4. <i>V. vulnificus</i>	12
5. <i>Time line</i> penelitian.....	23
6. <i>Microdilution plate</i>	27
7. Total leukosit ($\times 10^6$ sel/mm ³) bawal bintang.....	31
8. Laju fagositosis (%) bawal bintang.....	33
9. Mekanisme kerja sel fagositosis	35
10. Indeks fagositosis bawal bintang	37
11. Tingkat kelangsungan hidup	41
12. <i>Relative percent survival</i>	42
13. Kematian kumulatif ikan yang diinfeksi <i>V. parahaemolyticus</i>	44
14. Kematian kumulatif ikan yang diinfeksi <i>V. vulnificus</i>	44
15. <i>Mean time to death</i> ikan bawal bintang pasca ujiantang	44

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Pembuatan media TSA (<i>Trypticase Soy Agar</i>)	58
2. Pembuatan media APW (<i>Alkaline Pepton Water</i>)	58
3. Pembuatan 0,6% formalin fisiologis	58
4. Pembuatan 0,3% formalin fisiologis	59
5. Pembuatan larutan PBS (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)	59
6. Pembuatan larutan PBS Tween	59
7. Pembuatan larutan HBSS (<i>Hanks' Balanced Salts</i>)	59
8. Pembuatan percoll	59
9. Pembuatan larutan Giemsa	60
10. <i>McFarland standard</i>	60
11. Perhitungan total leukosit	61
12. Pengamatan total leukosit	62
13. Pengamatan laju dan indeks fagositosis.....	63
14. Pengamatan titer antibodi	64
15. Gejala klinis ikan bawal bintang	65
16. Hasil uji statistik total leukosit.....	66
17. Hasil uji statistik laju fagositosis	77
18. Hasil uji statistik indeks fagositosis	87

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Bawal bintang (*Trachinotus blochii*) merupakan salah satu spesies ikan air laut yang dapat dikembangkan dalam usaha budidaya. Budidaya ini dapat dikembangkan karena memiliki nilai ekonomis yang cukup tinggi di pasar lokal maupun ekspor. Untuk mencukupi produksi pasar secara berkelanjutan maka perlu dilakukan budidaya yang memiliki tingkat produktivitas tinggi sehingga kebutuhan pangsa pasar juga tercukupi dengan baik (Retnani & Abdulgani, 2013). Namun, budidaya bawal bintang terkendala pada serangan penyakit yang dapat mengganggu kegiatan budidaya dan menurunkan tingkat produksi ikan tersebut.

Penyakit yang menyerang ikan budidaya baik ikan air tawar maupun ikan air laut disebabkan karena interaksi antara inang, patogen, dan lingkungan. Ketiga faktor tersebut akan menimbulkan dampak negatif bila dalam keadaan yang kurang optimal. Selain itu, timbulnya penyakit pada ikan dapat disebabkan oleh kualitas pakan yang rendah, kualitas induk yang kurang baik, kondisi perairan yang kurang optimal, teknik budidaya yang digunakan kurang tepat, dan kontaminasi alat-alat yang digunakan (Chatterjee & Haldar, 2012).

Penyakit yang menyerang ikan budidaya berasal dari mikroorganisme patogen seperti virus, bakteri, dan parasit (Adams & Thompson, 2006). Pada budidaya ikan air laut lebih banyak ditemukan infeksi bakteri, salah satunya yaitu bakteri *Vibrio* sp. Bakteri ini sangat umum dijumpai di air laut yang dapat menyebabkan penyakit vibriosis pada hewan akuatik termasuk ikan (Desrina *et al.*, 2011). Beberapa spesies *Vibrio* sp. yang dapat menyebabkan infeksi vibriosis diantaranya *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, dan *V. vulnificus*. Infeksi bakteri ini dapat terjadi pada semua stadia ikan dan menyerang hampir semua jenis ikan laut yang dibudidayakan (Krishnika & Ramasamy, 2014). Akan tetapi, spesies dari bakteri *Vibrio* yang banyak menyerang dan memiliki tingkat keganasan tertinggi pada organisme laut yaitu *V. parahaemolyticus* dan *V. vulnificus* (Sugianto *et al.*, 2017).

Dampak negatif dari infeksi bakteri *Vibrio* sp. terhadap sistem budidaya yaitu mengakibatkan penurunan status kesehatan ikan hingga menyebabkan kematian yang pada akhirnya akan menurunkan kualitas dan kuantitas produk budidaya yang dihasilkan. Kematian ikan air laut yang terserang vibriosis dapat mencapai 70% pada semua stadia sehingga menimbulkan kerugian besar pada budidaya perikanan (Sarjito *et al.*, 2009). Dampak tersebut dapat dicegah dengan beberapa hal antara lain penerapan *biosecurity* secara ketat, penggunaan antibiotik, pemberian probiotik, dan vaksinasi. Penggunaan bahan kimia seperti antibiotik masih dilakukan dalam kegiatan budidaya (Novriadi *et al.*, 2010). Akan tetapi, penggunaan antibiotik mulai dihindari karena berdampak negatif, seperti adanya residu dalam tubuh ikan, timbulnya resistensi bakteri, menyebabkan pencemaran

lingkungan, dan dapat menjadi salah satu penyebab penolakan ekspor negara lain (Soeripto, 2002).

Salah satu solusi yang dapat dilakukan untuk menghindari penggunaan antibiotik adalah vaksinasi. Vaksin berasal dari suatu jasad patogen yang telah dilemahkan atau dimatikan dengan tujuan untuk meningkatkan pertahanan ikan atau menimbulkan kekebalan terhadap suatu penyakit tertentu (Utomo, 2001). Cara ini dapat dilakukan dalam kegiatan budidaya untuk pencegahan penyakit ikan karena aman bagi ikan, manusia, dan lingkungan yang dapat diberikan secara injeksi. Vaksin juga memiliki beberapa keuntungan dibandingkan dengan antibiotik, yaitu efek samping relatif tidak ada atau kecil baik terhadap ikan maupun lingkungan, dapat meningkatkan respon imunitas yang memberikan perlindungan cukup tinggi, dan dapat bertahan lama untuk melindungi ikan dari infeksi selama pemeliharaan.

Pemberian vaksin secara injeksi adalah salah satu teknik yang dapat dilakukan untuk vaksinasi karena aman dari kerusakan. Selain itu, vaksin yang diberikan secara injeksi dapat terserap seluruhnya di dalam tubuh oleh darah dan diedarkan ke organ-organ tubuh seperti ginjal, hati, dan limfa sehingga pembentukan kekebalan tubuh berlangsung lebih cepat (Setiawan, 2012). Berdasarkan uraian tersebut, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh vaksin bivalen *V. parahaemolyticus* dan *V. vulnificus* secara injeksi untuk pengendalian vibriosis pada bawal bintang.

B. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian vaksin bivalen *V. parahaemolyticus* dan *V. vulnificus* untuk meningkatkan respon imun bawal bintang dengan metode injeksi.

C. Manfaat Penelitian

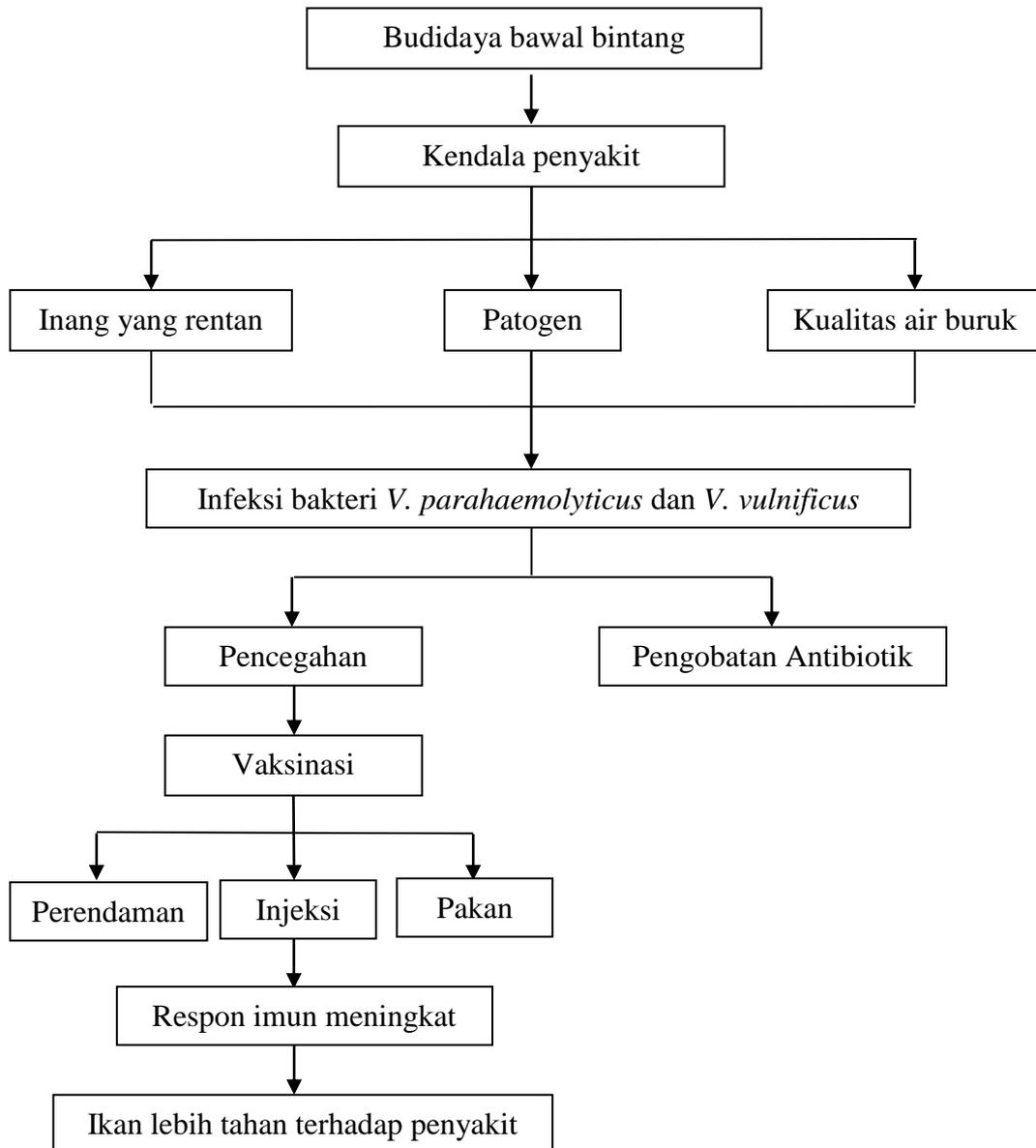
Penelitian ini bermanfaat untuk memberikan informasi tentang dosis yang sesuai untuk pemberian vaksin bivalen *V. parahaemolyticus* dan *V. vulnificus* yang diberikan secara injeksi pada bawal bintang.

D. Kerangka Pemikiran

Kegiatan budidaya bawal bintang mengalami beberapa kendala antara lain karena penyakit. Timbulnya penyakit disebabkan oleh inang yang rentan, adanya patogen, dan kualitas air yang kurang optimal. Adanya patogen menjadi penyebab terbesar kerugian pada budidaya. Pada budidaya bawal bintang, penyakit yang sering menyerang disebabkan oleh bakteri (Chatterjee & Haldar, 2012). Bakteri patogen yang banyak menyerang ikan air laut dan dapat menyebabkan kematian adalah bakteri *Vibrio* sp. (Oliver *et al.*, 2013). Bakteri ini dapat menyebabkan vibriosis pada bawal bintang sehingga menimbulkan tingkat kematian yang cukup tinggi.

Pencegahan penyakit perlu dilakukan dengan menggunakan metode yang aman, baik bagi ikan, manusia maupun lingkungan. Salah satu pencegahan penyakit yang dapat dilakukan yaitu vaksinasi. Vaksinasi merupakan salah satu upaya penanggulangan penyakit pada hewan (termasuk ikan) dengan cara pemberian

vaksin ke dalam tubuh agar memiliki ketahanan terhadap serangan penyakit (Soeripto, 2002). Oleh karena itu, penelitian ini akan dilakukan dengan menggunakan vaksin bivalen yang diberikan secara injeksi pada bawal bintang.



Gambar 1. Kerangka pikir penelitian.

E. Hipotesis

H_0 : Perbedaan dosis pemberian vaksin bivalen secara injeksi tidak berpengaruh terhadap respon imun awal bintang.

H_1 : Perbedaan dosis pemberian vaksin bivalen secara injeksi berpengaruh terhadap respon imun awal bintang.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Bawal Bintang (*Trachinotus blochii*)

Klasifikasi ikan bawal bintang menurut Lacepede (1801) yaitu:

- Filum : Chordata
Kelas : Pisces
Subkelas : Actinopterygii
Ordo : Perciformes
Famili : Charcidae
Genus : *Trachinotus*
Species : *Trachinotus blochii*



Gambar 2. Bawal bintang (*Trachinotus blochii*)

Bawal bintang merupakan ikan yang termasuk ke dalam kelompok pemakan segala (omnivora) tetapi cenderung pemakan daging (karnivora). Hal tersebut dapat terlihat dari bentuk giginya yang tajam. Ikan ini termasuk ke dalam ikan predator perenang cepat yang pada saat juvenil hidup secara bergerombol, namun setelah besar hidup secara soliter (KKP, 2014). Bawal bintang memiliki tubuh yang gepeng dan ramping dengan ekor bercagak. Tubuh bagian lateral dan ventral berwarna putih keperakan sedangkan bagian dorsal berwarna keabu-abuan. Permukaan tubuhnya ditutupi oleh sisik kecil bertipe sisir (stenoid) dan memiliki gurat sisi melengkung mengikuti profil punggung (Setiadharna, 2013). Ikan ini dapat dikatakan matang gonad jika berukuran lebih dari 1 kg dengan panjang lebih dari 25 cm dan berumur sekitar 3 tahun (Hartanto, 2009).

Menurut Kementerian Kelautan dan Perikanan (2014), ikan bawal bintang memiliki habitat alami pada air laut murni atau salinitas normal, namun ikan ini juga dapat hidup di perairan payau. Pada saat juvenil, bawal bintang hidup bergerombol di daerah muara sungai dan berkarang namun setelah besar hidup secara soliter di daerah karang maupun laut lepas. Juvenil merupakan fase dimana ikan secara morfologi, fisiologi dan ekologi telah mirip dengan fase dewasa namun belum produktif. Biasanya ikan bawal bintang hidup di daerah terumbu karang, dekat pantai dan bebatuan di perairan tropis. Kualitas air yang optimum untuk pertumbuhan bawal bintang yaitu memiliki kecepatan arus 20-40 cm/detik, suhu 28-32°C, salinitas 29-32 ppt, pH 6,8-8,4, oksigen terlarut 5-7 mg/L, kedalaman 5-15 m, dan tinggi gelombang < 0,5-1 m.

Bawal bintang dapat dibudidayakan karena termasuk ke dalam hewan pemakan segala. Pakan alami yang biasa dimakan oleh bawal bintang yaitu kerang laut, siput, dan invertebrata lainnya. Pada budidaya, bawal bintang tergolong ikan pelagis yang selalu bergerak aktif (berputar) di permukaan, sehingga dalam kegiatan budidaya harus difasilitasi dengan lokasi dan tempat yang cukup memadai (KKP, 2014).

B. Sistem Pertahanan Tubuh Ikan

Ikan merupakan salah satu jenis hewan yang memiliki mekanisme pertahanan diri terhadap patogen. Pada ikan teleostei terdapat dua macam mekanisme pertahanan tubuh yaitu sistem imun alamiah (*innate immunity*) yang bersifat non spesifik dan sistem imun dapatan (*adaptive immunity*) yang bersifat spesifik. Sistem imun dapatan (*adaptive immunity*) ini dapat dibedakan lagi menjadi dua, yaitu imunitas humoral dan imunitas seluler (Almendras, 2001). Mekanisme dasar respon sistem imun untuk mempertahankan tubuh dari infeksi bakteri yaitu dengan netralisasi toksin atau enzim oleh antibodi, pemusnahan oleh antibodi, komplemen dan lisozim, penelanan dan penghancuran bakteri serta penelanan dan penghancuran intraselular bakteri oleh makrofag yang diaktifasi (Tizard, 1982).

Sistem pertahanan tubuh adaptif dapat diperoleh dari pemberian vaksin pada ikan. Salah satu peranan dari pemberian vaksin pada ikan yaitu dengan menghasilkan antibodi. Antibodi merupakan protein yang digunakan sebagai sistem imun untuk mengenali dan menetralsasi benda asing seperti bakteri. Sedangkan antigen adalah suatu bahan yang dapat merangsang respon imun suatu ikan khususnya pada

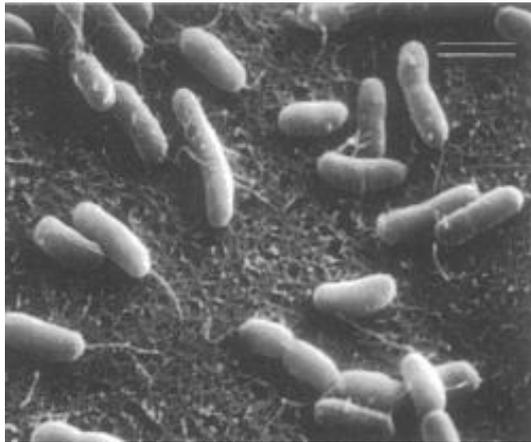
produksi antibodi. Antigen dapat berupa protein atau polisakarida dan beberapa tipe molekul yang disebut sebagai protein karier (Thomas, 2004).

C. Bakteri Vibrio

Bakteri *Vibrio* merupakan bakteri yang sangat umum ditemui di perairan payau dan laut terutama *V. parahaemolyticus* dan *V. vulnificus* (Sugianto *et al.*, 2017). Bakteri ini dapat menimbulkan kematian mencapai 100% pada organisme air laut yang terserang. Secara umum, ikan yang terinfeksi bakteri *V. parahaemolyticus* dan *V. vulnificus* menunjukkan gejala klinis awal tidak nafsu makan, berenang miring, insang pucat, dan borok atau luka pada permukaan tubuh yang makin hari makin membesar. Sebagian pula ikan yang terserang bakteri ini dapat mati tanpa adanya gejala klinis eksternal (Desrina *et al.*, 2011).

1. *Vibrio parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus adalah salah satu spesies bakteri dari famili Vibrionaceae yang merupakan bakteri Gram negatif berwarna hijau, berbentuk batang, anaerob fakultatif, tidak membentuk spora, pleomorfik, bersifat motil dengan single polar flagellum (Gambar 3). Bakteri ini merupakan bakteri halofilik yang tumbuh optimum pada media berkadar garam 3%, dapat tumbuh pada suhu 10-44°C, kisaran pH yaitu 4,8-11, dan tidak memfermentasi sukrosa dan laktosa. Hal ini yang membedakan bakteri *V. parahaemolyticus* dengan *Vibrio* lainnya (Lake *et al.*, 2003).

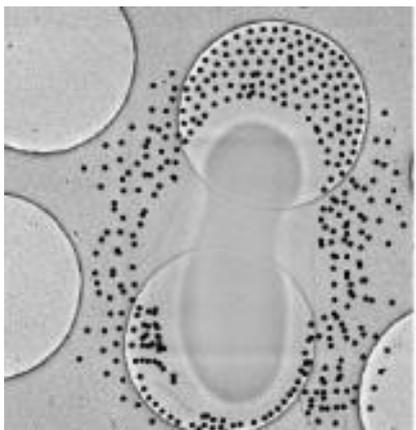


Gambar 3. *V. parahaemolyticus*
Sumber: (Belas & Colwell, 1981)

Keberadaan *V. parahaemolyticus* di lingkungan perairan dipengaruhi oleh musim, lokasi, dan kualitas air pada media budidaya. Suhu perairan merupakan faktor penting untuk mengontrol tingkat *V. parahaemolyticus* pada lingkungan, dimana dapat terjadi peningkatan jumlah bakteri pada suhu 10-30°C. Studi ekologi menyebutkan bahwa *V. parahaemolyticus* dapat bertahan hidup pada biota perairan (plankton, kekerangan, krustasea, ikan) dan sedimen selama musim dingin dan akan terlepas ke perairan saat suhu meningkat pada awal musim panas. Densitas bakteri dapat meningkat pada suhu perairan mencapai 25°C. Hal tersebut menunjukkan bahwa ada korelasi positif antara jumlah *V. parahaemolyticus* dengan peningkatan suhu dan populasi tertinggi pada saat musim panas (Duan & Su, 2005).

2. *Vibrio vulnificus*

V. vulnificus adalah bakteri yang bebas melekat pada mikroba heterotrofik dan banyak ditemukan di lingkungan muara maupun pesisir (Gambar 4).



Gambar 4. *V. vulnificus*
Sumber: (Hampton *et al.*, 2017)

Bakteri ini merupakan bakteri Gram negatif yang memiliki warna biru sampai hijau, berdiameter 2-3 mm, dan hidup pada salinitas 5-25 ppt dengan suhu lebih dari 15°C. *Vibrio* ini memiliki tingkat patogenitas yang cukup tinggi dan merupakan penyebab kematian terbesar pada makanan laut (Oliver *et al.*, 2013). Menurut Evans *et al.* (2006), bakteri *V. vulnificus* memiliki kemampuan untuk menyebabkan penyakit pada budidaya ikan jenis ekonomis penting dan menyebabkan infeksi berat pada manusia setelah mengonsumsi makanan laut yang terkontaminasi *V. vulnificus*.

D. Vaksin dan Vaksinasi

Vaksin adalah suatu antigen yang berasal dari suatu jasad patogen yang telah dimatikan atau dilemahkan yang ditujukan untuk meningkatkan kekebalan tubuh suatu organisme. Vaksin dapat diberikan pada ikan sebagai pemicu kekebalan aktif terhadap suatu jenis penyakit. Sedangkan vaksinasi adalah salah satu upaya yang dilakukan untuk menanggulangi penyakit pada hewan (termasuk ikan) dengan cara pemberian vaksin ke dalam tubuh ikan agar memiliki ketahanan terha-

dapat suatu jenis penyakit. Vaksinasi terbagi menjadi dua jenis yaitu vaksinasi aktif dan vaksinasi pasif. Vaksinasi aktif adalah pembentukan antibodi akibat pajanan ke suatu antigen, sedangkan vaksinasi pasif adalah imunitas yang diperoleh segera setelah menerima antibodi yang sudah dikenal. Upaya penanggulangan penyakit dengan cara vaksinasi memiliki beberapa kelebihan yaitu tidak meninggalkan residu di dalam tubuh ikan, tidak menyebabkan resistensi bakteri, dan biaya yang dikeluarkan relatif lebih murah (Soeripto, 2002).

Prinsip dasar vaksinasi pada ikan adalah memasukkan antigen yang diperoleh dari jasad patogen yang telah dihilangkan patogenitasnya, dimatikan atau hanya dilemahkan yang dimasukkan ke dalam tubuh ikan. Vaksin diberikan untuk merangsang sel-sel limfosit membentuk antibodi, sehingga ketika patogen menyerang maka tubuh akan memperetahankan diri dari serangan patogen tersebut. Respon pertahanan tubuh ini akan berlangsung cukup lama dikarenakan tubuh ikan memiliki memori terhadap patogen tersebut (Darmono, 2007).

Aplikasi pemberian vaksin pada ikan dapat dilakukan dengan beberapa cara diantaranya yaitu perendaman, oral, dan injeksi. Metode perendaman cukup efektif dilakukan pada ikan-ikan kecil karena lebih praktis dan dapat mengurangi stres pada ikan. Akan tetapi, pada perendaman akan mengalami proses yang panjang dengan masuk terlebih dahulu ke saluran pencernaan, kemudian baru terjadi proses penyerapan oleh pembuluh darah dan disalurkan ke seluruh tubuh (Johnny *et al.*, 2014). Pemberian vaksin secara oral dapat merusak antigen pada sistem pencernaan yang disebabkan oleh pH rendah sehingga vaksin harus diberikan pe-

lapisan agar dapat digunakan dengan baik dan tidak rusak oleh asam lambung (Fandina, 2012). Sedangkan metode yang sering digunakan dalam pengaplikasian vaksinasi yaitu dengan cara penyuntikan pada bagian *intraperitoneal* (IP). Metode ini lebih efektif karena vaksin langsung diserap oleh pembuluh darah kapiler (Johnny *et al.*, 2014).

Penyuntikan dapat dilakukan dengan menyisipkan jarum disebelah lateral di depan anus dan dilakukan dengan hati-hati agar tidak terjadi penetrasi pada organ dalam. Cara ini banyak dilakukan karena lebih cepat mengabsorpsi antigen sehingga cepat membentuk antibodi, akan tetapi tidak jarang terjadi kerusakan di daerah otot. Sedangkan vaksinasi secara oral dapat dilakukan dengan cara memasukkan vaksin dalam mulut ikan atau dengan pencampuran pakan sehingga dimakan oleh ikan. Untuk metode perendaman dilakukan dengan menambahkan vaksin dalam wadah seperti baskom dengan pemberian aerasi kuat agar vaksin dapat diserap oleh ikan (Passarela, 2006).

E. Titer Antibodi

Titer antibodi merupakan pengukuran berapa banyak antibodi yang dihasilkan oleh organisme. Pengukuran ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh vaksinasi terhadap jumlah antibodi dalam serum ikan (Fandina, 2012). Hal ini mencerminkan kemampuan tubuh ikan terhadap infeksi bakteri melalui respon imun spesifik. Semakin tinggi nilai titer antibodi maka diharapkan kemampuan perlindungan terhadap infeksi bakteri juga semakin tinggi. Antibodi yang beredar dalam sirkulasi akan menetralsasi molekul antifagositik dan eksotoksin lainnya

yang diproduksi oleh bakteri. Mekanisme ini terjadi melalui dua cara, yaitu melalui kombinasi antibodi didekat lokasi biologi aktif infeksi dan melalui kombinasi antibodi yang terletak jauh dari lokasi biologi aktif infeksi. Ikatan kompleks antibodi akan membuat toksin tidak dapat berdifusi sehingga rawan terhadap fagositosis, terutama bila ukuran kompleks membesar karena deposisi komplemen pada permukaan bakteri akan semakin bertambah (Skinner, 2009).

F. Parameter Hematologi Darah

Pemeriksaan darah merupakan salah satu hal penting yang dilakukan untuk memastikan diagnosa suatu penyakit, yang dianggap dapat membuat penyimpangan anatomi, hematologis, dan sistem kebal ikan. Darah yang mengalami perubahan dapat menentukan kondisi ikan dan status kesehatannya. Menurut Alamanda *et al.* (2007), monosit berfungsi sebagai fagosit terhadap benda-benda asing yang dapat berperan sebagai agen penyakit. Limfosit berfungsi sebagai penghasil antibodi untuk kekebalan tubuh dari gangguan penyakit. Sedangkan neutrofil dalam darah berperan dalam respon kekebalan terhadap serangan patogen yang memiliki sifat fagositik. Neutrofil dapat berperan sebagai pertahanan utama dalam tubuh yang akan meningkat apabila terjadi infeksi.

Leukosit merupakan salah satu komponen sel darah yang berfungsi sebagai pertahanan non spesifik yang akan mengeliminasi patogen melalui fagositosis. Total leukosit yang ada pada ikan merupakan salah satu indikasi adanya fase pertama infeksi, stres, ataupun leukimia (Zainun, 2007). Perubahan nilai total leukosit dan jenis leukosit pada ikan dapat dijadikan sebagai indikator adanya penyakit infeksi

tertentu yang terjadi pada ikan. Selain total leukosit, parameter darah lain yang berkaitan dengan kondisi ikan adalah laju fagositosis. Laju ini merupakan bentuk pertahanan non spesifik yang dilakukan oleh makrofag. Meningkatnya aktivitas fagositosis menunjukkan keadaan permulaan infeksi pada ikan dan akan menurun jika dalam kondisi infeksi kronis (Indriastuti, 2006).

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Januari-Maret 2019 di Balai Besar Perikanan Budidaya Laut (BBPBL) Lampung.

B. Alat dan Bahan

1. Persiapan Awal Penelitian

- a. Alat : Bak kontainer ukuran 60 x 40 x 40 cm³ sebanyak 9 buah dengan volume air 72 L, aerator, selang aerasi, dan batu aerator.
- b. Bahan : Ikan bawal bintang berukuran panjang total 8-10 cm, isolat bakteri *V. vulnificus* dan *V. parahaemolyticus*, serta pakan komersil.

2. Pembuatan Vaksin

- a. Alat : Cawan petri, tabung reaksi, jarum ose, spektrofotometer, *hot plate*, *spreader*, erlenmeyer, micropipet, bunsen, sentrifuge, botol falcon, inkubator, *autoclave*, *magnetic stirrer*, laminar air flow, dan vortex.
- b. Bahan : Media TSA (*Trypticase Soy Agar*) (CM0131, OXOID™) (Lampiran 1), media APW (*Alkaline Pepton Water*) (Lampiran 2), formalin 0,6% (Lampiran 3), formalin 0,3% (Lampiran 4), alkohol 70%, NaCl, isolat bakteri *V. parahaemolyticus* dan *V. vulnificus*, aquades, dan PBS (*Phospat*

Buffer Saline) (Lampiran 5).

3. Vaksinasi

- a. Alat : Sduit 1 mL (26G x ½”), selang aerasi, batu aerasi, aerator, alat penangkap ikan, dan baskom.
- b. Bahan : Ikan bawal bintang berukuran panjang total 8-10 cm, vaksin inaktif *V. parahaemolyticus* dan *V. vulnificus*.

4. Titer Antibodi

- a. Alat : *Microdillution plate*, mikropipet, alat bedah, mikrotube, pipet tetes, refrigerator, tissue eruptor, dan sentrifuge.
- b. Bahan : Ikan bawal bintang, larutan PBS Tween (Lampiran 6), dan vaksin *Vibrio bivalen*.

5. Total Leukosit

- a. Alat : *Haemocytometer*, sentrifuge, mikroskop, *cell strainer* 100 nm, *culture dish*, mikropipet, dan alat bedah.
- b. Bahan : Larutan HBSS (*Hanks' Balanced Salts*) (SIGMA, H1387) (Lampiran 7), *percoll* (GE healthcare) (Lampiran 8), L-15 medium, ginjal anterior dan limpa ikan sampel.

6. Laju Fagositosis dan Indeks Fagositosis

- a. Alat : *Haemocytometer*, laminar air flow, mikroskop, dan alat bedah.

- b. Bahan : Larutan HBSS (*Hanks' Balanced Salts*) (SIGMA, H1387), *latex beads* (SIGMA, LB8), metanol, larutan Giemsa (Lampiran 9), ginjal anterior dan limpa ikan sampel.

7. Analisis Kualitas Air

- a. Alat : Termometer, pH meter, DO meter, dan refraktometer.
 b. Bahan : Sampel air pemeliharaan bawal bintang dan aquades.

C. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian dilakukan dengan rancangan acak lengkap (RAL) dua perlakuan dan satu kontrol dengan tiga kali ulangan yang masing-masing berisi 25 ekor/72 L (SNI 7901.4, 2013). Semua perlakuan pemberian vaksin dilakukan secara injeksi sebanyak 0,1 mL/ekor ikan.

Tabel 1. Rancangan percobaan pemberian vaksin bivalen (Desrina *et al.*, 2011)

Perlakuan	Keterangan
Kontrol (+)	Tanpa pemberian vaksin dan dilakukan ujiantang
Perlakuan A	Pemberian vaksin bivalen dengan kepadatan 10^8 CFU/mL dan dilakukan ujiantang
Perlakuan B	Pemberian vaksin bivalen dengan kepadatan 10^9 CFU/mL dan dilakukan ujiantang

D. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terdiri dari tiga tahapan, yaitu:

1. Tahap Persiapan

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini disterilisasi terlebih dahulu untuk membebaskan dari mikroorganisme kontaminan menggunakan *autoclave*. Prosedur sterilisasi menggunakan *autoclave* adalah:

1. Alat dan bahan yang akan digunakan dibungkus dengan plastik tahan panas untuk mencegah terkena air.
2. Peralatan yang sudah dibungkus kemudian dimasukkan ke dalam *autoclave*.
3. Sterilisasi dilakukan pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

b. Persiapan Wadah dan Ikan Uji

1. Kontainer disiapkan sebanyak 9 buah dengan ukuran 60 x 40 x 40 cm³.
2. Bak kontainer yang akan digunakan disterilisasi dengan cara dicuci dan didesinfeksi menggunakan kaporit 100 ppm kemudian dibilas menggunakan air tawar (Widanarni *et al.*, 2014).
3. Kemudian diisi air laut sebanyak $\frac{3}{4}$ dari volume total yang telah diendapkan selama 24 jam dan diberi aerasi.
4. Bawal bintang dengan ukuran 8-10 cm dimasukkan ke bak kontainer dengan kepadatan 25 ekor/bak.
5. Ikan diaklimatisasi selama 7 hari dalam bak pemeliharaan.

c. Pembuatan Vaksin Inaktif *V. parahaemolyticus* dan *V. vulnificus*

Pembuatan vaksin bivalen mengacu pada Setyawan *et al.* (2012) dengan modifikasi yaitu sebagai berikut:

1. Bakteri *V. parahaemolyticus* dan *V. vulnificus* dibiakkan ke dalam media APW sebanyak 3 ml selama 24 jam.
2. Bakteri diinokulasi pada media TSA sebanyak 1 mL kemudian diinkubasi selama 24 jam.

3. Bakteri dipanen dengan larutan PBS sebanyak 5 mL dan dimasukkan ke dalam botol sentrifuse. Jika sudah homogen maka disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit.
4. Supernatan dibuang dan dicuci kembali menggunakan PBS sebanyak 2 kali.
5. Formalin ditambahkan sebanyak 0,6% dengan perbandingan kepadatan volume bakteri dan formalin 1:1 kemudian dihomogenkan dan diinkubasi selama 24 jam.
6. Uji viabilitas dalam media TSA (jika tumbuh dilakukan inaktivasi ulang dengan diinkubasi kembali hingga bakteri tidak tumbuh, jika tidak tumbuh dilanjutkan dengan sentrifuse menggunakan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit dan suhu 5°C).
7. Penghitungan kepadatan vaksin inaktif dilakukan menggunakan spektrofotometer mengacu pada standar *McFarland* (Lampiran 10).

2. Tahap Pelaksanaan

a. Pemeliharaan Ikan

1. Ikan bawal bintang dipelihara dalam bak kontainer dengan jumlah 25 ekor/bak.
2. Ikan diaklimatisasi selama 7 hari sebelum diberi perlakuan.
3. Ikan diberi pakan menggunakan pelet komersil dengan kandungan protein 46%, lemak 10%, abu 13%, serat kasar 2%, dan kadar air 10% yang berbentuk *crumble* sebanyak 2x sehari dengan FR 2-3% (Putra *et al.*, 2017)

pada pukul 08.00 dan 14.00 WIB (Ashari & Putra, 2015) dan dilakukan penyiponan.

b. Pemberian Vaksin

Pemberian vaksin secara injeksi dilakukan dengan mengacu pada Sari & Setyawan *et al.* (2013), yaitu sebagai berikut:

1. Ikan yang akan diberikan vaksin diambil.
2. Vaksin diberikan melalui injeksi *intraperitoneal* yaitu menyuntikkan sebanyak 0,1 mL/ikan dengan kepadatan 10^8 dan 10^9 CFU/mL ke bagian rongga perut pada hari ke 7 (vaksinasi 1).
3. Ikan yang telah diberi vaksin dipelihara selama dua minggu dengan diberikan pakan pellet komersil sebanyak 2 kali sehari.
4. Vaksinasi kedua (hari ke 21) dilakukan dengan menyuntikkan vaksin yang sama dan dipelihara kembali selama dua minggu
5. Uji tantang dilakukan terhadap ikan yang telah divaksin.
6. Setelah diuji tantang, ikan dipelihara selama 7 hari untuk pengamatan tingkat kelangsungan hidup (TKH), *relative percent survival* (RPS) dan *mean time to death* (MTD).

c. LD50

LD50 dilakukan untuk mengetahui dosis yang akan digunakan dalam uji tan-tang.

Pada uji ini, disiapkan 10 akuarium dengan ukuran $60 \times 40 \times 40$ cm³ yang masing-masing diisi ikan sebanyak 10 ekor. Masing-masing akuarium diberi perlakuan yang berbeda yaitu PBS, 1×10^9 , 5×10^8 , 1×10^8 , dan 5×10^7 untuk 5 akuarium

pemberian *Vibrio vulnificus* dan 5 akuarium pemberian *Vibrio parahaemolyticus*. Kemudian ikan diamati hingga mencapai kematian 50%. Penghitungan LD50 bakteri menurut Hubert (1980) adalah sebagai berikut:

$$m = X_1 + d \frac{50 - \% X_1}{\% X_{1+1} - \% X_1}$$

Keterangan:

m : log LD50

X_1 : log dosis bakteri di bawah LD50

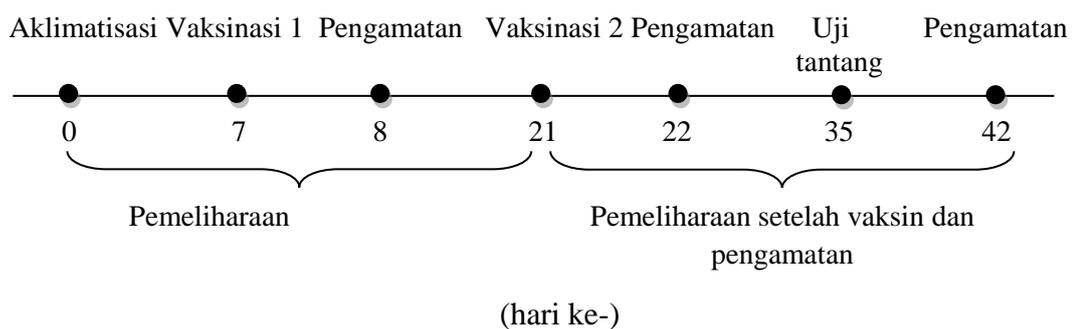
d : selisih log dosis di bawah LD50 dan di atas LD50

$\% X_1$: persentase kematian kumulatif pada dosis di bawah LD50

$\% X_{1+1}$: persentase kematian kumulatif pada dosis di atas LD50

d. Uji Tantang

Uji tantang dilakukan setelah dua minggu pemberian vaksin booster. Uji ini dilakukan secara injeksi ke ikan yang telah divaksinasi dengan konsentrasi yang diperoleh dari hasil LD50.



Gambar 5. *Time line* penelitian

3. Tahap Pengamatan

a. Total Leukosit

Pengujian total leukosit mengacu pada Nan *et al.* (2015) dengan modifikasi sebagai berikut:

1. Leukosit diperoleh melalui sentrifugasi percoll (GE healthcare) 30% dan 50% (Lampiran 8) dengan mengisolasi ginjal anterior dan limpa pada ikan sampel.
2. Kedua organ dihaluskan diatas larutan HBSS (*Hanks' Balanced Salts*) (Lampiran 7) dan disaring menggunakan *cell strainer* dengan ukuran mesh 100 nm, kemudian dimasukkan ke dalam tabung percoll.
3. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 500 g selama 40 menit pada suhu 4°C.
4. Sel leukosit dipanen pada bagian tengah percoll dan dicuci menggunakan HBSS tiga kali dengan sentrifugasi 3000 rpm, 10 menit dengan suhu 4°C.
5. Leukosit dimasukkan ke dalam satu tube dan ditambahkan HBSS lalu disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit dengan suhu 4°C.
6. Supernatan dibuang dan tambahkan L-15 medium sebanyak 1 mL.
7. Leukosit diamati di bawah mikroskop menggunakan *haemocytometer* dengan perhitungan pada empat kotak besar (Lampiran 11).

$$N = \text{Rata-rata jumlah sel} \times \frac{1}{\text{volume kotak besar}} \times \text{Pengenceran}$$

b. Laju Fagositosis dan Indeks Fagositosis

Prosedur pengujian laju fagositosis dan indeks fagositosis menurut Qomariyah *et al.* (2017) dengan modifikasi sebagai berikut:

1. Suspensi leukosit 200 μ L diletakkan di atas gelas objek.
2. Sampel didiamkan selama 90 menit pada laminar air flow.
3. Larutan 200 μ L *latex beads* (1 μ L/5 mL HBSS) ditambahkan di atas lapisan leukosit.
4. Kemudian diamkan kembali selama 30 menit.
5. Gelas objek dicuci dengan 1 ml larutan HBSS.
6. Fiksasi dengan metanol 200 μ l selama 5 menit dan dilanjutkan dengan pencucian menggunakan ddH₂O.
7. Kemudian dilakukan pewarnaan Giemsa (1:20) dan diamkan selama 40 menit.
8. Cuci dengan air mengalir dan diamkan hingga kering.
9. Sampel diamati sebanyak 200 sel di bawah mikroskop.

$$\text{Laju Fagositosis (LF)} = \frac{\text{Jumlah sel fagosit}}{\text{Jumlah sel yang diamati}} \times 100$$

$$\text{Indeks Fagositosis (IF)} = \frac{\text{Jumlah latex beads yang difagositosis}}{\text{Sel fagosit}}$$

c. Titer Antibodi

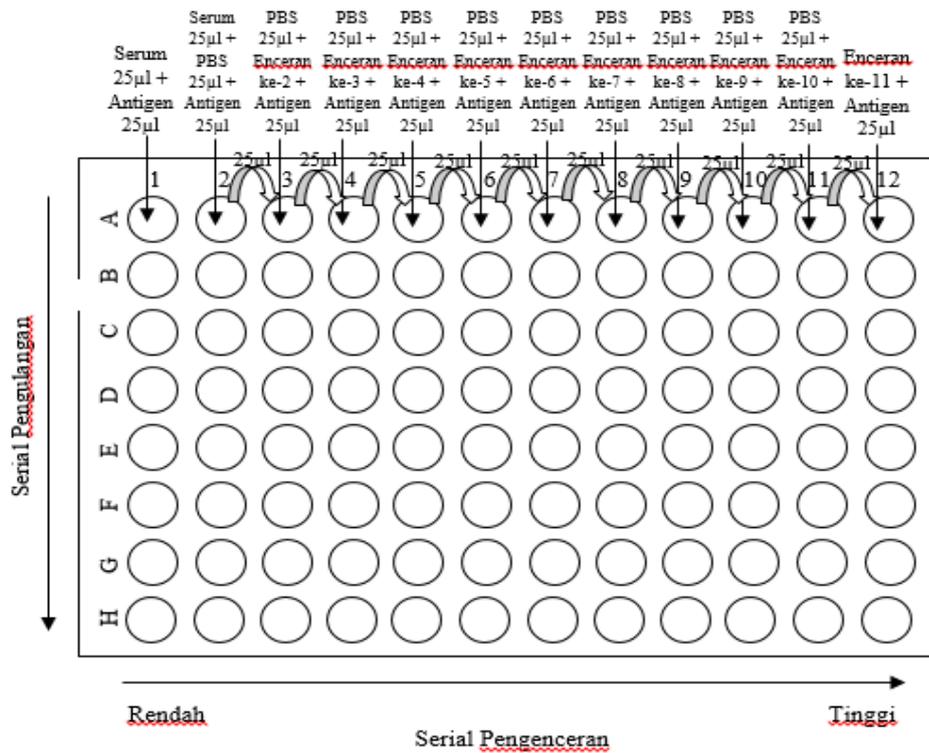
Pemeriksaan titer antibodi dilakukan setelah ujiantang. Prosedur pengujian titer antibodi menurut Bahar *et al.* (2017) adalah sebagai berikut:

1. Serum ikan diperoleh dari daging ikan yang telah diujiantang.
2. Daging ikan diambil dan digerus menggunakan tissue eruptor dalam PBS-Tween dengan perbandingan 1:4.
3. Daging yang telah digerus disentrifuse dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit.
4. Lapisan kedua hasil sentrifuse diambil sebagai serum untuk uji titer antibodi.

5. Serum dipanaskan pada suhu 47°C selama 30 menit.
6. Sampel diuji dengan metode mikroaglutinasi.

Prosedur metode mikroaglutinasi mengacu pada Agustin (2012), yaitu sebagai berikut:

1. Serum dimasukkan ke dalam sumuran *microdillution plate* 1 dan 2 sebanyak 25 μ L.
2. PBS dimasukkan ke sumuran 2-12 (kecuali sumuran ke 11 sebagai pembatas) sebanyak 25 μ L.
3. Sumuran dipipet ulang, dimulai dari sumur 2 hingga dilanjutkan ke sumuran 3 hingga sumuran ke 10.
4. Antigen dimasukkan sebanyak 25 μ L pada sumuran 1-12.
5. *Microdillution plate* digoyang-goyangkan selama \pm 3 menit dengan pola membentuk angka 8 dan huruf S.
6. Hasil diinkubasi dalam refrigerator selama 24 jam.
7. Pengamatan dilakukan dengan melihat reaksi aglutinasi pada masing-masing sumur yang ditandai dengan adanya kabut warna keruh/putih atau dot yang menyebar ke seluruh sumuran.
8. Hasil dicatat berdasarkan reaksi aglutinasi yang terbentuk pada sumuran hingga pengenceran terakhir seperti pada Gambar 6.



Gambar 6. *Microdilution plate*

d. Gejala Klinis

Gejala klinis diamati dengan melihat waktu awal gejala klinis mulai muncul setelah dilakukan ujiantang menggunakan *V. parahaemolyticus* dan *V. vulnificus* yang mengacu pada Desrina *et al.* (2006). Kemudian gejala tersebut dideskripsikan sesuai dengan yang diamati pada awal muncul hingga gejala klinis yang terjadi pada ikan yang mengalami kematian.

e. Tingkat Kelangsungan Hidup (TKH)

Tingkat kelangsungan hidup adalah perbandingan antara jumlah individu yang hidup sampai akhir percobaan dengan jumlah individu pada awal penelitian. Penghitungan jumlah ikan yang mati dilakukan setelah ikan diuji tantang sampai

akhir penelitian. Tingkat kelangsungan hidup ikan dihitung menggunakan rumus berdasarkan Nitimulyo *et al.* (2005):

$$TKH = \frac{N_t}{N_0} \times 100\%$$

Keterangan:

N_t : jumlah ikan hidup pada akhir penelitian (ekor)

N_0 : jumlah ikan pada awal penelitian (ekor)

f. *Relatif Percent Survival (RPS)*

Relative Percent Survival (RPS) merupakan pengamatan jumlah kematian ikan dari masing-masing perlakuan. Menurut Nitimulyo *et al.* (2005) perhitungan RPS dapat dilakukan menggunakan rumus:

$$RPS = 1 - \frac{\text{kematian yang divaksin}}{\text{kematian yang tidak divaksin}} \times 100\%$$

g. *Mean Time to Death (MTD)*

Penghitungan *mean time to death* dilakukan setelah ikan diujiantang sampai akhir penelitian. *Mean time to death* ikan dihitung menggunakan rumus berdasarkan Nitimulyo *et al.* (2005):

$$MTD = \frac{\sum_{i=1}^n a_i b_i}{\sum_{i=1}^n b_i}$$

Keterangan:

a: waktu kematian (jam); b: jumlah ikan yang mati (ekor)

h. Kualitas Air

Parameter kualitas air yang diamati adalah oksigen terlarut, pH, suhu, dan salinitas. Pengukuran parameter kualitas air dilakukan pada awal, tengah dan akhir penelitian.

E. Analisis Data

Data dianalisis menggunakan uji t. Parameter yang dianalisis statistik secara kuantitatif yaitu total leukosit, laju fagositosis, dan indeks fagositosis. Sedangkan yang dianalisis secara deskriptif adalah titer antibodi, tingkat kelangsungan hidup, *relative percent survival*, *mean time to death*, gejala klinis dan kualitas air.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, vaksinasi bivalen *V. parahaemolyticus* dan *V. vulnificus* berpengaruh nyata terhadap peningkatan total leukosit, laju fagositosis, indeks fagositosis, titer antibodi, tingkat kelangsungan hidup, *relative percent survival*, dan *mean time to death* pada bawal bintang. Dosis yang terbaik yaitu 10^8 CFU/mL.

B. Saran

Saran yang dapat diberikan berdasarkan penelitian ini yaitu pembuatan vaksin bivalen *V. parahaemolyticus* dan *V. vulnificus* dapat dilakukan dengan dosis 10^8 CFU/mL yang diberikan ke bawal bintang ukuran 8-10 cm dan diberikan secara injeksi.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, A., & Thompson, K. D. (2006). Biotechnology offers revolution to fish health management. *Trends in Biotechnology*, 24(5), 201-205.
- Affandi, R. & Tang, U. M. (2002). *Fisiologi Hewan Air*. Unri Press. Riau.
- Agustin, D. (2012). Pengaruh perbedaan dosis aplikasi probiotik terhadap respon imun non spesifik ikan mas (*Cyprinus carpio*) dengan ujiantang bakteri *Aeromonas salmonicida*. *Skripsi*. Universitas Lampung.
- Alamanda, I. E., Handajani, N. S., & Budiharjo, A. (2007). Penggunaan metode hematologi dan pengamatan endoparasit darah untuk penetapan kesehatan ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) di kolam budidaya Desa Mangkubumen Boyolali. *Biodiversitas*, 8(1), 34-38.
- Almendras, J. M. E. (2001). *Immunity and Biological Methods of Diseases Prevention and Control*. In *Health Management in Aquaculture* (pp. 111-136). Aquaculture Departement, Southeast Asian Fisheries Development Center.
- Aonullah, A.A., Slamet B.P., & Sarjito. (2013). Pengaruh penggunaan ekstrak daun jeruju (*Acanthus ilicifolius*) terhadap kelulushidupan ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) yang diinfeksi *Vibrio alginolyticus*. *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 2(1), 126-135.
- Ashari, S. A., & Putra, I. (2015). Growth and survival silver pompano (*Trachinotus blochii*, Lacepede) with different stocking density are maintained in floating net cages. *Jurnal Online Mahasiswa Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Riau*, 2(1), 1-10.

- Bahar, S. I., Harpeni, E., & Effendi, E. (2017). Respon imun spesifik larva ikan mas (*Cyprinus carpio*) melalui imunitas maternal yang diberi vaksin inaktif whole cell (*Aeromonas salmonicida*). *Biospecies*, 10(1), 37-43.
- Belas, M. R., & Colwell, R. R. (1981). Scanning electron in microscope observation of the swarming phenomenon of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*, 150(2), 956-959.
- Buller, N. B. (2004). *Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals: A Practical Identification Manual*. CABI Publishing. Western Australia.
- Cech, J. J., & Moyle, P. B. (2000). *Fishes: an Introduction to Ichthyology*. Prentice-Hall.
- Chatterjee, S., & Haldar, S. (2012). *Vibrio* related diseases in aquaculture and development of rapid and accurate identification methods. *Journal Marine Science Res Dev*, 3(1), 1-7.
- Darmono. (2007). *Farmakologi dan Toksikologi Sistem Kekebalan; Pengaruh Penyebab dan Akibatnya Pada Kekebalan Tubuh*. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Desrina., Taslihan, A., Ambariyanto, & Jati, B. K. (2011). Pengaruh dosis terhadap efektivitas vaksin POM *Vibrio alginolyticus* 74 kda pada ikan kerapu macan *Epinephelus fuscoguttatus*. *Indonesian Journal of Marine Sciences*, 16(2), 95-102.
- Desrina., Taslihan, A., Ambariyanto, & Suryaningrum, S. (2006). Uji keganasan bakteri *Vibrio* pada ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Jurnal Ilmu Kelautan*, 11(3), 119-125.
- Duan, J., & Su, Y. C. (2005). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in two oregon oyster-growing bays. *Journal of Food Science*, 70(1), 58-63.
- Evans, J. J., Klesius, P. H., & Shoemaker, C. A. (2006). An overview of *Streptococcus* in warmwater fish. *Aquaculture Health International*, 7, 10-14.

- Fandina, N. S. (2012). Vaksinasi mikrokapsul polivalen *Vibrio alginolyticus* dan *Vibrio parahaemolyticus* pada benih ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*). *Doctoral Dissertation*. Universitas Airlangga.
- Froese, R. & Pauly, D. Editors. (2019). *FishBase*. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version.
- Hadie, W., Angela, L. M., Sularto, & Evi, T. (2010). Imunitas maternal terhadap *Aeromonas hydrophila* pengaruhnya terhadap fekunditas dan daya tetas ikan patin siam (*Pangasionodon hypothalamus*). *Jurnal Riset Akuakultur*, 5(2), 229-235.
- Hampton, C. M., Guerrero-Ferreira, R. C., Storms, R. E., Taylor, J. V., Yi, H., Gulig, P. A., & Wright, E. R. (2017). The opportunistic pathogen *Vibrio vulnificus* produces outer membrane vesicle in a spatially distinct manner related to capsular polysaccharide. *Microbiology in Frontiers*, 8, 1-12.
- Hartanto. (2009). *Teknik Budidaya Ikan Bawal Bintang*. Balai Besar Perikanan Budidaya Laut. Lampung.
- Huang, Z., Tang, J., Li, M., Fu, Y., Dong, C., Zhong, J. F., & He, J. (2012). Immunological evaluation of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio vulnificus* and infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) combined-vaccine efficacy in epinephelus coioides. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 150(1), 61-68.
- Hubert, J. J. 1980. *Bioassay*. Kendall/Hunt Publishing Company. Iowa. USA.
- Indriastuti, L. (2006). Pengaruh penambahan bahan-bahan imunostimulan dalam formulasi pakan buatan terhadap respon imunitas dan pertumbuhan ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*). *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor.
- Johnny, F., & Roza, D. (2004). Pengaruh penyuntikan imunostimulan peptidoglikan terhadap peningkatan tanggap kebal non-spesifik ikan kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus*. *Jurnal Aquaculture Indonesia*, 5(2), 109-105.
- Johnny, F., Roza, D., & Mastuti, I. (2010). Aplikasi imunostimulan untuk meningkatkan imunitas non-spesifik ikan kerapu macan (*Epinephelus*

fuscoguttatus) terhadap penyakit infeksi di hatcheri. *Porsiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur*, 945-949.

Johnny, F., Roza, D., & Zafran, Z. (2014). Efektivitas metoda vaksinasi *flexibacter* pada benih ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) di hatchery. *Berita Biologi*, 13(2), 25-28.

Kementerian Kelautan dan Perikanan. (2014). *Leaflet Pembesaran Ikan Bawal Bintang di Karamba Jaring Apung (KJA)*. Direktorat Usaha Budidaya. Direktorat Jendral Perikanan Budidaya.

Krishnika, A., & Ramasamy, P. (2014). *Legenidium* sp. infection in the larval stages of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (DeMan). *Indian Journal of Fisheries*, 61(2), 110-118.

Kristanto, R. B. (2013). Respon imun dan tingkat kelulushidupan benih ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) yang divaksin secara oral dengan mikrokapsul *formalin killed cell* (FKC) bakteri *Vibrio alginolyticus* menggunakan alginat terhadap infeksi *Vibrio alginolyticus*. *Doctoral Dissertation*. Universitas Airlangga.

Lake, R., Hudson, A., & Cressey, P. (2003). Risk Profile: *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. *Crown Research Institute. Institute of Enviromental Science and Research Limited Christchurch Science Centre*, PO Box, 29, 181.

Nan, F. H., Putra, A., Brite, M., & Lee, M. C. (2015). The effects of *Curcuma zedoaria* and *Zingiber zerumbet* on non-specific immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 14(3), 598-611.

Nikoskelainen, S., Salminen, S., Bylund, G., & Ouweland, A. C. (2001). Characterization of the properties of human and dairy derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Applied Environmental Microbiology*, 67(6), 151-158.

Nitimulyo, K. H., Isnansetyo, A., Triyanto, Istiqomah, I., & Murdjani, M. (2005). Isolasi, identifikasi dan karakterisasi *Vibrio* spp. patogen penyebab vibriosis pada kerapu di Balai Budidaya Air Payau Situbondo. *Jurnal Perikanan*, 8(2), 80-94.

- Nitimulyo, K. H., Isnansetyo, A., Triyanto, Murdjani, M., & Sholichah, L. (2005). Efektivitas vaksin polivalen untuk pengendalian vibriosis pada kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*). *Jurnal Perikanan Universitas Gadjah Mada*, 7(1), 95-100.
- Noercholis, A., Muslim, M. A., & Maftuch. (2013). Ekstraksi fitur roundness untuk menghitung jumlah leukosit dalam citra sel darah ikan. *Jurnal EECCIS*, 7(1), 35-45.
- Novriadi, R., Haryono, M., Kadari, & Darmawan, A. (2010). *Aplikasi Vaksinasi Vibrio Polivalen Melalui Pakan Pada Ikan Kakap Putih Untuk Meningkatkan Imunitas Pada laju Pertumbuhan*. Kementerian Kelautan dan Perikanan Jenderal Perikanan Budidaya Laut Batam. 22hlm.
- Olga, Rini, R. K., Akbar, J., Isnansetyo, A., & Sembiring, L. (2007). Protein *Aeromonas hydrophila* sebagai vaksin untuk pengendalian MAS (*Motile Aeromonas septicemia*) pada jambal siam (*Pangasius hypothalamus*). *Jurnal Perikanan*, 9(1), 17-25.
- Oliver, J. D., Pruzzo, C., Vezzulli, L., & Kaper, J. B. (2013). *Vibrio species*. In Food Microbiology (pp. 401-439). American Society of Microbiology.
- Passarela, M. P. (2006). Uji tantangan pada ikan gurame (*Osphronemus gouramy*) yang diimunisasi dengan vaksin inaktif *Aeromonas hydrophila* peroral melalui pelet. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor.
- Puteri, A. T. E. D., Jusadi, D., & Nuryati, S. (2016). Respon pertumbuhan dan fisiologis ikan bawal *Colossoma macropomum* yang diberi pakan mengandung minyak cengkeh dosis tinggi. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 15(1), 70-879.
- Putra, W. K. A., Hadrianto, R., & Razai, T. S. (2017). Maturation quality of silver pompano fish (*Trachinotus blochii*) gonad by human chorionic gonadotropin (HCG) and pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) hormon. *Jurnal Perikanan Universitas Gadjah Mada*, 19(2), 75-78.
- Qomariyah, N., Suprpto, H., & Sudarno. (2017). Pemberian vaksin formalin killed cell (FKC) *Vibrio alginolyticus* untuk meningkatkan *survival rate* (SR), titer antibodi dan fagositosis leukosit pada kerapu cantang

(*Epinephelus* sp.) setelah uji tantang bakteri *Vibrio alginolyticus*. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 9(1), 15-24.

Retnani, H. T., & Abdulgani, N. (2013). Pengaruh salinitas terhadap kandungan protein dan pertumbuhan ikan bawal bintang (*Trachinotus blochii*). *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 2(2), 177-181.

Rustikawati, I. (2012). Efektivitas ekstrak *Sargassum* sp. terhadap diferensiasi leukosit ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang diinfeksi *Streptococcus iniae*. *Jurnal Akuatika*, 3(2), 125-134.

Sarjito, O. K., Radjasa, Hutabarat, S., & Prayitno, S. B. (2009). Phylogenetic diversity of causative agent of vibriosis associated with groupers fish from Karimunjawa Islands, Indonesia. *Asian Network for Scientific Information*, 2(1), 14-21.

Setiadharna, T. (2013). *Pengamatan Pertumbuhan dan Perkembangan Gonad Calon Induk Bawal Bintang, Trachinotus blochii* (Lacepede) Hasil Budidaya Pada Bak Terkontrol. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Budidaya Laut Gondol. 12hlm.

Setiawan, R. B. (2012). Efektivitas vaksin dari bakteri mycobacterium fortuitum yang diinaktivasi dengan pemanasan untuk pencegahan penyakit Mycobacteriosis pada ikan gurami (*Osphronemus gouramy*). *Jurnal Perikanan dan Kelautan*, 3(1), 2-3.

Setyawan, A., Hudaidah, S., Ronapati, Z. Z., & Sumino, S. (2012). Imunogenisitas vaksin inaktif whole cell *Aeromonas salmonicida* pada ikan mas (*Cyprinus carpio*). *Jurnal Aquasains*, 1(1), 17-22.

Skinner, L. A. (2009). The physiological and immunological effects of vaccination of fish health, welfare, and performance. *Doctoral Dissertation*. University of British Columbia.

Soeripto. (2002). Pendekatan konsep kesehatan hewan melalui vaksinasi. *Jurnal Litbang Pertanian*, 21(2), 49-52.

Standar Nasional Indonesia: 7901.4. (2013). Ikan Bawal Bintang (*Trachinotus blochii*, Lacepede)-Bagian 3: Benih.

- Sugianto, S., Masfiah, I., Fairwandari, I., & Hidayati, S. N. (2017). Identifikasi bakteri pada ikan air laut di Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan hasil perikanan kelas I Ngurah Rai Denpasar, Bali. *Journal of Aquaculture and Fish Health*, 6(3), 135-140.
- Sukmawati, T. D., & Suprpto, H. (2010). Efektivitas penggunaan whole cell dari *Vibrio alginolyticus* sebagai vaksin oral melalui artemia pada benih ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 2(2), 114-115.
- Thomas, P. (2004). *Bacteria and Viruses*. Lucent Library of Science and Technology. United States of America.
- Tizard, I. R. (1982). *An Introduction to Veterinary Immunology*. W.B. Saunders Company. USA.
- Utomo, Y. E. (2001). Uji lapang vaksin *Aeromonas hydrophoilla* terhadap ikan mas (*Cyprinus carpio*) melalui pakan pelet bervaksin. *Doctoral dissertation*. IPB (Bogor Agricultural University).
- Widanarni, Noermala, J.I., & Sukenda. (2014). Prebiotik, probiotik, dan sinbiotik untuk mengendalikan koinfeksi *Vibrio harveyi* dan IMNV pada udang vaname. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 13(1), 11-20.
- Wintoko, F., Setyawan, A., Hudaidah S., & Ali, M. (2013). Immunogenitas heat killed vaksin inaktif *Aeromonas salmonicida* pada ikan mas (*Cyprinus carpio*). *e-Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan*, 2(1), 205-210.
- Zainun, Z. (2007). Pengamatan parameter hematologis pada ikan mas yang diberi immunostimulan. *Buletin Teknik Litkayasa Akuakultur*. Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Tawar Sukabumi, 6(1), 45-49.