

IMUNOGENISITAS HEAT KILLED *Aeromonas hydrophila* Strain GB-01, GPd-02, dan GPI-05 SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN

Imunogenisitas *Heat Killed Aeromonas hydrophila* Strain Gb-01, Gpd-02, Dan Gpl-05 as a Vaccine Candidate

Dini Siswani Mulia*, Cintya Windarti, Heri Maryanto

Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan,
Universitas Muhammadiyah Purwokerto

Jl. Raya Dukuh Waluh PO BOX 202 Purwokerto 53182 Tlp. 0281-636751,
Fax. 0281-637239

*E-mail: dinisiswanimulia@ump.ac.id,

ABSTRAK

Vaksinasi *Aeromonas hydrophila* merupakan langkah konkrit untuk mengendalikan penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) yang disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila*. Namun, diperlukan strain bakteri *A. hydrophila* yang memiliki imunogenisitas tinggi. Pembuatan vaksin dengan metode *heat killed* merupakan salah satu cara pembuatan vaksin inaktif *A. hydrophila* selain vaksin inaktif dengan formalin (*whole cell*). Penelitian bertujuan untuk mengkaji potensi imunogenisitas *heat killed A. hydrophila* strain GB-01, GPd-02, dan GPI-05 sebagai kandidat vaksin. Penelitian menggunakan metode eksperimen dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL), 3 perlakuan (strain GB-01, GPd-02, dan GPI-05). dan 1 kontrol dengan 4 kali ulangan. Vaksin dibuat dengan memanaskan bakteri pada suhu 100°C selama 2 jam. Ikan uji adalah lele dumbo berumur sekitar 2 bulan dengan ukuran panjang 9-14 cm. Parameter penelitian meliputi titer antibodi, uji reaksi silang, dan parameter kualitas air, yaitu suhu air, pH, dan kadar oksigen terlarut. Data titer antibodi dianalisis dengan *Analysis of Variance* (Anova) dan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf uji 5 %, sedangkan data hasil reaksi silang dan parameter kualitas air diamati secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa strain GB-01, GPd-02, dan GPI-05 dapat meningkatkan titer antibodi dibandingkan kontrol dan bereaksi positif pada uji reaksi silang, sehingga disimpulkan memiliki imunogenisitas yang tinggi dan direkomendasikan menjadi kandidat vaksin.

Kata Kunci : *Aeromonas hydrophila*, *heat killed*, imunogenisitas, kandidat vaksin, strain GB-01, GPd-02, dan GPI-05

ABSTRAK

Vaccination Aeromonas hydrophila is a concrete step to control the disease *motile Aeromonas septicemia* (MAS), which is caused by bacteria *A. hydrophila*. However, it takes strain of bacteria *A. hydrophila* which has a high immunogenicity. Making vaccines killed by heat method is one way of making vaccines inactivated *A. hydrophila* apart with formalin inactivated vaccine (*whole cell*). The study aims to assess the potential immunogenicity of *heat killed A. hydrophila* strain GB-01, GPD-02, and GPL-05 as a vaccine candidate. The study used an experimental method with a completely randomized design (CRD), 3 treatments (strain GB-01, GPD-02, and GPL-05), and one control with four replications. The vaccine is made by heating the bacterium at a temperature of 100°C for 2 hours. African catfish test fish is about 2 months old with a length of 9-14 cm. Parameter research include antibody titers, cross-reaction test, and water quality parameters, ie water temperature, pH, and dissolved oxygen. Antibody titer data was analyzed by

Analysis of Variance (ANOVA) and Duncan's Multiple Range Test (DMRT) at test level 5%, while data from cross-reactions and water quality parameters were observed descriptively. The results showed that the strain GB-01, GPD-02, and GPL-05 can increase the antibody titer compared to control and react positively to the test of cross-reaction, so it concluded had a high immunogenicity and recommended a candidate vaccine.

Keywords : *Aeromonas hydrophila, heat killed, imunogenisitas, kandidat vaksin, strain GB-01, GPd-02, dan GPI-05*

PENDAHULUAN

Budidaya ikan air tawar sering terkendala oleh adanya penyakit, yang paling utama adalah penyakit bercak merah atau sering disebut *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila*. Meskipun serangan bakteri ini sering sebagai infeksi sekunder, akan tetapi akibatnya sangat fatal dan dapat menyebabkan kematian ikan secara masal.

Bakteri *A. hydrophila* bersifat patogen oportunistik. Bakteri ini selalu ada di air dan akan menyerang pada saat ikan lemah. Bakteri ini dapat menyerang berbagai jenis ikan air tawar seperti gurami, patin, nila, ikan mas, koi, ikan lele, baik lele lokal maupun lele dumbo, juga udang galah dan katak (Kamiso, 2004; Mulia, 2007; Mulia *et al.*, 2015; Mangunwardoyo *et al.*, 2010; Noga, 2000; Olga & Aisiah, 2007; Rahman *et al.*, 2001). *A. hydrophila* termasuk ke dalam kelompok bakteri patogen dengan virulensi yang tinggi (Chopra *et al.*, 2000). Serangan bakteri ini dapat menimbulkan kerugian yang sangat besar. Pada ikan lele, tingkat kematian dapat mencapai 80%, bahkan 100% dalam waktu sekitar satu minggu (Mulia, 2012).

Upaya untuk menanggulangi penyakit MAS telah banyak dilakukan. Kebanyakan petani bereaksi setelah ada aksi, setelah ikan peliharaannya terserang penyakit ini. Penggunaan obat-obatan dan antibiotika sintetik sering digunakan sebagai tindakan cepat darurat. Jika pemakaian tepat dosis, tepat waktu, dan tepat sasaran, maka akan efektif. Namun, pemakaian yang terus-menerus dan terlalu lama dapat menimbulkan kerugian, tidak hanya pada ikan, tetapi juga dapat memicu resistensi bakteri, dan yang lebih fatal lagi dapat mencemari lingkungan dan merugikan konsumen.

Vaksinasi merupakan teknologi berwawasan lingkungan karena berasal dari makhluk hidup, tidak mencemari lingkungan, dan tepat sasaran. Vaksinasi merupakan salah satu cara penanggulangan penyakit MAS yang efektif dan efisien, karena tingkat perlindungannya cukup tinggi dan dapat melindungi ikan dalam waktu yang lama, lebih dari 3 bulan (Mulia, 2012). Vaksinasi tidak menimbulkan dampak negatif, baik pada ikan, lingkungan, maupun konsumen dan dapat dilakukan pada berbagai ukuran ikan dari benih sampai induk. Oleh karena itu, penanggulangan penyakit melalui vaksinasi mempunyai prospek yang sangat baik di masa yang akan datang.

Keberhasilan suatu vaksinasi dipengaruhi oleh berbagai faktor, antara lain kualitas strain bakteri sebagai kandidat vaksin, metode pembuatan vaksin, jenis antigen yang digunakan, dosis vaksin, pemberian *booster*, maupun cara vaksinasi. Di lapangan, penelitian vaksinasi sering terkendala oleh menurunnya kualitas bahan vaksin, menurunnya patogenisitas bakteri selama penyimpanan, sehingga berdampak pada imunogenisitas dan akan mempengaruhi kualitas vaksin yang digunakan. Perlu upaya untuk mencari, menginventarisir, dan menggali potensi imunogenisitas bahan vaksin, sehingga diperoleh vaksin yang berkualitas dan imunogenik dalam mengendalikan penyakit MAS.

Penelitian ini akan mengkaji 3 strain *A. hydrophila* (GB-01, GPd-02, dan GPI-05) yang dibuat vaksin inaktif dengan metode *heat killed*. Penelitian ini mengupayakan dampak negatif sekecil mungkin dan apabila diperoleh kandidat vaksin dapat diteruskan untuk dijadikan vaksin yang dapat diterapkan pada kalangan petani sehingga masalah utama budidaya ikan air tawar yang selama ini dihadapi petani dapat teratasi. Tujuan

penelitian ini adalah mengkaji potensi imunogenisitas *heat killed A. hydrophila* strain GB-01, GPd-02, dan GPI-05 sebagai kandidat vaksin.

Titer Antibodi

Vaksinasi sengaja diberikan kepada ikan sehat, agar ikan memiliki kekebalan tubuh terhadap serangan penyakit yang disebabkan oleh patogen yang menyerangnya. Sebagai contoh, vaksinasi dengan vaksin *A. hydrophila* ditujukan agar ikan kebal terhadap serangan bakteri *A. hydrophila* penyebab penyakit MAS yang menyerang di air, sebagai lingkungan tempat ikan tersebut hidup. Efektivitas vaksinasi, salah satunya dapat dilihat dari adanya titer antibodi yang diproduksi ikan dan terdeteksi selama penelitian.

Tabel 1 menunjukkan bahwa pada minggu ke-0, perlakuan berbeda nyata terhadap titer antibodi ikan lele dumbo ($P < 0,05$). Perbedaan ini diduga bahwa antibodi sudah terbentuk secara alamiah di kolam tempat ikan tersebut berasal, yang disebabkan dari bawaan induk (*innate*) yang kemungkinan pernah terpapar bakteri tertentu (Sumiarti, 2000 dalam Rosidah *et al.*, 2012), atau adanya respons imun alamiah setelah ikan tersebut terpapar patogen di kolam. Pada minggu ke-1 (satu minggu setelah vaksinasi), terjadi peningkatan titer antibodi pada semua perlakuan ($P < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan vaksin bakteri *A. hydrophila* dapat meningkatkan titer antibodi setelah ikan divaksinasi, strain GB-01 sebesar $2^{2,81}$, strain GPd-02 sebesar $2^{2,59}$, strain GPI-05 sebesar $2^{1,59}$, sedangkan kontrol sebesar 2^2 .

Tabel 1. Titer antibodi ikan lele dumbo setelah divaksinasi dengan vaksin *Aeromonas hydrophila* strain GB-01, GPd-02, dan GPI-05 pada pengamatan setiap minggu

No	Perlakuan	Ulangan	Titer Antibodi pada Minggu Ke-n				
			0	1	2	3	4
1	GB-01	1	2^2	2^3	2^5	2^7	2^5
		2	2^2	2^2	2^5	2^5	2^3
		3	2^2	2^3	2^7	2^7	2^5
		4	2^2	2^3	2^5	2^6	2^3
	Rata-rata	2^{2c}	$2^{2,81b}$	$2^{5,81c}$	$2^{6,46b}$	$2^{4,32b}$	
2	GPd-02	1	2^1	2^2	2^5	2^6	2^5
		2	2^1	2^2	2^5	2^7	2^4
		3	2^1	2^3	2^7	2^6	2^5
		4	2^1	2^3	2^6	2^6	2^4
	Rata-rata	2^{1a}	$2^{2,59b}$	2^{6c}	$2^{6,32b}$	$2^{4,59b}$	
3	GPI-05	1	2^1	2^1	2^4	2^6	2^6
		2	2^1	2^1	2^4	2^6	2^4
		3	2^1	2^2	2^5	2^6	2^5
		4	2^1	2^2	2^3	2^6	2^4
	Rata-rata	2^{1a}	$2^{1,59a}$	$2^{4,17b}$	2^{6b}	2^{5b}	
4	Kontrol	1	2^2	2^2	2^2	2^2	2^2
		2	2^2	2^2	2^2	2^2	2^2
		3	2^1	2^2	2^2	2^1	2^1
		4	2^1	2^2	2^3	2^3	2^2
	Rata-rata	$2^{1,59b}$	2^{2ab}	$2^{2,32a}$	$2^{2,17a}$	$2^{1,81a}$	

Keterangan: Nilai rata-rata yang diikuti huruf superscript yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf uji 5 %. Minggu ke-0 = awal penelitian (sebelum vaksinasi), Minggu ke-1 = satu minggu setelah vaksinasi (sebelum *booster*), Minggu ke-2 = satu minggu setelah *booster*, Minggu ke-3 = dua minggu setelah *booster*, Minggu ke-4 = akhir penelitian.

Pada minggu ke-2 (satu minggu setelah *booster*), terjadi peningkatan yang signifikan untuk perlakuan yang divaksinasi. Strain GB-01 meningkat menjadi $2^{5,81}$, strain GPd-02 meningkat menjadi 2^6 , strain GPI-05 meningkat menjadi $2^{4,17}$, sedangkan kontrol menjadi $2^{2,32}$. *Booster* memicu peningkatan antibodi, peningkatan titer antibodi terjadi karena ikan uji telah mempunyai memori imunitas sehingga dengan *booster* atau vaksinasi ulangan dapat menghasilkan respons imun yang lebih tinggi (Mulia, 2012).

Pada minggu ke-3 (dua minggu setelah *booster*), perlakuan vaksinasi berbeda nyata terhadap kontrol ($P < 0,05$). Rata-rata titer antibodi perlakuan yang divaksinasi masih meningkat dibandingkan minggu sebelumnya, kecuali kontrol yang mengalami penurunan. Strain GB-01 meningkat menjadi $2^{6,46}$, strain GPd-02 meningkat menjadi $2^{6,32}$, strain GPI-05 meningkat menjadi 2^6 , sedangkan kontrol menurun menjadi $2^{2,17}$. Namun, pada minggu ke-4 (akhir penelitian), terjadi penurunan titer antibodi, tetapi antara perlakuan vaksinasi dan kontrol berbeda nyata ($P < 0,05$). Strain GB-01 menurun menjadi $2^{4,32}$, strain GPd-02 menurun menjadi $2^{4,59}$, strain GPI-05 menurun menjadi 2^5 , sedangkan kontrol menjadi $2^{1,81}$.

Suatu substansi yang memiliki kemampuan dalam menimbulkan respons imun apabila dipertemukan dengan tubuh disebut imunogenisitas (Subowo, 2009). Vaksinasi ikan lele dumbo dilakukan untuk mengetahui imunogenisitas 6 strain vaksin bakteri *A. hydrophila* dengan teknik *heat killed* dalam memproduksi titer antibodi. Hasil pengukuran titer antibodi dapat diketahui berdasarkan kemampuan antibodi di dalam serum dalam melakukan aglutinasi terhadap antigen *A. hydrophila*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa vaksin *heat killed* (yang dimatikan dengan pemanasan) strain GB-01, GPd-02, dan GPI-05 yang diberikan pada lele dumbo mampu meningkatkan respons imun dengan diproduksinya antibodi yang terdeteksi selama penelitian. Bakteri yang diinaktivasi dengan pemanasan hanya mengandung polisakarida (karbohidrat), karena dengan pemanasan protein akan rusak dan bagian lipid terhidrolisis, dan antigen yang terbentuk sering disebut sebagai antigen O. Antigen O merupakan

penyusun senyawa lipopolisakarida yang mampu memunculkan respons pada inang yang diujikan. Hasil penelitian sebelumnya yang menggunakan antigen O pada ikan telah dilakukan oleh Wintoko *et al.* (2013), yang menggunakan antigen O *Aeromonas salmonicida* pada ikan mas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa vaksinasi dengan antigen O dapat meningkatkan respons imun berupa titer antibodi, kontrol mencapai $2^{2,33}$ sedangkan perlakuan yang divaksinasi mencapai 2^6 .

Hasil penelitian Purwaningsih & Tauhid (2010), menggunakan vaksin *Streptococcus* sp. yang dibuat dengan pemanasan pada ikan nila menunjukkan adanya peningkatan antibodi. Imunogenisitas vaksin yang dimatikan dengan pemanasan juga dapat dilihat pada hasil penelitian Syawal & Siregar (2010) yang menggunakan vaksin *Ichthyophthirius multifiliis* pada ikan jambal siam.

Produksi antibodi adalah suatu proses yang terjadi dalam limfosit sebagai reaksi terhadap kehadiran bahan protein asing (antigen), dalam hal ini sel-sel bakteri *A. hydrophila*. Antibodi sangat diperlukan untuk menghadapi serangan dari patogen yang masuk ke dalam tubuh (Mulia *et al.*, 2008). Kekebalan yang dihasilkan setelah vaksinasi dengan penyuntikan secara intramuskular akan melibatkan pertahanan spesifik yang terdiri atas dua macam yaitu imunitas humoral yang akan memproduksi antibodi dan imunitas seluler atau *cell mediated immunity* (CMI) (Passarela, 2006). Dengan penyuntikan secara intramuskular, difusi antigen akan terjadi perlahan dan lebih konstan untuk menstimulasi antibodi (Anderson, 1974) sehingga dari hasil penelitian antibodi yang dihasilkan dari minggu ke minggu meningkat. Selain itu antigen akan langsung masuk ke dalam jaringan tubuh sehingga lebih efektif dan akan mudah direspons oleh sel-sel imun (Setyawan *et al.*, 2012). Keuntungan cara vaksinasi suntik secara intramuskular adalah difusi vaksin ke dalam tubuh berjalan konstan dan prosesnya lebih cepat untuk merangsang antibodi (Mulia *et al.*, 2006). Sistem imunitas seluler dihasilkan oleh aktivitas limfosit yang disebut sel T yang berasal dari kelenjar timus, sedangkan imunitas humoral dihasilkan oleh golongan

limfosit yang disebut sel B yang berasal dari ginjal pada tubuh ikan (Fujaya, 2004).

Pemaparan pertama terhadap suatu antigen merangsang sel T memunculkan sel-sel efektor respons kekebalan yang diperantai sel. Sel-sel efektor berpartisipasi dalam penyingkiran atau pemusnahan bahan asing atau mikroorganisme penyerbu. Di samping itu, sel T dapat memperoleh bantuan makrofag dalam menghancurkan patogen atau merangsang sel B untuk meningkatkan produksi antibodi. Sel B berdiferensiasi menjadi sel plasma yang membuat dan mengeluarkan antibodi spesifik untuk menstimulasi antigen tertentu. Selain membentuk sel-sel plasma, limfosit B juga dapat membentuk sel-sel ingatan (*memory cells*) jika terjadi infeksi ulang terhadap antigen tersebut. Sel-sel ini merupakan limfosit yang berumur lama dan timbul akibat terjadi kontak sebelumnya dengan suatu antigen (Fujaya, 2004). Menurut Ellis (1988), apabila mendapat pemaparan kedua dengan antigen yang sama, maka produksi antibodi akan lebih cepat dihasilkan dengan jumlah yang lebih besar dan dalam konsentrasi yang lebih tinggi dalam darah daripada pemaparan pertama, sehingga dari hasil penelitian setelah vaksinasi ulang atau *booster*, produksi titer antibodi ikan lele dumbo semakin meningkat. Menurut Fujaya (2004) pada mulanya tubuh ikan tidak menghambat serbuan, tetapi setelah beberapa hari atau minggu sistem imun bereaksi dengan kuat untuk menahan

penyerbu. Selanjutnya timbul daya tahan yang sangat spesifik untuk penyerbu tertentu dan tidak untuk penyerbu lainnya.

Uji Reaksi Silang

Uji reaksi silang merupakan uji yang mereaksikan suatu antigen dengan antibodi secara *in vitro* untuk mengetahui imunogenisitas antigen *A. hydrophila* dari beberapa strain yang diberikan pada lele dumbo. Strain bakteri yang digunakan untuk uji reaksi silang terdiri atas 9 strain. Strain tersebut yaitu GPI-02, GL-01, GJ-01, GB-01, GPd-02, GPI-05, GPI-03, GK-01, dan GL-02 (berperan sebagai antigen) direaksikan dengan 3 strain (berperan sebagai antibodi), yaitu GB-01, GPd-02, dan GPI-05. Hasil reaksi silang menunjukkan bahwa antigen GB-01, GPd-02, dan GPI-05 memiliki imunogenisitas yang tinggi dan bereaksi positif dengan dirinya sendiri maupun dengan antigen lain dengan titer antibodi yang dihasilkan $\geq 2^5$ (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa ke-3 strain tersebut memiliki kemampuan yang baik dalam melindungi ikan terhadap serangan bakteri *A. hydrophila*, sehingga sangat baik untuk dijadikan kandidat vaksin karena tidak hanya mampu bereaksi terhadap antigen yang sama (satu jenis), tetapi mampu bereaksi dengan antigen dari strain lain (Mulia, 2012). Vaksin yang berasal dari strain terpilih tersebut akan lebih mampu mengendalikan penyakit yang disebabkan bakteri *A. hydrophila* apabila terjadi di alam.

Tabel 2. Hasil Uji Reaksi Silang antar Strain *A. hydrophila*

Antigen Serum	GPI-02	GL-01	GJ-01	GB-01	GPd-02	GPI-05	GPI-03	GK-01	GL-02
GB-01	2 ⁵	2 ⁵	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁶	2 ⁶	2 ⁶	2 ⁵	2 ⁷
GPd-02	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁷	2 ⁷	2 ⁷	2 ⁷	2 ⁶	2 ⁵	2 ⁷
GPI-05	2 ⁷	2 ⁷	2 ⁶	2 ⁶	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁵	2 ⁶

Keterangan: Titer antibodi pada reaksi silang $\geq 2^5$ adalah positif, Titer antibodi $\leq 2^5$ adalah negatif.

Kualitas Air

Hasil pengamatan parameter kualitas air pada semua perlakuan tidak menunjukkan adanya perbedaan yang besar dan masih berada pada batas toleransi untuk kehidupan lele dumbo sehingga dapat menunjang proses pembentukan respons kekebalan pada tubuh ikan. Suhu air selama penelitian berkisar antara 26,5-28,3°C, kisaran tersebut masih layak bagi kehidupan ikan lele dumbo. Menurut Bachtiar (2007) suhu minimum dalam budidaya ikan lele dumbo yaitu 20°C, sedangkan suhu maksimumnya yaitu 30°C. Suhu berpengaruh pada pembentukan antibodi. Pada suhu yang optimal pembentukan antibodi akan berjalan dengan baik.

Kisaran derajat keasaman (pH) air selama penelitian yaitu 6,8-7,4. Menurut Kordi (2010) kisaran optimal pH adalah 7,5-8,7, sehingga pH air untuk semua perlakuan selama penelitian masih dalam kisaran normal untuk kehidupan lele dumbo.

Kadar oksigen terlarut selama penelitian berkisar 4,7-7,2 ppm. Kisaran kandungan oksigen terlarut tersebut masih dalam batas kelayakan hidup ikan lele dumbo. Kordi (2010) mengungkapkan kandungan oksigen yang baik untuk budidaya perairan adalah antara 5-7 ppm.

KESIMPULAN

Berdasarkan rumusan masalah, hasil penelitian, dan pembahasan yang disajikan sebelumnya dapat disimpulkan bahwa strain GB-01, GPd-02, dan GPI-05 dapat meningkatkan titer antibodi dibandingkan kontrol dan bereaksi positif pada uji reaksi silang, sehingga disimpulkan memiliki imunogenisitas yang tinggi dan direkomendasikan menjadi kandidat vaksin.

Berdasarkan kesimpulan tersebut, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang penggunaan vaksin bakteri *heat killed A. hydrophila* strain GB-01, GPd-02, dan GPI-05 untuk mengetahui imunogenisitas pada ikan air tawar lain yang memiliki nilai ekonomi tinggi agar teruji keefektivannya sehingga dapat dijadikan kandidat vaksin dalam upaya pengendalian penyakit MAS di alam.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, D.P. (1974). Fish Immunology, dalam *Diseases of Fishes*, buku ke-4, Snieszko, S.F. & Axelrod, H.R. (ed.). T.F.H. Publications, Ltd.
- Bachtiar, Y. (2007). Panduan Lengkap Budidaya Lele Dumbo. Agromedia. Jakarta.
- Chopra, A.K., Xiu X.I., Ribardo, D., Gonzales, M., Kuhl, K., Peterson, J.W., & Huston, C.W. (2000). The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* induces proinflammatory cytokine production and activates arachidonic acid metabolism in macrophages. *Infection and Immunity*, 68(5): 2808-2818.
- Ellis, A.E. (1988). Optimizing Factors For Fish Vaccination, dalam *Fish Vaccination*, A.E. Ellis (ed). Academic Press Ltd. London.
- Fujaya, Y. (2004). *Fisiologi Ikan Dasar Pengembangan Teknologi Perikanan*. Jakarta: Rineka Cipta.
- Kamiso, H.N. (2004). Status Penyakit Ikan dan Pengendaliannya di Indonesia. *Prosiding Seminar Nasional Penyakit Ikan dan Udang IV*, Purwokerto, 18-19 Mei 2004.
- Kordi, M.G. (2010). *Panduan Lengkap Memelihara Ikan Air Tawar di Kolam Terpal*. Jakarta: Lily Publisher.
- Mangunwardoyo, W., Ismayasari, R. & Riani, E. (2010). Uji Patogenisitas dan virulensi *Aeromonas hydrophila* Stanier pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus* Lin.) Melalui Postualt Koch. *J. Ris.Akuakultur* 5(2) : 245-255.
- Mulia, D.S., Pratiwi, R., & Triyanto. (2006). Pengaruh cara booster terhadap efikasi vaksinasi oral dengan debris sel *Aeromonas hydrophila* pada lele dumbo (*Clarias* sp.). *Jurnal Perikanan UGM (GMU J. Fish. Sci)*, 8(1), 96-104.
- Mulia, D.S. (2007). Keefektifan vaksin *Aeromonas hydrophila* untuk mengendalikan penyakit MAS (*Motile Aeromonas Septicemia*) pada gurami (*Osphronemus*

- gouramy* Lac.). *Jurnal Pembangunan Pedesaan*, 7 (1): 43-52.
- Mulia, D.S., Purbomartono, C., Isnansetyo, A. & Murwantoko. (2008). Penggunaan vaksin polivalen *Aeromonas hydrophila* untuk pengendalian penyakit MAS (Motile *Aeromonas Septicemia*) pada gurami (*Osphronemus gouramy* Lac.). *Prosiding Seminar Nasional Tahunan V Hasil Penelitian Perikanan dan Kelautan*, Jurusan Perikanan, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada.
- Mulia, D.S. (2012). *Vaksinasi Lele Dumbo*. Yogyakarta : Pustaka Pelajar
- Mulia, D.S., A. Khusniah & H. Maryanto. (2015). Potensi Imunogenisitas Bakteri *Aeromonas hydrophila* strain GPI-05 dan GL-02 sebagai Kandidat Vaksin. *Aquasains* (3) 3: 320-329.
- Noga, J.E. (2000). *Fish disease diagnosis and treatment*. Iowa State Press, USA.
- Olga & S. Aisiah. (2007). Vaksin Protein Produk Ekstraseluler *Aeromonas hydrophila* untuk Meningkatkan Tanggapan Kebal Patin (*Pangasius hypophthalmus*) terhadap Motile *Aeromonas Septicemia* (Mas). *Sains Akuatik*, 10(2) : 105-110.
- Passarella, M.P. (2006). Uji tantangan pada ikan Gurame (*Osphronemus gouramy*) yang diimunisasi dengan vaksin inaktif anti *Aeromonas hydrophila* peroral melalui pelet. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.
- Purwaningsih, U. & Taukhid. (2010). Vaksin anti *Streptococcus* spp. inaktivasi melalui heat killed untuk pencegahan penyakit *Streptococcosis* pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur*. Balai Riset Perikanan Air Tawar. Sempur. Bogor. Hal. 901-904.
- Rahman, M.H., S. Suzuki, & K. Kawai. (2001). The Effect of temperature on *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish, *Carassius auratus*. *J. Appl. Ichthyol.* 17 : 282-285.
- Rosidah, D. Iriana, & R.B. Setiawan. (2012). Efektivitas vaksin dari bakteri *Mycobacterium fortitum* yang diinaktivasi dengan pemanasan untuk pencegahan penyakit *Mycobacteriosis* pada ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*). *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. 3(1): 25-40.
- Setyawan, A., S. Hudaidah, Z. Zafeskan, Ronapati & Sumino. (2012). Imunogenisitas vaksin inaktif whole cell *Aeromonas salmonicida* pada ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *Aquasains (Jurnal Ilmu Perikanan dan Sumberdaya Perairan)*. 1(1): 18-22.
- Subowo. (2009). *Imunobiologi*. Edisi 2. Jakarta: Sagung Seto
- Syawal & Siregar. (2010). Imunisasi Ikan Jambal Siam dengan Vaksin *Ichthyophthirius multifiliis*. *Jurnal Veteriner*. Vol 11 (3): 163-167.
- Wintoko, F., Setyawan, A., Hudaidah, S. & Ali, M. (2013). Imunogenisitas Heat Killed Vaksin Inaktif *Aeromonas salmonicida* pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *Jurnal rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan*. Vol 2 (1) : 205-210.