

<b>Full Paper</b>
-------------------

**PROTEIN *Aeromonas hydrophila* SEBAGAI VAKSIN UNTUK PENGENDALIAN  
MAS (MOTILE AEROMONAS SEPTICEMIA) PADA  
JAMBAL SIAM (*Pangasius hypophthalmus*)**

**PROTEIN OF *Aeromonas hydrophila* AS VACCINE TO CONTROL MAS (MOTILE  
AEROMONAS SEPTICEMIA) IN CATFISH (*Pangasius hypophthalmus*)**

Olga<sup>\*)</sup>, Ririen Kartika Rini<sup>\*)</sup>, Junius Akbar<sup>\*)</sup>, Alim Isnansetyo<sup>\*\*)</sup>  
dan Langkah Sembiring<sup>\*\*\*)</sup>

**Abstract**

Objectives of this study were to find out the protein of *Aeromonas hydrophila* for vaccine, and to evaluate the efficacy of the protein to control *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) in catfish (*Pangasius hypophthalmus*). *A. hydrophila* was isolated from the kidney of diseased catfish. The isolate was cultured, sonicated and centrifuged into cell-free extract and debris. The protein in the cell-free extract was precipitated with ammonium sulphate, dialyzed, then fractionated by gel filtration column chromatography on Sephadex G150. The concentration of protein were estimated by spectrophotometer at 280 nm. Fractions obtained from the gel filtration with high concentration of protein were analyzed by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The protein bands obtained from SDS-PAGE with molecular weight more than 10 kDa were tested for immunogenicity to mice. Furthermore, the most immunogenic protein was used for fish vaccination. The vaccinated and unvaccinated fishes were challenged with *A. hydrophila*. The results indicated that vaccination with the protein significantly increased ( $P < 0.01$ ) the antibody titer either in mice or catfish. Relative Percent Survival of catfish vaccinated with the protein at 5; 7.5; and 10  $\mu\text{g}/\text{fish}$  were 61.54%, 80.77% and 76.92%, respectively. The optimum dose of vaccine was 8.33  $\mu\text{g}/\text{fish}$  with maximum RPS of 82.05%.

**Key words:** *Aeromonas hydrophila*, catfish, MAS, vaccine

**Pengantar**

MAS (*Motile Aeromonas Septicemia*) yang disebabkan *Aeromonas hydrophila* merupakan penyakit ikan sistemik. Infeksi terjadi apabila inang mengalami *immunosuppressed* karena stres atau terinfeksi patogen lainnya dan penurunan kualitas air (Stevenson, 1988). Bakteri ini menyerang semua jenis ikan air tawar pada semua fase kehidupan (Supriyadi *et al.*, 1998).

Pencegahan dini terhadap serangan *A. hydrophila* perlu dikembangkan, salah satunya dengan vaksinasi. Vaksinasi untuk mencegah penyakit mempunyai prospek yang baik, karena tidak menimbulkan dampak negatif pada ikan, lingkungan dan konsumen. Ada beberapa hal yang perlu dipertimbangkan dalam pembuatan vaksin seperti antigen yang heterogen, imunitas yang relatif rendah dan cara aplikasinya di lapangan (Pasaribu *et al.*, 1990). Selain itu, efektivitas vaksinasi sangat tergantung pada jenis

<sup>\*)</sup> Jurusan Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan Universitas Lambung Mangkurat, Jl A.Yani Km 36,5 Banjarbaru

<sup>\*\*)</sup> Jurusan Perikanan, Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Jl. Flora Bulaksumur, Yogyakarta

<sup>\*\*\*)</sup> Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Jl Bulaksumur, Yogyakarta

<sup>\*)</sup> Penulis untuk korespondensi: E-Mail : olgarahman@yahoo.co.id

dan kualitas vaksin, cara vaksinasi (Souter, 1984), kondisi ikan (Dorson, 1984) dan lingkungan khususnya kualitas air (Ellis, 1988).

Penelitian penggunaan vaksin *A. hydrophila* telah banyak dilakukan, namun hasilnya bervariasi. Murtiningsih (2003) melaporkan bahwa vaksin protein *cell free extract* (sitoplasmik) menghasilkan rata-rata sintasan 66,7-100% dibandingkan kontrol 12,5% pada lele dumbo. Vaksin protein murni yang berasal dari protein *cell free extract* dengan berat molekul 40,750; 53,521; dan 86,578 kDa yang diisolasi menggunakan metode elektroelusi juga telah dicobakan pada lele dumbo. Hasil yang diperoleh bervariasi dengan sintasan 42,22-75,56% dibandingkan kontrol 2,22% pada lele dumbo (Olga et al., 2004). Selanjutnya, dilaporkan bahwa vaksin *whole cell* (sel utuh) dosis  $10^5$  sel/ml memberikan sintasan 63,33% dan dosis  $10^6$  sel/ml memberikan sintasan 76,67% pada jambal siam (Olga & Rini, 2006).

Menurut Golub (1987) kebanyakan imunogen berbentuk sebagai makro molekul protein yang terdiri dari sejumlah besar antigen determinan. Antigen determinan inilah yang menentukan spesifitas reaksi antigen-antibodi dan sebagai penentu respon imun. Oleh karena itu, perlu dikembangkan vaksin protein *A. hydrophila*, khususnya untuk mengendalikan MAS pada jambal siam. Penelitian ini bertujuan mengetahui efikasi vaksin protein *A. hydrophila* untuk menanggulangi MAS pada jambal siam (*P. hypophthalmus*).

## Bahan dan Metode

### Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan untuk uji imunogenisitas vaksin adalah mencit betina galur *Balbc* berusia 1,5 bulan. Vaksinasi pada ikan jambal siam dengan ukuran panjang baku 10-13 cm yang dipelihara dalam ember kapasitas 25 l

dengan kepadatan 10 ekor/ember.

### Isolat *A. hydrophila*

Isolat bakteri yang digunakan untuk pembuatan vaksin dan uji tantang adalah bakteri *A. hydrophila* (strain AP-02) hasil isolasi dari jambal siam sakit di Banjarbaru, Kalimantan Selatan dan telah melalui uji Postulat Koch dan uji fenotifik.

### Pembuatan vaksin protein *A. hydrophila*

Kultur bakteri *A. hydrophila* pada media TSA (*Tryptone Soya Agar*) (Merck) dipanen dengan sentrifuse (Beckman, Model J-6B) pada kecepatan 3.000 rpm selama 20 menit dan dicuci 3 kali dengan PBS 0,01 M pH 7,4. Pelet bakteri disuspensikan ke dalam 0,5-3 ml PBS 0,01 M pH 7,4, kemudian sel *A. hydrophila* disonikasi pada 159 Hz sebanyak 6 kali 30 detik pada suhu 4°C. Homogenat yang diperoleh disentrifuse 12.000 rpm selama 15 menit dan supernatan diambil. Protein diendapkan menggunakan 70% amonium sulfat, selanjutnya didialisis dalam 0,01 M PBS pH 7,4. Fraksinasi dilakukan dengan kolom kromatografi (*gel filtration*) dengan matriks Sephadex G150 dan Buffer Tris pH 8,0. Protein yang terelusi diukur absorbansinya pada 280 nm. Selanjutnya fraksi yang menunjukkan absorbansi tinggi dianalisis dengan SDS-PAGE dengan konsentrasi acrilamide 12%. Sebagai bahan perbandingan, dianalisis juga protein *A. hydrophila* yang tidak difraksinasi dengan gel filtrasi. Protein marker yang digunakan adalah *Mid-Ranger Protein MW Marker* (Promega). Selanjutnya konsentrasi protein dalam tabung kolektor yang menunjukkan berat molekul > 10 kDa diukur dengan *Protein assay kit* (Bio-rad) pada absorbansi 595 nm. Protein *A. hydrophila* sebagai kandidat vaksin disimpan pada suhu -20°C sebelum diujikan.

### Imunogenisitas protein *A. hydrophila* pada mencit

Protein diinjeksi pada mencit dengan dosis 20 µg protein/ekor secara intraperi-

toneal. Masing-masing perlakuan *cell free extract*, protein hasil fraksinasi dan kontrol (PBS) diinjeksikan dengan 4 ulangan. *Booster* dengan dosis yang sama dilakukan lima hari berikutnya. Selanjutnya, satu minggu setelah *booster* dan satu minggu berikutnya dilakukan pengambilan darah dengan *bleeding* melalui mata menggunakan tabung hematokrit. Antibodi diukur dengan metode aglutinasi. Protein yang menghasilkan titer antibodi tertinggi pada mencit dipilih untuk vaksinasi pada jambal siam.

#### *Vaksinasi pada jambal siam*

Vaksinasi dilakukan dengan injeksi pada 5; 7,5; dan 10 µg protein/ekor ikan, sedangkan kontrol diinjeksi dengan PBS. Masing-masing perlakuan dengan 3 ulangan. Satu minggu setelah vaksinasi, ikan uji *dibooster* dengan cara yang sama dan dua minggu kemudian dilakukan ujiantang (*challenge test*) dengan *A. hydrophila*. Sampel darah diambil sebelum vaksinasi, setiap satu minggu dan sebelum ujiantang untuk pengukuran titer antibodi.

#### *LD<sub>50</sub> A. hydrophila pada jambal siam*

Penentuan LD<sub>50</sub> *A. hydrophila* pada jambal siam digunakan untuk menentukan konsentrasi inokulum pada saat ujiantang. Perhitungan LD<sub>50</sub> dilakukan berdasarkan metode Reed-Muench (Anderson, 1974). Jambal siam diinfeksi *A. hydrophila* melalui injeksi secara intramuskular dengan dosis 0,1 ml suspensi bakteri dengan kepadatan 3,5 x 10<sup>4</sup>; 3,5 x 10<sup>5</sup>; 3,5 x 10<sup>6</sup>; 3,5 x 10<sup>7</sup>; 3,5 x 10<sup>8</sup>; 3,5 x 10<sup>9</sup>; dan 3,5 x 10<sup>10</sup> cfu/ml, sedangkan kontrol diinjeksi dengan akuades steril (Jutono *et al.*, 1980). Ikan yang telah diinjeksi dipelihara dalam ember berkapasitas 20 liter dengan kepadatan 10 ekor/ember. Pengamatan dilakukan setiap hari untuk mengetahui kematian ikan dan gejala penyakit pada masing-masing ember selama 7 hari.

#### *Uji tantang (Challenge Test)*

Rancangan percobaan dengan menggunakan *Completely Randomized Design*. Ujiantang dilakukan 2 minggu setelah *booster*. Infeksi dilakukan secara intramuskular berdasarkan hasil uji LD<sub>50</sub>, yaitu dengan konsentrasi suspensi bakteri 3,5 x 10<sup>6</sup> cfu/ekor ikan (volume injeksi 0,1 ml). Selanjutnya, ikan dipelihara selama dua minggu. Seminggu pertama, ikan yang telah diinfeksi tidak diberi makan, sedangkan minggu kedua diberi makan.

#### *Kualitas Air*

Kualitas air yang diamati meliputi oksigen terlarut (metode Winkler), CO<sub>2</sub> bebas (alkalimetri), Ammoniak (metode spektrofotometri), pH dan suhu.

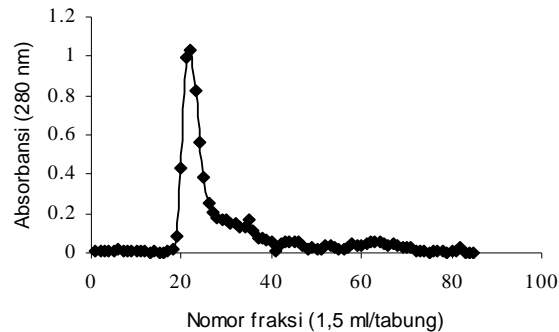
#### *Analisis Data*

Data sintasan, *Relative Percent Survival* (RPS) dan Rerata Waktu Kematian (RWK) dianalisis dengan analisis sidik ragam (ANOVA) dan uji lanjut dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT).

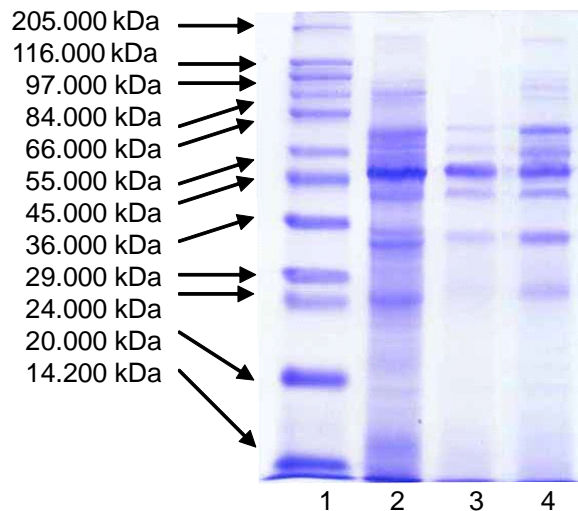
## Hasil dan Pembahasan

Gel filtrasi menghasilkan 1 puncak (*peak*) pada fraksi nomor 20-35. Kandungan protein total tertinggi terdapat pada fraksi nomor 22 (Gambar 1). Selanjutnya, protein total pada fraksi nomor 20 dan 22 dipilih untuk dianalisis dengan SDS-PAGE (Gambar 2).

Gambar 2 memperlihatkan bahwa pada *cell free extract* terdapat 21 pita protein, sedangkan pada protein fraksi nomor 20 terdapat 6 pita protein dan fraksi nomor 22 terdapat 11 pita protein. Setelah pergerakan relatif (Rf) masing-masing protein dihitung, dengan bantuan kurva baku protein standart dan nilai Rf diperoleh persamaan  $y = -0,4007 \ln(x) + 4,1989$ . Perkiraan BM protein pada *cell free extract* berkisar antara 18,012-190,196 kDa. Selanjutnya, perkiraan BM protein hasil kromotografi dari fraksi nomor



Gambar 1. Fraksinasi protein *cell free extract* ( $A_{280nm}$ ) dengan kolom kromatografi (*gel filtration* dengan matrik Sephadex G150).



Gambar 2. Profil protein *cell free extract* bakteri *A. hydrophila*. Lajur 1: Marker, lajur 2: protein *cell free extract* (*crude*) tanpa purifikasi, lajur 3-4: protein *cell free extract* hasil kolom kromatografi (*gel filtration*) pada fraksi nomor 20 dan 22.

20 berkisar 26,427-55,797 kDa dengan protein dominan pada BM 45 kDa, sedangkan perkiraan BM fraksi nomor 22 berkisar 26,427-190,196 kDa dengan protein dominan pada BM 45 kDa dan 55,797 kDa.

Titer antibodi mencit pada sampling pertama dan kedua menunjukkan bahwa vaksin yang berasal dari protein fraksi nomor 22 memberikan titer antibodi yang tertinggi dibandingkan dengan perlakuan vaksin yang lainnya maupun kontrol (Tabel 1). Oleh karena itu, protein dari fraksi nomor 22 dipilih sebagai vaksin pada jambal siam.

Perlakuan dosis vaksin protein 5; 7,5; dan 10  $\mu\text{g}$ /ekor ikan menghasilkan titer antibodi yang meningkat dengan tajam dibandingkan kontrol pada jambal siam. Akan tetapi, perlakuan dosis vaksin protein 7,5  $\mu\text{g}$ /ekor ikan menghasilkan titer antibodi yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan dosis 5 dan 10  $\mu\text{g}$ /ekor ikan (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan protein *A. hydrophila* sebagai vaksin dapat meningkatkan titer antibodi pada jambal siam.

Menurut Subowo (1993) protein merupakan makromolekul yang imunogen

Tabel 1. Rerata titer antibodi mencit setelah vaksinasi

Vaksinasi dengan	Bleeding ke-	
	1	2
Cell free extract	1024 ± 724,08	512 ± 362,04
Protein dari fraksi no 20	1536 ± 591,21	384 ± 147,80
Protein dari fraksi no 22	1664 ± 760,00	1280 ± 512,00
Kontrol (tanpa vaksinasi)	2,5 ± 1,00	2,5 ± 1,00

Tabel 2. Rerata titer antibodi jambal siam

Dosis vaksin (µg/ekor)	Bleeding ke-		
	I	II	III
5	1,33 ± 0,58 <sup>a</sup>	170,67 ± 73,90 <sup>a</sup>	512,00 ± 0,00 <sup>b</sup>
7,5	1,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	597,00 ± 391,05 <sup>a</sup>	1706,67 ± 591,21 <sup>a</sup>
10	1,33 ± 0,58 <sup>a</sup>	554,67 ± 449,52 <sup>a</sup>	1194,67 ± 782,09 <sup>ab</sup>
Kontrol	1,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	1,33 ± 0,58 <sup>b</sup>	1,67 ± 0,58 <sup>c</sup>

Keterangan: Rerata pada kolom yang sama yang diikuti dengan huruf *superscript* yang sama tidak berbeda nyata pada (P>0,05). I, Sebelum vaksinasi; II, sebelum *booster*; III, sebelum ujiantang.

yang dapat merangsang limfosit untuk menghasilkan antibodi. Protein dengan berat molekul lebih besar dari 10 kDa biasanya bersifat imunogenik. Walaupun demikian, Almendras (2001) menyatakan bahwa hanya daerah-daerah permukaan tertentu dari molekul itu (epitop) yang menentukan spesifisitas reaksi antigen-antibodi dan juga sebagai penentu timbulnya respon imun. Di samping itu, protein dengan berat molekul yang besar diduga mempunyai jumlah epitop yang banyak.

Titer antibodi tertinggi dihasilkan oleh jambal siam yang divaksin dengan dosis 7,5 µg protein/ekor ikan. Menurut Bellanti (1993) dosis vaksin dapat mengubah imunogenisitas dan ada dosis tertentu dari suatu antigen yang dapat menimbulkan respon antibodi maksimal. Hal ini sesuai dengan pendapat Nitimulyo & Triyanto (1990) yang menyatakan bahwa peningkatan dosis vaksin tidak selalu sebanding dengan kenaikan titer antibodi, karena pada pemberian dosis terlalu rendah atau terlalu tinggi dapat mempengaruhi adanya induksi toleransi imunogenik, yaitu terjadinya penekanan respon antibodi karena ikan tidak mampu melangsungkan respon imun seluler dan humoral.

Sintasan ikan yang divaksin lebih tinggi dibandingkan kontrol (P<0,05) (Tabel 3). Hal ini menunjukkan bahwa vaksinasi mampu melindungi ikan dari serangan *A. hydrophila*. Selanjutnya, nilai rerata RPS tertinggi terdapat pada perlakuan jambal siam yang divaksin dengan dosis 7,5 µg/ekor. Berdasarkan hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa nilai RPS antara perlakuan yang divaksin tidak berbeda nyata.

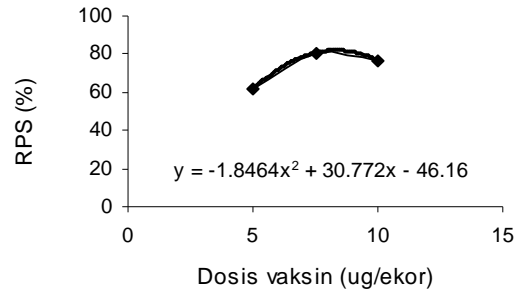
Berdasarkan analisis *orthogonal polinomial* (Gambar 3), maka dapat diketahui dosis vaksin protein optimum sebesar 8,33 µg/ekor ikan akan memberikan nilai RPS maksimum sebesar 82,05% pada jambal siam. Hasil penelitian ini berbeda dengan hasil yang diperoleh Murtiningsih (2003) yang menyatakan bahwa dosis optimum vaksin protein *cell free extract* sebanyak 7,4 µg/ekor yang mampu memberikan nilai RPS maksimum sebanyak 81,18% pada lele dumbo. Perbedaan dosis optimal ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan jenis ikan maupun jenis protein yang digunakan untuk vaksin.

Rerata Waktu Kematian antara ikan yang divaksin dengan kontrol menunjukkan beda nyata (P<0,05) karena ikan yang divaksin.

Tabel 3. Rerata sintasan, *Relative Percent Survival* (RPS) dan Rerata Waktu Kematian (RWK) jambal siam setelah uji tantang

Dosis vaksin ( $\mu\text{g}$ protein/ekor)	Sintasan (%)	RPS (%)	RWK
5	66,67 $\pm$ 5,77 <sup>a</sup>	61,54 $\pm$ 6,66 <sup>a</sup>	2,19 $\pm$ 0,17 <sup>b</sup>
7,5	83,33 $\pm$ 5,77 <sup>a</sup>	80,77 $\pm$ 6,66 <sup>a</sup>	3,50 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup>
10	80,00 $\pm$ 10,00 <sup>a</sup>	76,92 $\pm$ 11,54 <sup>a</sup>	3,28 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>
Kontrol	13,33 $\pm$ 11,55 <sup>b</sup>	-	1,23 $\pm$ 0,13 <sup>c</sup>

Keterangan: Rerata pada kolom yang sama yang diikuti dengan huruf *superscript* yang sama tidak berbeda nyata pada ( $P > 0.05$ )



Gambar 3. Hubungan antara dosis vaksin dengan *Relatif Percent Survival* (RPS)

mempunyai kekebalan spesifik (Tabel 3). Hal ini menunjukkan bahwa vaksinasi mampu menunda kematian jambal siam yang diinfeksi *A. hydrophila*. Hal ini sesuai dengan penelitian Spense *et al.* (1965 *cit.* Nitimulyo *et al.*, 1994) yang menjelaskan bahwa vaksinasi untuk mencegah bakteri *A. salmonicida* selain dapat menurunkan tingkat kematian ikan, juga dapat memperpanjang waktu kematian ikan yang divaksin.

Rerata waktu kematian sebesar 3,50 hari pada perlakuan dosis vaksin protein *A. hydrophila* sebanyak 7,5  $\mu\text{g}$ /ekor dan RWK sebesar 3,28 hari pada dosis sebanyak 10  $\mu\text{g}$ /ekor dalam penelitian ini menunjukkan bahwa vaksin protein yang diberikan mampu menunda waktu kematian lebih lama dibandingkan dengan hasil penelitian Olga & Rini (2006) yang menggunakan vaksin sel utuh *A. hydrophila* untuk jambal siam. Dalam penelitian tersebut dilaporkan bahwa vaksin sel utuh dengan dosis  $10^5$  sel/ml dan  $10^6$  sel/ml mempunyai RWK masing-masing sebesar 2,56 hari dan 2,72 hari.

Parameter kualitas air sebelum, selama

dan sesudah penelitian tidak menunjukkan adanya variasi yang besar. Suhu udara berkisar antara 27,5-32°C, suhu air 26-31°C, oksigen terlarut 4,5-7,6 ppm, CO<sub>2</sub> 4,5-11,2 ppm, Amoniak 0,01-0,0241 ppm, dan pH 6,8-7,3. Secara keseluruhan nilai kisaran kualitas air masih mendukung untuk kehidupan jambal siam. Dengan demikian, kualitas air bukan merupakan faktor penyebab kematian jambal siam selama penelitian.

### Kesimpulan

Protein *A. hydrophila* (BM 26,427-190,196 kDa) yang difraksinasi dengan metode *gel filtration* dapat dijadikan vaksin. Efektivitas vaksin tersebut dilihat dari meningkatnya titer antibodi, sedangkan efikasinya dilihat dengan tingginya nilai *Relative Percent Survival* (RPS) dan semakin panjangnya waktu kematian jambal siam yang diberi vaksin dibandingkan kontrol. Berdasarkan hubungan antara dosis vaksin dengan RPS menunjukkan bahwa dosis optimal vaksin protein sebanyak 8,33  $\mu\text{g}$ /ekor mampu memberikan nilai RPS maksimum sebesar 82,05%.

### Ucapan Terimakasih

Hasil penelitian ini merupakan bagian hasil penelitian Hibah Pekerti yang dibiayai oleh Proyek Peningkatan Penelitian Pendidikan Tinggi, Direktorat Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional.

### Daftar Pustaka

- Almendras, J.M.E. 2001. Immunity and biological methods of disease prevention and control. *In: Health management in aquaculture*. G.D.Lio-po, C.R. Lavilla, and E.R. Cruz-Lacierda (Eds.). Aquaculture Departement Southeast Asian Fisheries Development Center, Philippines: 111-136.
- Anderson, D.P. 1974. Fish immunology. *In: Disease of fishes*. Volume 4. S.F. Snieszko and H.R. Axelrod (Eds.). T.F.H. Publication. Inc Ltd. The British Crown Colony of Hongkong. 239 p.
- Bellanti, J.A. 1993. Immunobiology (Imunologi, diterjemahkan oleh A.S. Wahab). Gajah Mada University Press. Fakultas Kedokteran UGM: 203-209.
- Dorson, M. 1984. Applied immunology of fish. Symposium on Fish Vaccination. O.I.E. Fish Diseases Commission. Paris: 39-74.
- Ellis, A.E. 1988. Optimizing factors for fish vaccination. *In: Fish vaccination*. A.E. Ellis (Ed.). Academic Press Ltd. London: 32-46.
- Golub, E.S. 1987. Immunology a synthesis. Sinauer Associates, Inc. Sunderland-Massachusetts. 551 p.
- Jutono, J. Soedarsono, S. Hartadi, S. Kabirun S., D. Suhadi, dan Soesanto. 1980. Pedoman praktikum mikrobiologi umum (untuk perguruan tinggi). Departemen Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 181 p.
- Murtiningsih. 2003. Penggunaan vaksin protein sitoplasma bakteri *A. hydrophila* pada lele dumbo (*Clarias gariepinus*). Skripsi. Fakultas Pertanian Jurusan Perikanan. Universitas Gadjah Mada. 74 p.
- Nitimulyo, K.H. dan Triyanto. 1990. Sistem pertahanan tubuh dan diagnosis serologi penyakit ikan. Pelatihan Karantina Ikan. Bogor 21 Mei-4 Agustus 1990: 52-59.
- Nitimulyo, K.H., Triyanto, dan Sri Hartati. 1994. Penanggulangan penyakit *Motil Aeromonas Septicemia* (MAS) pada ikan lele (*Clarias sp.*). Lembaga Penelitian UGM dan Balitbang Pertanian. Yogyakarta. 45 p.
- Nitimulyo, K. H., Triyanto, dan Sri Hartati. 1997. Efikasi vaksin dan kemangkusan tetrasiklin untuk penanggulangan penyakit MAS pada pendederan lele dumbo (*Clarias gariepinus*). *Jurnal Perikanan UGM (GMU Journal Fisheries Science)*. 1(2) : 25-30.
- Olga, L. Sembiring, dan Triyanto. 2004. Pengendalian penyakit MAS (*Motile Aeromonas Septicemia*) pada lele dumbo (*Clarias gariepinus*) melalui vaksinasi. *Sains dan Sibernatika*. 17(3): 467-476.
- Olga dan R.K. Rini. 2006. Penggunaan vaksin *whole cell* untuk pengendalian penyakit MAS (*Motile Aeromonas Septicaemia*) pada ikan patin (*Pangasius hypophthalmus*). *Agrosientia*. 13 (1): 48-54.
- Pasaribu, F. H., N. Dalimunthe, dan M. Poeloengan. 1990. Pengobatan dan pencegahan penyakit ikan bercak merah. Prosiding Seminar Nasional II

- Penyakit Ikan dan Udang 16-18 Januari. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian: 143-152.
- Souter, B.W. 1984. Immunization with vaccines. Departement of Fish an Oceans. Winnipeg. Mannitoba: 111-117.
- Stevenson, R.M.W. 1988. Vaccination against *Aeromonas hydrophila*. *In: Fish vaccination*. A.E. Ellis (Ed.). Academic Press Ltd. London: 112-121.
- Subowo. 1993. *Imunobiologi*. Penerbit Angkasa.Bandung. 233 p.
- Supriyadi, H. M., O. Komarudin, dan J. Slembrouk. 1998. Preliminary study of the source of *Aeromonas hydrophila* infection on *Pangasius hypophthalmus* larvae. *In: The biological diversity and aquaculture of Clariid and Pangasiid catfish in South-East Asia*. M. Legendre and A. Pariselle (Eds.). Proceedings of The Midterm Workshop of the "Catfish Asia Project": 219-222.