

Respon Imun Spesifik Larva Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) melalui Imunitas Maternal yang Diberi Vaksin Inaktif *Whole Cell Aeromonas salmonicida*

*Specific Immune response Larva Goldfish (*Cyprinus carpio*) Maternal Immunity through The Whole of Cell Vaccine given *Aeromonas salmonicida**

Syohibahttul Islamiyah BAHAR, Esti HARPEN, Eko EFFENDI

Jurusan Perikanan dan Kelautan Fakultas Pertanian Universitas Lampung
Jl. Sumantri Brojonegoro No. 1 Bandar Lampung 35145
E-mail: syohibaht@gmail.com

Abstract. *Aeromonas salmonicida* are specific bacteria that can cause infections and death to the cultivation of carp (*Cyprinus carpio*) during larval stage. Death in carp can be prevented by a vaccine, but the vaccine can only be given on the seed over the age of 3 weeks. Maternal vaccination needs to be done to improve the immune system of the larvae by means of inactivated whole cell vaccine *A. salmonicida* on broodstock ready to spawn. Aims to determine the effectiveness of vaccines on breeders carp to the parent antibody titer test and larvae, as well Survival Rate (SR) and the Relative Percent Survival (RPS) larvae. This research was conducted with a completely randomized design, 4 treatments A (control); B (0.3 ml/kg); C (0.4 ml/kg); D (0.5 ml/kg) and 3 repetitions. The results show that the antibody titer of 0.3 ml dose capable of providing agglutination reaction to pitting 7th (64x dilution) in broodstock, and vaccine doses 0,4 ml on broodstock able to give agglutination reaction to the larvae until all 6 wells (32x dilution). A dose of 0.4 ml/kg resulted the highest SR and RPS with 96.11% and 81.25% respectively. Clinical symptoms of redness in control larvae was spread throughout the body whereas on the vaccine treatment was only in certain body parts.

Keywords: *A. salmonicida*, vaccines, maternal immunity, larva, specific immune respon

Abstrak. *Aeromonas salmonicida* merupakan bakteri spesifik yang dapat menyebabkan penyakit infeksi dan kematian pada budidaya ikan mas (*Cyprinus carpio*) saat stadia larva. Pencegahan dapat dilakukan dengan pemberian vaksin, namun pemberian vaksin hanya dapat diberikan pada benih berumur lebih dari 3 minggu. Vaksinasi indukan perlu dilakukan untuk meningkatkan sistem imun larva dengan cara pemberian vaksin inaktif *whole cell A. salmonicida* pada indukan yang siap memijah. Tujuan dari pemberian vaksin yaitu untuk mengetahui efektivitas pemberian vaksin terhadap uji titer antibodi induk dan larva, serta *Survival Rate* (SR) dan *Relative Percent Survival* (RPS) larva. Penelitian ini dilakukan dengan Rancangan Acak Lengkap, 4 perlakuan A (kontrol); B (0,3 ml/kg); C (0,4 ml/kg); D (0,5 ml/kg) dan 3 kali ulangan. Hasil uji titer antibodi menunjukkan bahwa dosis 0,3 ml mampu memberikan reaksi aglutinasi hingga sumuran ke-7 (pengenceran 64x) pada indukan, dan dosis vaksin 0,4 ml pada indukan mampu memberikan reaksi aglutinasi pada larva hingga sumuran ke-6 (pengenceran 32x). SR larva pada perlakuan tanpa vaksinasi jauh lebih rendah dari pada perlakuan dengan vaksinasi. Dosis 0,4 ml/kg menghasilkan SR dan RPS tertinggi yaitu 96,11% dan 81,25%. Gejala kemerahan pada larva kontrol terlihat menyebar diseluruh tubuh sedangkan pada larva dengan perlakuan vaksin hanya dibagian tubuh tertentu.

Kata kunci: *A. salmonicida*, vaksin, imunitas maternal, larva, respon imun spesifik

PENDAHULUAN

Penyakit bakterial yang disebabkan oleh *A. salmonicida* masih menjadi masalah bagi pembudidaya ikan mas (*C. carpio*). Penyakit ini dapat menular bahkan menyebabkan kematian pada ikan budidaya, terutama golongan cyprinid (Irianto 2005); (Austin *et al.*, 2007). Tatang (2014) menyatakan bahwa, organ-organ yang berperan dalam sistem pembentukan antibodi pada umur lebih dari tiga minggu masih belum sempurna, sehingga patogen dengan mudah menginfeksi benih ikan mas. Penggunaan obat-obatan saat ini sebagai metode pengobatan juga sudah tidak dianjurkan karena dapat menyebabkan dampak negatif seperti timbulnya resistensi pada bakteri, adanya residu dalam tubuh ikan, pencemaran lingkungan, bahkan dapat menyebabkan penolakan ekspor oleh negara lain. Salah satu upaya pencegahan yang dapat dilakukan yaitu dengan pemberian vaksin (vaksinasi) (Astuti, 2015).

Aplikasi pemberian vaksin inaktif *whole cell A. salmonicida* pada indukan ikan mas yang sudah matang gonad pada tahap oosit primer dilakukan dalam penelitian ini sebagai bentuk pencegahan awal agar larva memiliki kekebalan spesifik bawaan dari induk yang divaksinasi. Hal ini sesuai dengan pendapat (Davis, *et al.*, 2007; Mor & Avtalion, 1990). Respon imun spesifik dapat dilihat pada uji titer antibodi induk maupun larva. Apabila terdapat reaksi antara antigen *A. salmonicida* dan antibodi (reaksi aglutinasi) pada uji titer antibodi induk maka dapat dipastikan larva yang dihasilkan juga memiliki imunitas spesifik sama dengan induknya. Respon lainnya dapat diamati dari tingkat kelangsungan hidup dan tingkat kelangsungan hidup relatif. Reaksi hasil uji dapat dilihat setelah ujiantang larva dengan bakteri *A. salmonicida*. Gudkovs (1988) menjelaskan bahwa, tingkat kelangsungan hidup (SR) rata-rata ikan yang baik berkisar 73,50-86,60 %. Sedangkan untuk RPS yaitu > 60%.

Tujuan penelitian ini yaitu mengetahui efektivitas pemberian vaksin inaktif *Whole cell A. salmonicida* pada indukan ikan mas (*C. carpio*), terhadap uji Titer antibodi induk dan larva, serta mengetahui efektivitas pemberian vaksin tersebut terhadap ujiantang larva.

BAHAN DAN METODE

Isolat bakteri *A. salmonicida* didapatkan dari Stasiun Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Lampung. Untuk indukan ikan mas (*C. carpio*), didapatkan dari Balai Benih Ikan Sentra (BBIS) Purbolinggo Lampung Timur. Penelitian dilakukan dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 4 perlakuan dengan 3 kali ulangan yaitu Perlakuan A: induk tanpa vaksinasi (kontrol), Perlakuan B: vaksinasi induk dengan dosis 0,3 ml/kg, perlakuan C: vaksinasi induk dengan dosis 0,4 ml/kg, perlakuan D: vaksinasi induk dengan dosis 0,5 ml/kg.

Metode pembuatan vaksin inaktif *whole cell A. salmonicida* mengacu pada Setyawan dkk., (2012) menggunakan isolat murni *A. salmonicida* yang dinaktifkan dengan formalin 1,5 %. Bakteri yang inaktif selanjutnya diuji Viabilitas untuk mengetahui kelayakan vaksin, dengan mengkultur kembali bakteri inaktif pada media TSA. Vaksin dikatakan layak ditandai dengan tidak adanya bakteri yang tumbuh saat dikultur pada media TSA. Pemberian vaksin dilakukan pada induk betina ikan mas (*C. carpio*) dengan cara, induk dianestesi menggunakan minyak cengkeh (0,3 ml/L) sebelum vaksin diberikan. Indukan divaksinasi dengan cara disuntik dibagian *Intra muscular* (IM) (Anderson, 1974), menggunakan vaksin inaktif *whole cell A. salmonicida* dengan kepadatan 10^7 CFU/ml (Setyawan dkk., 2012). Pemberian vaksin sebanyak 2 kali dengan, pemberian vaksin ke-2 sebagai booster (Tatang, 2014).

Uji titer antibodi yang dilakukan pada penelitian ini yaitu, uji pada Induk yang divaksin, dan Larva yang ditetaskan dari induk yang divaksinasi. Metode uji titer antibodi induk mengikuti metode uji (Setyawan dkk., 2012). Sedangkan untuk metode uji titer antibodi larva mengacu pada Nur dkk., (2004); Nur, dkk., (2006); Hadie dkk., (2010). Parameter uji titer antibodi, dilihat berdasarkan ada tidaknya reaksi Aglutinasi, yang ditandai dengan menyebarnya titik didasar sumuran, diberi keterangan (+), sedangkan apabila tidak ada aglutinasi ditandai dengan berpusatnya titik didasar sumuran, diberi keterangan (-) (Hadie dkk., 2010).

Larva diujiantang pada umur 5 hari pasca penetasan dan 13 hari pasca penetasan. Uji tantang dilakukan dengan menantang larva dengan bakteri aktif *A. salmonicida* pada kepadatan bakteri 10⁷ cfu/ml. Metode yang digunakan yaitu perendaman selama 30 menit, dan diamati selama 7 hari, respon yang diberikan pasca uji tantang. Parameter uji tantang, dilihat berdasarkan tingkat kelangsungan hidup (SR) dan tingkat kelangsungan hidup (RPS). Dihitung menggunakan rumus:

$$a. SR = \frac{N_t}{N_0} \times 100\% \dots\dots\dots(1)$$

N_t = Jumlah ikan yang hidup pada awal pengujian.

N₀ = Jumlah ikan yang hidup pada akhir pengujian.

$$b. RPS = \left(1 - \frac{M_v}{M_c}\right) \times 100\% \dots\dots(2)$$

M_v = Moralitas larva perlakuan (%)

M_c = Mortalitas larva tanpa perlakuan (%)

Hasil yang baik menunjukkan jika, nilai tingkat kelangsungan hidup (SR) ikan rata-rata yang berkisar 73,50 - 86,60 % (Gudkovs, 1988), sedangkan untuk RPS > 60% (Nur dkk., 2004). Data hasil uji titer antibodi dan uji tantang, dianalisis secara statistik. Analisis data untuk uji titer antibodi menggunakan uji t. Data SR dan RPS dianalisis menggunakan ANOVA dengan tingkat kepercayaan 95%. Transfortasi data menggunakan Arsin, pengujian normalitas data menggunakan Lilifore, dan Homogenitas menggunakan Bartlet, untuk uji lanjut menggunakan Beda Nyata Terkecil (Nazir, 2005).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Vaksin dan Pemberian Vaksin

Vaksin *Whole cell A. salmonicida* yang di-inaktivasi dengan menggunakan formalin 1,5% dianggap aman untuk digunakan karena dari hasil uji viabilitas menunjukkan bahwa tidak ada pertumbuhan bakteri *A. salmonicida* pada media kultur TSA dalam waktu kultur 22 jam, dengan ini bakteri sudah siap digunakan sebagai vaksin. Bakteri aktif *A. salmonicida* akan tumbuh optimal pada media kultur TSA dalam waktu 18 - 24 jam, koloni yang tumbuh memiliki ciri berwarna putih, berbentuk bulat, dan permukaan cembung (Buller, 2004). Vaksin yang telah siap selanjutnya diaplikasikan pada ikan uji yaitu indukan ikan mas.

Uji Titer Antibodi

Reaksi uji titer antibodi ditandai dengan adanya reaksi aglutinasi antara serum antibodi terhadap antigen yang dilihat dari titik menyebar disekitar dasar sumuran (+), sedangkan apabila tidak terjadi aglutinasi ditandai dengan berpusatnya satu titik ditengah-tengah dasar sumuran (-). Kondisi awal uji titer antibodi induk sebelum vaksinasi tidak ditemukan reaksi aglutinasi, hal ini karena sebelumnya indukan belum terinfeksi antigen yang sama (*A. salmonicida*), Nur (2006) menyatakan bahwa secara alami ikan yang telah terinfeksi akan menunjukkan reaksi aglutinasi saat dilakukan pengujian titer antibodi.

Tabel 1. Reaksi uji titer antibodi pada induk dan larva

Ikan uji	Perlakuan (ml)	Sumuran/ Pengenceran						
		1/1	2/2	3/4	4/8	5/16	6/32	7/64
Indukan Sebelum vaksinasi	0	-	-	-	-	-	-	-
	0,3	-	-	-	-	-	-	-
	0,4	-	-	-	-	-	-	-
	0,5	-	-	-	-	-	-	-
	0	-	-	-	-	-	-	-
Indukan Setelah Vaksinasi	0,3	+	+	+	+	+	+	+
	0,4	+	+	+	+	+	+	-
	0,5	-	-	-	-	-	-	-
	0	-	-	-	-	-	-	-
Larva dari indukan yang divaksinasi	0,3	+	+	+	+	-	-	-
	0,4	+	+	+	+	+	+	-
	0,5	-	-	-	-	-	-	-
	0	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan : (+) ada reaksi aglutinasi (pembentukan antibodi)
 (-) tidak ada reaksi aglutinasi (tidak terbentuk antibodi)

Tabel 1 menunjukkan bahwa Induksi kekebalan pada induk ikan mas terhadap titer antibodi memberikan perbedaan yang signifikan antara perlakuan vaksin (0,3 dan 0,4 ml) terhadap kontrol (tanpa perlakuan) ditandai dengan adanya reaksi aglutinasi pada perlakuan tersebut saat uji titer antibodi. Sedangkan untuk pemberian dosis vaksin 0,5ml tidak berbeda terhadap kontrol dengan tidak munculnya reaksi aglutinasi pada saat uji titer antibodi.

Kondisi ikan uji yang akan divaksinasi sebaiknya belum terpapar bakteri spesifik yang digunakan sebagai vaksin, dalam keadaan sehat, dan minimal berumur > 3 minggu pasca menetas. Tatang (2014); Astuti (2015), menyatakan bahwa pemberian vaksin diberikan pada ikan yang status kondisinya dalam keadaan optimal (> 3 minggu pasca menetas) dan tidak memiliki riwayat penyakit akibat patogen yang akan digunakan sebagai vaksin. Reaksi aglutinasi hingga sumuran ke-7 (pengenceran 64x) termasuk dalam kategori respon positif yang relatif tinggi, sedangkan reaksi aglutinasi di bawah sumuran ke-6 (pengenceran 32x) reaksi titer antibodi relatif rendah (Hadie dkk., 2010). Terlihat bahwa pemberian vaksin 0,3 ml lebih tinggi hasil uji titer antibodinya dibandingkan 0,4 ml dan 0,5 ml. Hal ini karena dosis vaksin yang diberikan dapat mengubah imunogenesitas dan ada dosis vaksin tertentu dari suatu antigen yang dapat menimbulkan respon antibodi maksimal, selain itu peningkatan dosis vaksin tidak selalu sebanding dengan kenaikan titer antibodi (Olga dkk., 2007).

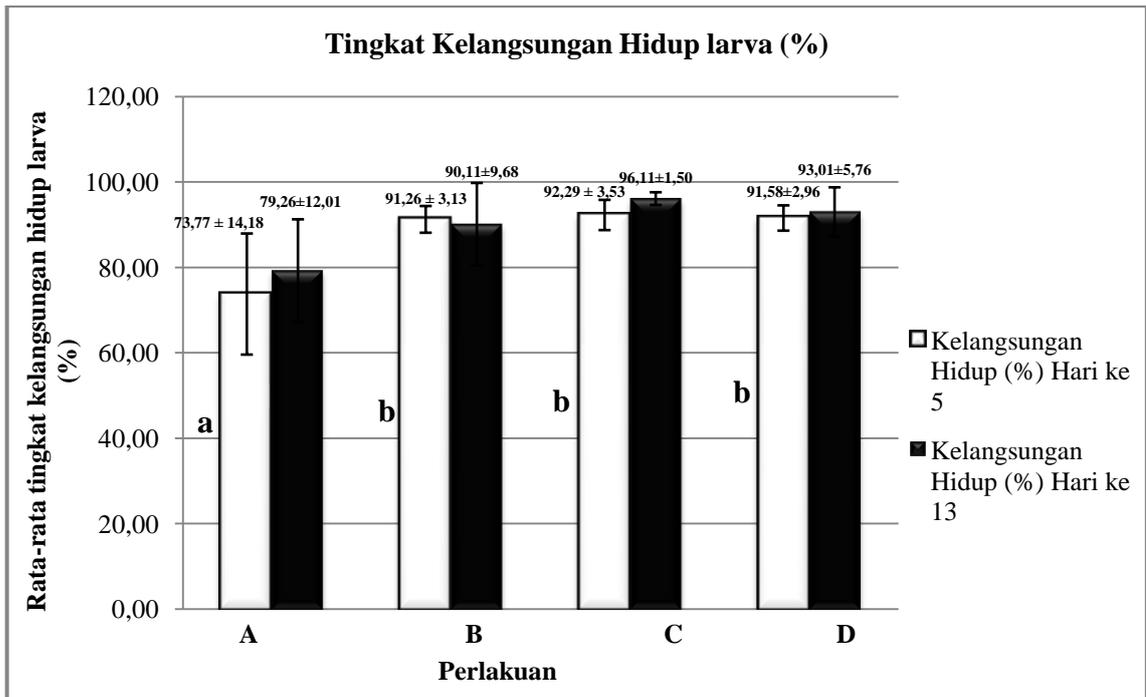
Vaksinasi dengan pemberian dosis 0,5 ml belum mampu memunculkan antibodi, karena dosis yang terlalu tinggi akan menghambat respon imun spesifik yang diharapkan. Pasaribu dkk., (1990) menyatakan, jika dosis dan konsentrasi vaksin yang diberikan melebihi batas kemampuan tubuh ikan, maka vaksin akan bersifat immunosupresif (menekan munculnya respon imun). Dosis vaksin yang cukup besar belum tentu dapat memberikan kekebalan yang tinggi dalam tubuh ikan (Nur, 2006). Selain itu juga tidak munculnya reaksi dapat disebabkan karena limfosit tidak dapat mengenal antigen yang merangsang terbentuknya antibodi (Fujaya, 1999). Masih terdeteksinya antibodi pada larva membuktikan adanya transfer antibodi dari induk ke larva yang diduga terbawa oleh telur setelah perlakuan

vaksinasi (Tang & Affandi, 2000). Keberadaan antibodi di dalam telur diperjelas dengan terdapatnya keberadaan antibodi yang ikut dalam aliran darah yang terbawa ke hati (tempat terbentuknya *Vitellogenin*) kemudian terbawa oleh aliran darah ke dalam oosit primer, selanjut oosit primer berkembang sampai terbentuk embrio dan ditetaskan. Kuning telur merupakan sumber makanan utama benih pada awal pertumbuhannya, hal ini menyebabkan keberadaan antibodi dalam cairan tubuh larva saat uji titer antibodi (Davis *et al.*, 2007). Transfer imun dari induk ke larva telah dibuktikan dalam telur dan embrio dari beberapa spesies ikan air tawar (Bly & Morris, 1986) seperti, ikan nila (*Oreochromis niloticus*) (Nur dkk., 2004; Nur, 2006) dan ikan patin (*Pangasius pangasius*) (Hadie dkk., 2010).

Hasil tabel 1 setelah dianalisis uji t menunjukkan tidak ada pengaruh yang signifikan antara pemberian dosis vaksin 0,3 ml dan 0,4 ml, sehingga dapat diasumsikan bahwa pemberian dosis vaksin yang tepat untuk indukan ikan mas dapat diberikan pada kisaran dosis 0,3 – 0,4 ml. Dilihat dari penelitian sebelumnya menyatakan bahwa pemberian 0,4 ml/ekor indukan sudah memberikan respon titer antibodi yang cukup baik (Nur dkk., 2004; Hadie dkk., 2010).

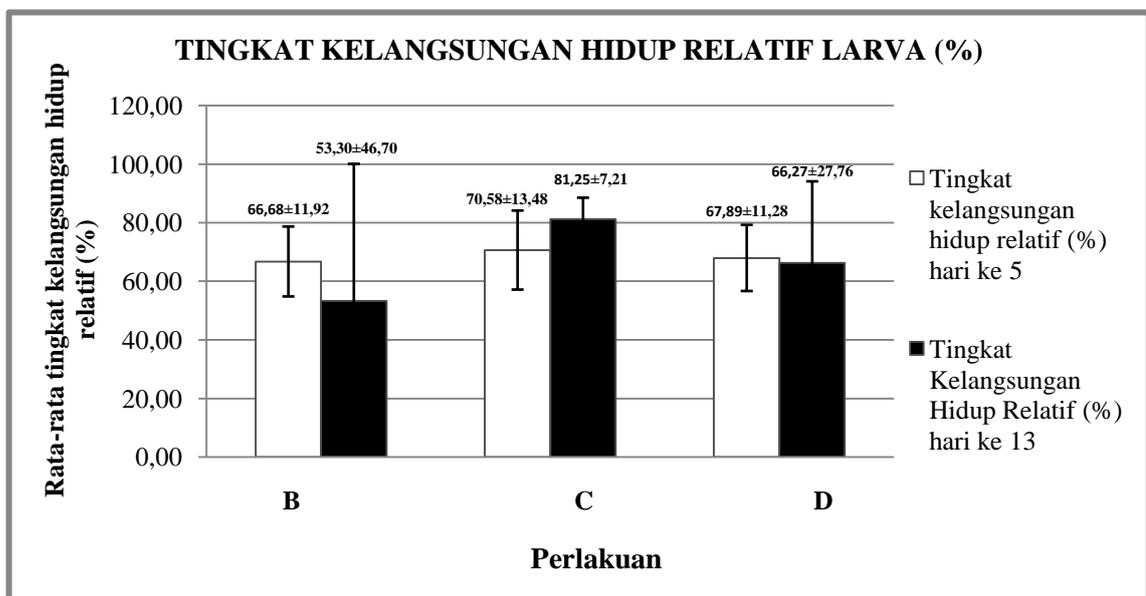
Uji Tantang

Nilai tingkat kelangsungan hidup (SR) larva dari induk yang divaksinasi lebih tinggi dibanding kontrol dengan nilai peluang ($0,02 < 0,05$) atau sama dengan 20% dari seluruh perlakuan yang mempengaruhi tingkat kelangsungan hidup larva pasca uji tantang yang merujuk pada perbedaan sangat nyata antara perlakuan terhadap kontrol untuk uji tantang pada hari ke-5. Sedangkan pada uji tantang hari ke 13 tidak berbeda nyata, namun jika dilihat berdasarkan rata-rata persentasenya menunjukkan bahwa vaksinasi pada indukan mampu melindungi larva dari paparan bakteri *A. salmonicida* (Mor & Avtalion, 1990). Nilai rerata tingkat kelangsungan hidup relatif (RPS) tertinggi terdapat pada larva dari indukan yang divaksinasi dengan dosis 0,4 ml, berdasarkan hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa nilai RPS antar perlakuan yang divaksinasi tidak berbeda nyata.



Gambar 1. Grafik rata-rata kelangsungan hidup larva pasca ujiantang hari ke 5 dan hari ke 13

Keterangan : “sunperskrip huruf yang berbeda pada warna kolom grafik yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata p (0,02 < 0,05)”
 “Perlakuan (A) kontrol/tanpa vaksin; (B) pemberian vaksinasi induk 0,3ml/ekor; (C) pemberian vaksinasi induk 0,4 ml/ekor; (D) pemberian vaksinasi induk 0,5 ml/ekor”



Gambar 2. Grafik rata-rata kelangsungan hidup relatif larva pasca ujiantang hari ke 5 dan hari ke 13

Keterangan : “Perlakuan (A) kontrol/tanpa vaksin ; (B) pemberian vaksinasi induk 0,3ml/ekor; (C) pemberian vaksinasi induk 0,4ml/ekor; (D) pemberian vaksinasi induk 0,5ml/ekor”

Nilai SR dan RPS menunjukkan bahwa antibodi cukup berperan pada pertahanan larva dalam melawan serangan bakteri ujiantang. Perbedaan yang sangat nyata antara perlakuan terhadap kontrol pada ujiantang hari ke-5 disebabkan karena pada awal pasca penetasan larva masih rentan terhadap paparan sehingga larva kontrol yang tidak memiliki sistem imun bawaan dari induknya lebih banyak mengalami kematian dibanding perlakuan, sedangkan antar perlakuan tidak terjadi perbedaan nyata yang signifikan. Jika dilihat dari pengamatan pasca ujiantang, larva kontrol dan larva dengan pemberian dosis vaksin induk 0,5 ml lebih cepat menunjukkan gejala klinis berupa kemerahan pada perut dan sirip ekor pada hari ke-3, kemerahan yang menyebar keseluruh tubuh, dan sudah mulai terjadi kematian. Sedangkan pada perlakuan 0,3 dan 0,4 ml luka umumnya terjadi tidak menyebar hanya di bagian tubuh tertentu (lokalisasi). Ghenghesh *et al.*, (2008) menyatakan bahwa infeksi *A. salmonicida* akan mulai muncul gejala klinis hingga kematian berawal dari hari ke-3 pasca menginfeksi inang. Hal ini membuktikan bahwa vaksinasi induk memberikan tingkat perlindungan yang bervariasi pada larva (Nur, 2006). Hal tersebut tidak ada kaitannya dengan kualitas air, karena saat pengukuran kualitas air menunjukkan hasil yang cukup baik untuk kelangsungan hidup larva dengan kisaran suhu (27 - 28 °C), pH (7,0 - 7,2) dan DO (3,79 - 5,56 ppm), sudah sesuai dengan baku mutu pada pengukuran, suhu, pH, dan DO untuk pemeliharaan larva ikan mas (Suseno, 1996; Afriyanto dan Liviawaty, 1992; Cholik, 1986; Cahyono, 2000). Secara keseluruhan nilai kisaran kualitas air masih mendukung untuk kehidupan larva ikan mas, selain itu kualitas air yang baik tidak mendukung untuk kontaminasi bakteri *A. salmonicida* atau bakteri patogen yang ada di wadah pemeliharaan larva. Buller (2004) menyatakan bahwa bakteri patogen akan tumbuh optimal pada suhu 22 °C dengan keadaan perairan cenderung asam (pH > 5,5) (Ghenghesh, 2008) dan bakteri tersebut hanya dapat menginfeksi dalam keadaan kepadatan bakteri minimal 10⁶ CFU/ml di perairan untuk memunculkan luka (Setyawan dkk., 2012). Dengan demikian kualitas air tidak menjadi faktor yang mempengaruhi kelangsungan hidup larva, serta tidak meningkatkan kinerja bakteri patogen di kolom air, sehingga ikan yang mati dapat dipastikan diakibatkan oleh paparan bakteri pada ujiantang.

Pada ujiantang hari ke -13 tidak terdapat perbedaan yang nyata baik SR maupun RPS, hal ini karena pada fase larva sudah mulai berkembang menjadi fase benih dan organ - organ yang membantu terbentuknya antibodi sudah mulai berkembang, sehingga pada perlakuan kontrol (tanpa vaksinasi) sudah dapat mengurangi kematian akibat paparan bakteri *A. salmonicida* (Tatang, 2014).

KESIMPULAN

Kesimpulan dari hasil penelitian ini adalah, pemberian vaksin inaktif *A. salmonicida* pada indukan dengan dosis yang berbeda, menunjukkan adanya respon imun spesifik, pada uji titer antibodi dengan pemberian vaksin 0,3 ml dan 0,4 ml. Sedangkan untuk pemberian vaksin 0,5 ml tidak berpengaruh terhadap uji titer antibodi induk maupun larva.

Pemberian vaksin berpengaruh terhadap SR dan RPS larva yang ditetaskan. SR pada ujiantang hari ke-5 menunjukkan hasil berbeda nyata antar perlakuan terhadap kontrol, dengan kontrol lebih rendah Srnya dibanding dengan perlakuan lainnya. Hasil tetinggi diperoleh dari larva hasil induk yang divaksinasi dengan dosis 0,4 ml dengan SR 96,11% dan RPS 81,25%. Pemberian dosis vaksinasi induk yang sesuai untuk ikan mas, berkisar 0,3 - 0,4 ml.

DAFTAR PUSTAKA

- Afriyanto, E., & Liviawaty, E. 1992. *Pengendalian Hama dan penyakit*. Kanisius. Yogyakarta.
- Anderson, D. P. 1974. *Immunology of Fish Disease: Disease of Fish*. Sniesko JF, Axelrod HR (eds) Book 4. TFH publ. Neptune. New York.
- Astuti, S. P.2015. *Aplikasi Vaksin*. Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan. Balai Pengembangan Teknologi Perikanan dan Kelautan
- Austin, A., & D, A. A. 2007. *Bacterial Fish pathogen, Disease of Farm and Wild Fish Fourt Edition*. Spinger-Praxis Publising. UK.

- Bly, J. E., Grimm, A. S., & Morris, I. G. 1986. Transfer of Passive Immunity from Mother to Young in A Teleost Fish: Haemagglutinating Activity in the Serum and Eggs of Plaice, *Pleuronectes platessa* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* , 84: 309-313.
- Buller, N. B. 2004. *Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals: A practical Identification Manual*. CABI Publishing. Western Australia
- Cahyono, B. 2000. *Budidaya Air Tawar*. Kanisius. Yogyakarta.
- Cholik, F., Artanty, & Arifudin. 1986. *Pengelolaan Kualitas Air Kolam*. Direktorat Jendral Perikanan. Jakarta.
- Davis, K. L., Hiramatsu, N., Hiramatsu, K., Reading, J. B., Matsubara, T., Hara, A., et al. 2007. Induction of Three Vitellogenins by 17Beta-Estradiol with Concurrent Inhibition of the Growth Hormone-Insulin-Like Growth Factor 1 Axis in a Euryhaline Teleost, the Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Biology of Reproduction* , 77: 614-625.
- Fujaya, Y. 1999. *Bahan Pengajaran Fisiologis Ikan*. Universitas Hasanudin. Ujung Pandang.
- Ghenghesh, S. K., Ahmed, F., El- Khalek, A., Al - Gendy, A., & Klena, J. 2008. Aeromonas - Associated Infections in Developing Countries. *J. Infect Developing Countries* , 81-98.
- Gudkovs, N. 1988. Fish Immunology. *Fish Disease Veterinarians* , 531-544.
- Hadie, W., Angela, M. L., Sularto, & Evi, T. 2010. Imunitas Maternal Terhadap Aeromonas hidrophila: Pengaruhnya Terhadap Fekunditas dan Daya Tetas Ikan Patin Siam (*Pangasionodon hypothalamus*). *Jurnal Ris Akuakultur* , 5 (2): 229-235.
- Irianto, A. 2005. *Patologi Ikan Teleostei*. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- Mor, A., & Avtalion, R. R. 1990. Transfer of Antibody Activity from Immunized Mother to Embryo in Tilapias. *Journal Fish Biology* , 37: 249-255.
- Nazir, M. 2005. *Metode Penelitian*. Ghalia indonesia. Jakarta.
- Nur, Sukenda, & Dana, D. 2004. Ketahanan Benih Ikan Nila Gift (*Oreochromis niloticus* Linn) dari Hasil Induk yang Diberi Vaksin Terhadap Infeksi Buatan Streptococcus iniae. *Jurnal Akuakultur Indonesia* , 3 (1): 37-43.
- Nur, I. 2006. Respon Humoral Ikan Nila (*Oreochromis niloticus* Linne) yang Divaksinasi dengan Konsentrasi Bakteriin Aeromonas hydrophila yang Berbeda. *WARTA-WIPTEK* ,14 (2) : 60-66.
- Nur, I., Halipa, & Yusnaini. 2006. Peningkatan Imunitas Benih Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Melalui Vaksinasi Induk. *Warta-wiptek* , 14 (2): 60-66.
- 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 hypophthalmus*). *Jurnal Perikanan* , 9 (1) :17-25.
- Pasaribu, F. H., N, D., & M, P. 1990. *Pengobatan dan Pencegahan Penyakit Bercak Merah*. Balai Penelitian Perikanan Air Tawar. Bogor.
- Setyawan, A., Hudaidah, S., Ranopati, Z. Z., & Sumino. 2012. Imunogenesitas Vaksin Inaktif Wholecell Aeromonas salmonicida pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *Aquasains* , 1 : 17-21.
- Suseno, D. 1996. *Pengelolaan Usaha Pembenihan Ikan Mas*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Tang, U. M., & Affandi, R. 2000. *Biologi Reproduksi Ikan*. UNRI PRESS. Riau.
- Tatang. 2014. *Modul Praktek Vaksinasi Pada Ikan*. Loka pemeriksaan penyakit ikan dan lingkungan. Jakarta.