

**TOKSISITAS DAN IMUNOGENISITAS PRODUK EKSTRASELULER
Streptococcus agalactiae TIPE NON-HEMOLITIK PADA IKAN NILA
(*Oreochromis niloticus*)**

(*Toxicity and Immunogenicity of Non-Haemolytic Type Streptococcus agalactiae of Extracellular Products on Nile Tilapia Oreochromis niloticus*)

Sefti Heza Dwinanti^{*,1)}, Sukenda²⁾, Munti Yuhana²⁾, Angela M Lusastuti³⁾

¹⁾PS. Akuakultur, Fakultas Pertanian, Universitas Sriwijaya Jl. Raya Palembang-Prabumulih KM. 32 Indralaya, Ogan Ilir 30662, telp 0711-580059, faks. 0711-580276

²⁾Departemen Budidaya Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor Kampus IPB Dramaga Bogor 16680

³⁾Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar, Jl. Sempur No. 1 Bogor Telp. 0251-313200
Faks 0251-327890

* Korespondensi email : heza_dwinanti@yahoo.com

ABSTRACT

The aim of this research was to analyse the toxicity and immunogenicity of ECP of non-hemolytic *S. agalactiae* and to evaluate ECP as a material vaccine for prevention of *S. agalactiae*. Toxicity to tilapia was detected in the ECP. There was a chronic mortality pattern which was shown after post ECP injection. By intraperitoneal injection into young tilapia (± 20 g), the median lethal dose were calculated at 633,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bodyweight for isolate 3 and 685,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bodyweight for isolate 5. Cytopathic effects of ECP to tilapia's lymphocytes were observed during 0, 30, 60 and 180 minutes. A mixture of ECP caused nuclear granulation and cytoplasmic streaming after 60 minutes. Using immunodiffusion analysis, precipitate line was demonstrated against tilapia anti-ECP sera, and there was bio-specific type anti sera against for each isolate. The ECP vaccine effective to protect tilapia from *S. agalactiae* was injected intraperitoneally (IP) at 2×10^5 CFU/ml. Tilapia vaccinated with ECP from isolat 3 which protein 283 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bodyweight had a RPS value 60%. Tilapia vaccinated with ECP from isolat 5 which protein 408 $\mu\text{g}/\text{kg}$ had a RPS value 68%.

Keywords: *toxicity, immunogenicity, extracellular products, Streptococcus agalactiae, tilapia*

PENDAHULUAN

Streptococcus agalactiae adalah bakteri Gram positif yang menjadi patogen utama pada budidaya ikan nila di Indonesia. Pada budidaya ikan nila merah di Malaysia 70% dari ikan yang terinfeksi penyakit bakteri merupakan infeksi dari *S.*

agalactiae (Zahra *et al* 2008). Sedangkan dari 500 isolat bakteri yang berasal dari budidaya ikan nila di Asia dan Amerika Latin 82% teridentifikasi sebagai *S.agalactiae* (Sheehan 2009). Secara umum bakteri ini menunjukkan gejala

klinis yaitu abnormalitas pada mata (*exophthalmia*, *purulens*, *opacity*), kehilangan keseimbangan ketika berenang (*whirling disease*), bentuk badan seperti huruf "C", nafsu makan menurun, warna tubuh menjadi lebih gelap, bercak merah, asites dan pada kondisi akut dapat menyebabkan ikan kehilangan cairan pada saluran pencernaan serta tidak berfungsinya sebagian organ (Hardi 2011). Sebagai patogen bakteri ini memiliki faktor virulensi untuk menginfeksi inang terutama pada eksotoksin yaitu *extracellular product* (ECP)-nya (Williams 2003). Diduga ECP *S. agalactiae* yang terdiri dari kapsular polisakarida, protein permukaan dan beberapa sekresi protein inilah yang membantu bakteri menempel pada sel epitel inang serta menghindari mekanisme pertahanan tubuh inang (Glaser *et al.* 2002). ECP merupakan salah satu faktor virulensi *S. agalactiae* dan tipe non hemolitik diduga sebagai tipe yang lebih virulen karena konsentrasi protein pada ECP-nya lebih tinggi yaitu 13,64 ppm sedangkan tipe hemolitik 8,18 ppm (Hardi 2011).

Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk mengendalikan penyakit ini dengan cara pemberian vaksin. Pemanfaatan bakteri baik menggunakan sel utuh bakteri (*whole cells vaccine*)

maupun zat toksin yang dihasilkan bakteri (*extracellular products vaccine*) ataupun gabungan keduanya mampu memberikan proteksi pada ikan nila dari infeksi *S. agalactiae* walaupun hasilnya belum maksimal (Hardi 2011). Vaksin jenis sel utuh, ECP dan gabungan keduanya mampu meningkatkan sel-sel imunitas ikan baik secara spesifik maupun non spesifik. Walaupun material vaksin ECP lebih berpotensi untuk melindungi ikan dari infeksi *S. agalactiae* karena yang dihasilkan adalah anti toksin namun efikasi vaksin ECP lebih rendah dibandingkan vaksin sel utuh ataupun gabungannya.

Penelitian ini dilaksanakan dengan tujuan untuk mengetahui toksisitas protein ECP *Streptococcus agalactiae* serta mengetahui kemampuan protein tersebut untuk membangkitkan respon imun ikan nila *Oreochromis niloticus* sehingga diharapkan akan menghasilkan kandidat vaksin yang efektif untuk memproteksi ikan nila terhadap serangan bakteri *S. agalactiae*.

BAHAN DAN METODE

Karakterisasi Bakteri dan Produk Ekstraseluler *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae isolat 3 dan isolat 5 koleksi Laboratorium

Kesehatan Ikan BRPAT Bogor yang akan digunakan sebelumnya dikarakterisasi sebelum digunakan sebagai bakteri uji (Hardi 2011). Identifikasi protein ECP dilakukan untuk mengetahui konsentrasi total protein terlarut dengan metode Bradford dan berat molekul masing-masing protein dengan SDS-PAGE (BioGen).

Pengujian Toksisitas Produk Ekstraseluler *Streptococcus agalactiae*

Pengujian toksisitas ECP dilakukan secara *in vitro* dan *in vivo*. Pada pengujian secara *in vitro* dilakukan pengamatan terhadap kerusakan limfosit ikan nila yang dipaparkan dengan ECP pada 0, 30, 60 dan 180 menit (Kawahara, Oshima dan Nomura 1990). Separasi limfosit dari darah ikan menggunakan Percoll mengacu pada Blaxhall dan Sheard (1985) dengan modifikasi pelarut sukrosa 0,25 M. Pewarnaan preparat ulas limfosit menggunakan Giemsa 6,6%. Sedangkan pada pengujian secara *in vivo* digunakan ikan nila sebanyak 15 ekor dengan bobot rata-rata 20 g/ekor. Dosis protein yang digunakan mengacu pada hasil pengukuran konsentrasi protein yaitu 283,75 µg/Kg; 425,625 µg/Kg; 567,5 µg/Kg dan 709,375 µg/Kg untuk isolat 3 dan dosis protein 408,75 µg/Kg, 613,125 µg/Kg, 817,5

µg/Kg dan 1021,875 µg/Kg untuk isolat 5. Selanjutnya ikan dipelihara selama 14 hari dan dilakukan pengamatan kematian ikan, perubahan pola renang dan patologi anatomi organ luar. Penentuan LD₅₀ berdasarkan jumlah kematian yang tercatat pasca infeksi dan dihitung dengan menggunakan metode Karber.

Pengujian Imunogenisitas Produk Ekstraseluler *Streptococcus agalactiae*

Pengujian imunogenisitas ECP dilakukan secara *in vitro* dan *in vivo*. Pengujian secara *in vitro* dilakukan dengan analisa imunodifusi pada agar semi solid dimana sebagai antigen adalah produk ekstraseluler dan sebagai antibodi adalah serum anti ECP ikan nila. Serum anti ECP diproduksi dari penyuntikan ECP yang telah diinaktifkan pada ikan nila dengan bobot 250 g/ekor. Setelah pemeliharaan 14 hari pemanenan serum anti ECP dilakukan. Sedangkan pada pengujian secara *in vivo* digunakan ikan nila sebanyak 33 ekor dengan bobot rata-rata 20 g/ekor. ECP yang telah diinaktifkan dengan *neutral buffer formaline* 3% disuntikan secara intraperitoneal ke ikan nila sebanyak 0,1 ml/ekor. Pada hari ke-14 pemeliharaan dilakukan uji tantang dengan bakteri beserta ECP (sel dan media kultur) *Streptococcus agalactiae* yang dikultur selama 24 jam. Efektifitas vaksin ditinjau

dari nilai *Relative Percent Ratio* (RPS) dengan menggunakan rumus Ellis (1988). Sebagai data pendukung terhadap status kesehatan ikan, dilakukan pengukuran gambaran darah berupa total eritrosit, total leukosit, kadar hematokrit dan kadar hemoglobin pada hari ke-0, ke-7 dan ke-14 setelah vaksinasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi Bakteri dan Produk Ekstraseluler *Streptococcus agalactiae*

Bakteri *Streptococcus agalactiae* isolat 3 yang dibiakan selama 72 jam mencapai kepadatan 2×10^9 CFU/ml dengan nilai kepadatan optik 0,426, sedangkan kepadatan bakteri isolat 5 mencapai 6×10^8 CFU/ml dengan kepadatan optik 0,392. Identifikasi bakteri uji disajikan pada Tabel 1 dan Gambar 1. Konsentrasi protein untuk isolat 3 yang memiliki nilai absorbansi 0,3 adalah 56,75

ppm sedangkan untuk isolat 5 yang memiliki nilai absorbansi 0,4 adalah 81,75 ppm. Pengukuran konsentrasi protein tersebut menggunakan persamaan kurva standar metode Bradford yaitu $y = 0,004x + 0,073$.

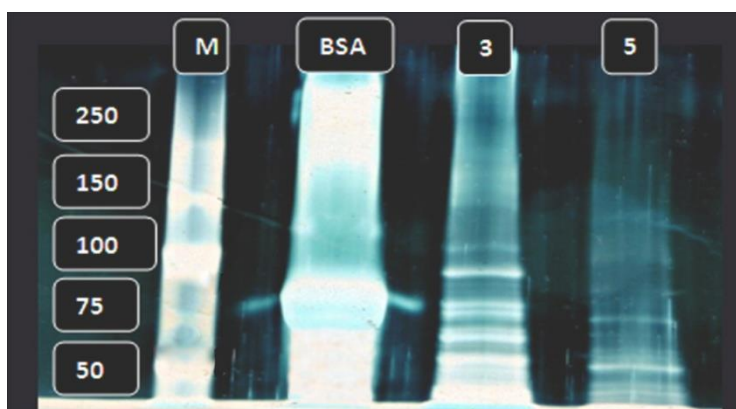
Identifikasi berat molekul protein produk ekstraseluler bakteri yang menggunakan perwarnaan perak memberikan hasil bahwa isolat 3 memiliki 7 jenis protein dan isolat 5 memiliki 3 jenis protein. Untuk mengetahui berat molekul yang terdapat di ECP, dilakukan perhitungan masing-masing protein dengan membandingkan jarak antar pita pada marker. Perkiraan berat molekul protein isolat 3 adalah 57,3 KDa; 66,2 KDa; 67,6 KDa; 78,9 KDa; 82,2 KDa; 92,8 KDa dan 106,2 KDa. Sedangkan perkiraan berat molekul protein isolat 5 adalah 21,9 KDa; 53 KDa dan 76,3 KDa (Gambar 2).

Tabel 1 Karakteristik bakteri *Streptococcus agalactiae* isolat 3 dan isolat 5

Pengujian	Karakteristik	
	Isolat 3	Isolat 5
Gram	positif	positif
Katalase	negatif	negatif
Oksidase	negatif	negatif
Oksidase-Fermentatif	fermentatif	fermentatif
Motilitas	non motil	non motil
Morfologi	kokus	kokus
Produksi asam dari <i>D-mannitol</i>	negatif	negatif
Uji hemolisin	non hemolitik	non hemolitik



Gambar 1. Morfologi *Streptococcus agalactiae* isolat 3 (a), isolat 5 (b) dan uji hemolisin isolat 3 dan isolat 5 (c)



Gambar 2. Berat molekul protein produk ekstraseluler *Streptococcus agalactiae* isolat 3 dan isolat 5 (SDS-PAGE) dengan pewarnaan perak

Pengujian Toksisitas Produk Ekstraseluler *Streptococcus agalactiae*

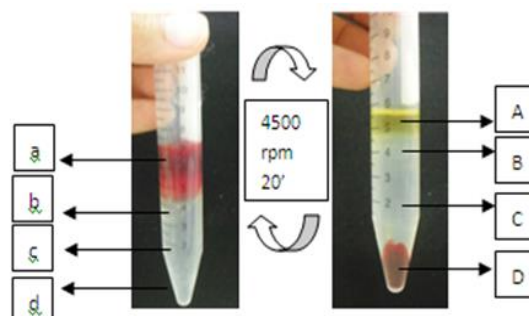
Pemisahan limfosit dari darah ikan yang menggunakan Percoll disajikan pada Gambar 3. Kerusakan sel limfosit yang terjadi setelah terpapar produk ekstraseluler *Streptococcus agalactiae* dapat dilihat pada Gambar 4.

Dari Gambar 4 dapat dilihat terjadi kerusakan secara bertahap terhadap

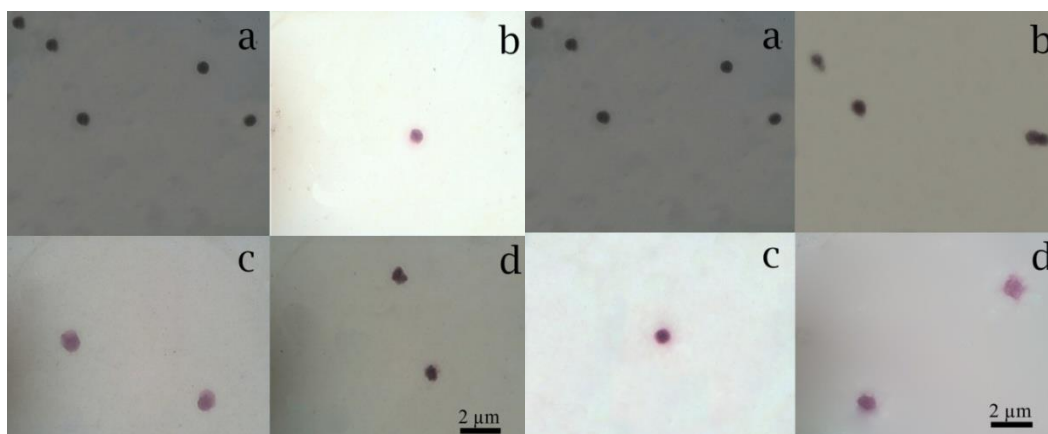
struktur limfosit. Pada 0 jam dan 30 menit setelah terpapar, kekompakan limfosit baik inti ataupun sitoplasma masih relatif bagus. Setelah 1 jam sitoplasma limfosit mulai rusak dan setelah 3 jam terpapar kerusakan inti sel dan sitoplasma sangat jelas terlihat. Persentase kerusakan limfosit akibat terpapar produk ekstraseluler *S. agalactiae* dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Kerusakan limfosit setelah pemaparan produk ekstraseluler *Streptococcus agalactiae* (%)

Persentase kerusakan (%)	Waktu pemaparan (menit)		
	30	60	180
Isolat 3	1,1	5,1	7,6
Isolat 5	0,75	5,05	10,5



Gambar 3 Pemisahan sel limfosit dengan menggunakan *Percoll discontinuous gradient*. Darah ikan nila (a); percoll dengan konsentrasi 30%, gradient : 1,061SG (b); percoll dengan konsentrasi 40%, gradient : 1,064 SG (c); percoll dengan konsentrasi 50 %, gradient : 1,066 SG(d); lapisan I, gradient : 1,054 SG(A); lapisan II, gradient : 1,061 SG (Limfosit) (B), lapisan III, gradient : 1,050 S G (C); lapisan IV (sel darah merah) (D)



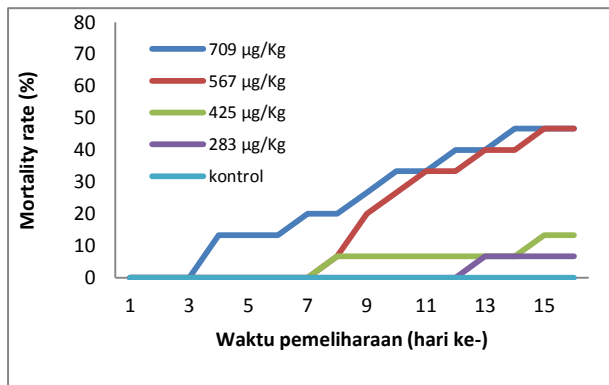
Isolat 3

Isolat 5

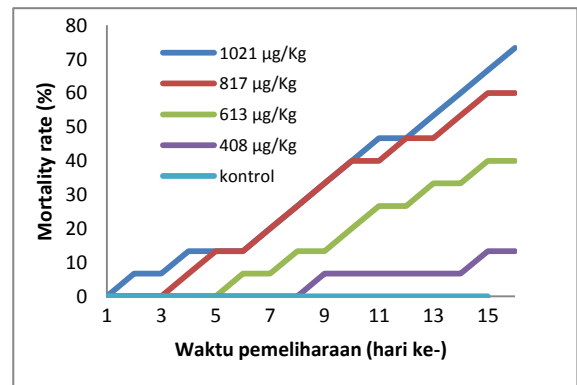
Gambar 4 Perubahan morfologi sel limfosit dari 0 jam (a), 30 menit (b), 1 jam (c) dan 3 jam (d)

Pengujian toksisitas produk ekstraseluler *Streptococcus agalactiae* yang dilakukan secara *in vivo* pada ikan nila dilihat dari pola kematiannya setelah

infeksi. Pola kematian ikan nila yang diamati selama 14 hari menunjukkan pola kematian kronis seperti yang tersaji pada Gambar 5.



(a)



(b)

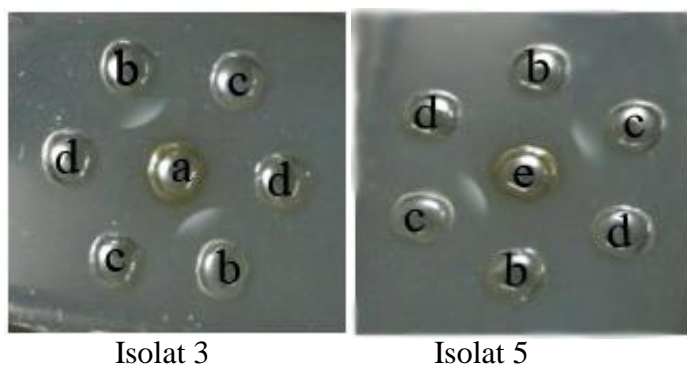
Gambar 5. Pola kematian ikan nila pasca infeksi dengan produk ekstraseluler *Streptococcus agalactiae*. Isolat 3 (a) dan isolat 5 (b)

Dari Gambar 5 dapat dilihat bahwa pola kematian ikan setelah dilakukan infeksi dengan produk ekstraseluler terjadi secara bertahap. Pada Gambar 5 tidak ditemukan kematian akut dan persentase kematian yang paling tinggi terdapat pada konsentrasi tertinggi protein produk ekstraseluler *S. agalactiae* baik isolat 3 dan isolat 5. Persentasi kematian tertinggi pada akhir pemeliharaan terdapat pada dosis tertinggi dari setiap perlakuan yaitu

46,67% untuk isolat 3 dan 73,33% untuk isolat 5. Berdasarkan perhitungan nilai LD₅₀ untuk isolat 3 adalah 6158 µg/kg dan isolat 5 adalah 7532 µg/kg.

Pengujian Imunogenisitas Produk Ekstraseluler *Streptococcus agalactiae*

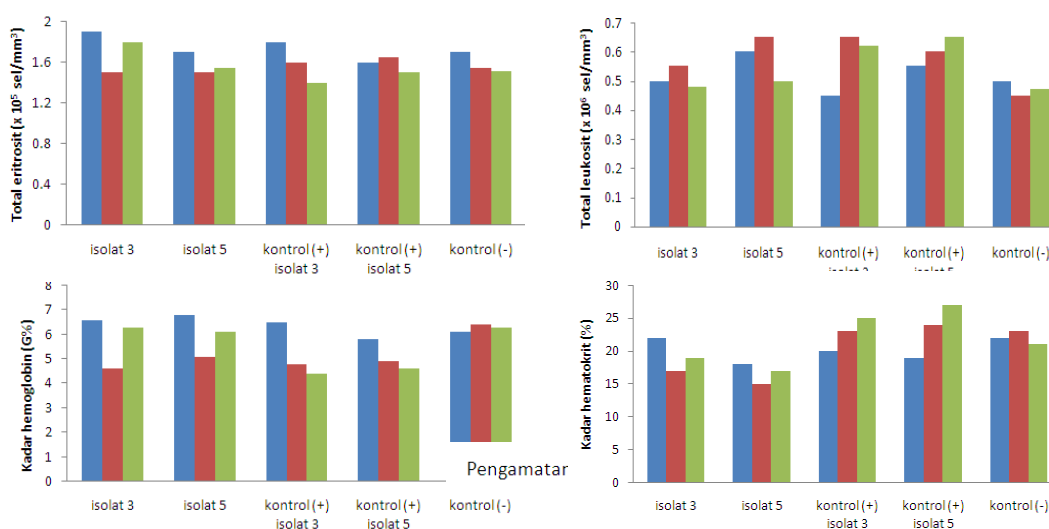
Pengujian imunogenisitas produk ekstraseluler *Streptococcus agalactiae* yang dilakukan secara *in vitro* dengan metode imunodifusi dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Analisa immunodifusi produk ekstraseluler *Streptococcus agalactiae*. (a) anti serum ikan nila dari ECP *S. agalactiae* isolat 3, (b) produk ekstraseluler *S. agalactiae* isolat 3, (c) produk ekstraseluler *S. agalactiae* isolat 5, (d) PBS, (e) anti serum ikan nila dari ECP *S. agalactiae* isolat 5

Dari gambar diatas dapat dilihat bahwa produk ekstraseluler *S. agalactiae* bersifat imunogenik. Endapan putih antara sumur yang terbentuk merupakan ekspresi dari kompleks antigen-antibodi. Secara *in vivo* kemampuan produk ekstraseluler yang dijadikan vaksin untuk memproteksi ikan nila dari serangan *S. agalactiae* dengan kepadatan bakteri 2 x

10⁵ CFU/ml memberikan hasil perlindungan relatif (*relative percent survival/RPS*) sebesar 60% untuk isolat 3 dan 68% untuk isolat 5. Pemantauan status kesehatan ikan pada saat ujiantang ikan nila yang telah divaksinasi dengan bakteri dapat dilihat dari gambaran darah ikan yang tersaji pada Gambar 7.



Gambar 7. Gambaran darah ikan nila yang divaksinasi setelah uji tantang dengan bakteri *Streptococcus agalactiae*

PEMBAHASAN

Streptococcus agalactiae merupakan bakteri penyebab penyakit streptococcosis atau meningoencephalitis pada ikan nila (Evans *et al.* 2008). Infeksi pada otak ikan menyebabkan terganggunya keseimbangan dan menimbulkan kelainan pada mata. Akibat dari infeksi tersebut kematian pada ikan dapat terjadi baik secara akut ataupun kronis. Dari hasil karakteristik bakteri uji, diperoleh bahwa bakteri *S. agalactiae* yang digunakan adalah tipe non hemolitik. Berdasarkan kemampuannya melisis sel darah merah, *Streptococcus* dibagi menjadi tiga kelompok yaitu alpha hemolitik, beta hemolitik dan non hemolitik (Bullock 1981). Pada ikan, telah diisolasi tipe alpha hemolitik (Minami *et al.* 1979), beta hemolitik (Minami *et al.* 1979; Boomker *et al.* 1979; Robinson and Meyer 1966), and non hemolitik (Plumb *et al.* 1974). ECP merupakan salah satu faktor virulensi *S. agalactiae* dan tipe non hemolitik diduga sebagai tipe yang lebih virulen (Hardi 2011). Sebagai bakteri septikemia, *S. agalactiae* menyebar melalui pembuluh darah dan menyebabkan hemoragi pada permukaan kulit (asites) dan organ dalam (otak dan mata). Eldar *et al.* (1994) menemukan bakteri *S. agalactiae* tipe non

hemolitik menyebabkan septikemia dan meningoencephalitis pada ikan nila di Israel.

Sebagai bakteri patogen, *S. agalactiae* memiliki faktor virulensi untuk menginfeksi inang. Salah satu faktor virulensinya adalah kandungan toksin yang merupakan hasil metabolisme atau sering disebut produk ekstraselular (ECP). Sebagai eksotoksin ECP bersifat imunogenik dengan target biokimia dari toksin tersebut terletak pada proses intraseluler, komponen membran ataupun neurotransmitter (Woolf 2000). Dari penelitian yang telah dilakukan, ECP bersifat toksik pada ikan nila dengan nilai LD₅₀ sebagaimana yang telah disebutkan. Gejala klinis yang ditimbulkan akibat infeksi ECP pada ikan nila hampir sama dengan gejala klinis yang ditimbulkan akibat infeksi langsung dari bakteri. Kelainan organ mata, kehilangan keseimbangan berenang dan penurunan nafsu makan terjadi setelah infeksi. Protein ECP yang diduga mengandung toksin juga diujikan secara *in vitro* pada sel limfosit. Limfosit merupakan salah satu sel utama yang memediasi respon imun pada tubuh ikan (Blaxhall dan Sheard 1984). Kerusakan yang terjadi pada limfosit mengindikasikan bahwa protein ECP mampu merusak mekanisme

pertahanan tubuh. Hal tersebut juga menjelaskan tentang proses patogenesis pada tingkat seluler dimana ECP bekerja secara intraseluler. Mekanisme masuknya ECP kedalam limfosit dapat terjadi melalui dua cara. Alternatif pertama yaitu secara langsung dimana subunit ECP berikatan dengan reseptor spesifik pada limfosit dan menginduksi pembentukan pori pada membran dan selanjutnya ECP masuk kedalam sel. Alternatif kedua yaitu ECP mengikat limfosit, kemudian subunit ECP masuk kedalam sel melalui mekanisme endositosis reseptor-mediated (RME). Didalam sel, ECP dinetralisasi oleh endosome, akan tetapi keberadaan H^+ didalam endosome membantu subunit ECP terpisah. Subunit yang terpisah tersebut bekerja sesuai fungsinya, dimana salah satu subunit tetap berada dalam limfosit dan subunit lainnya keluar kepermukaan limfosit (Kenneth 2009). Walaupun persentase kerusakan yang ditimbulkan setelah 3 jam pemaparan dengan ECP berbeda antara kedua isolat, tetapi hal tersebut selaras dengan semakin lama waktu pemaparan maka kerusakan yang terjadi pada limfosit semakin tinggi. Secara visual kerusakan pertama kali terjadi pada bagian sitoplasma sel kemudian diikuti dengan pecahnya inti sel.

Kerusakan yang terjadi setelah 3 jam pemaparan dengan ECP dan pola kematian ikan yang terjadi secara kronik menjelaskan bahwa pada tingkat seluler ECP mampu merusak sel dengan waktu yang singkat akan tetapi pada tingkat individu yang lebih kompleks ECP hanya menyebabkan kematian bertahap. Pada tingkat individu, ECP yang masuk kedalam tubuh ikan mendapatkan perlawanan imunitas baik secara humoral maupun secara seluler.

Selain bersifat toksik, kajian tentang sifat imunogenik protein ECP *S. agalactiae* juga dilakukan. Pada pengujian imunodifusi terlihat bahwa protein ECP bersifat imunogenik dan memiliki sifat proteksi spesifik bio-tipe. Hal yang sama juga dinyatakan oleh Hardi (2011) dimana pembentukan kompleks antigen-antibodi hanya terbentuk dari isolat yang sama. Karena memiliki sifat yang imunogenik pengembangan vaksin untuk memproteksi ikan nila dari serangan bakteri ini dapat ditindak lanjuti. Inaktifasi protein ECP dengan *neutral buffer formalin* 3% untuk dijadikan kandidat vaksin bisa diterapkan. Efikasi vaksin ECP yang memiliki nilai RPS sebesar 60% untuk isolat 3 dan 68% untuk isolat setelah diuji tantang dengan kepadatan bakteri 2×10^5 CFU/ml,

menunjukkan vaksin efektif untuk diterapkan. Ellis (1988) menyatakan suatu vaksin dikatakan efektif apabila nilai RPS pada saat pengujian efikasi vaksin memiliki nilai >50%. Status kesehatan ikan yang diamati dari gambaran darah menjelaskan pada hari ke-7 setelah uji tantang kondisi fisiologi ikan terganggu akibat infeksi bakteri. Penurunan jumlah eritrosit dan kadar hemoglobin serta meningkatnya jumlah leukosit menjelaskan bahwa ikan sedang mengalami infeksi dan tubuh ikan mengantisipasi kondisi tersebut dengan memproduksi leukosit lebih banyak sebagai respon imunitas. Pada hari ke-14 sangat terlihat perbedaan kondisi kesehatan ikan yang divaksin dengan ikan kontrol. Tahapan pemulihan kondisi tubuh ikan sebagai upaya homeostatis dapat dilihat dari peningkatan jumlah eritrosit dan kadar Hb serta penurunan jumlah leukosit. Sedangkan pada ikan kontrol penurunan jumlah eritrosit dan peningkatan jumlah leukosit tetap terjadi. Secara keseluruhan dapat dikatakan bahwa vaksin ECP yang diberikan pada ikan mampu memproteksi ikan dari serangan bakteri *S. agalactiae*.

KESIMPULAN

Protein produk ekstraseluler *Streptococcus agalactiae* tipe non hemolitik dapat menyebabkan penyakit streptococcosis pada ikan nila pada konsentrasi protein minimum terlarut 56,75 ppm atau setara dengan 283 µg/Kg untuk isolat 3 dan 81,75 ppm atau setara dengan 408 µg/Kg untuk isolat 5. Pemanfaatan ECP sebagai kandidat vaksin untuk memproteksi ikan nila terhadap penyakit tersebut dapat dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Blaxhall PC, Daisley KW. 1973. Routine Haematological Methods for Used with Fish Blood. *J. Fish Biol.* 5:577-581.
- Boomker J, Imes GD, Cameron CM, Naude TW, Schoonbee HJ. 1979. Trout mortalities as a result of *Streptococcus* infection. *J. Vet. Res.* 46(2):71-78.
- Bullock GL. 1981. Streptococcal infection of fish. Us fish & wildlife publications. University of Nebraska Lincoln.
- Ellis AE. 1988. Fish vaccination. London: Academic Press Ltd.
- Evans JJ *et al.* 2008. Genomic diversity of *Streptococcus agalactiae* isolates from multiple hosts and their

- infectivity in Nile tilapia. *Proceedings of the 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture*. Cairo, Egypt 12-14 Oktober 2008. Volume 2: hlm 1199-1209.
- Glaser P *et al.* 2002. Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. *Molecular Microbiology* 45:1499–1513.
- Hardi EH. 2011. Kandidat Vaksin Potensial *Streptococcus agalactiae* untuk Pencegahan Penyakit Streptococcosis Pada Ikan Nila *Oreochromis niloticus* [disertasi]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Kawahara E, Oshima S, Nomura S. 1990. Separation of Lymphocytes from the Peripheral Blood of Coho Salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56 (2) 363.
- Kenneth T. 2009. The mechanism of bacterial pathogenicity. <http://www.textbookofbacteriology.net/themicrobialworld/pathogenesis.html>. [terhubung berkala][14 Nov 2011].
- Minami T, Nakamura M, Ikeda Y, Ozaki H. 1979. A beta-hemolytic *Streptococcus* isolated from cultured yellowtail. *Fish Pathol.* 14(1):33-38
- Plumb JA, Schachte JH, Gaines J L, Peltier W, Carroll B. 1974. *Streptococcus* sp. from marine fishes along the Alabama and northwest Florida coast of the Gulf of Mexico. *Trans. Am.Fish. Soc.* 103(2):358-361.
- Robinson JA, Meyer FP. 1966. Streptococcal fish pathogen. *J. Bacteriol.* 92(2):512
- Sheehan B. 2009. Streptococcosis in tilapia: A more complex problem than expected?. *Proceeding of Managing Streptococcus in Warmwater Fish*. Veracruz, Mexico 25 September 2009. Volume 3: hlm 9-14.
- Williams ML, Azadi P, Lawrence ML. 2003. Comparison of cellular and extracellular products expressed by virulent and attenuated strains of *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Aquatic Animal Health* 15:264 – 273.
- Woolf N. 2000. Cell, tissue and disease the basis of pathology 3th edition. New York: WB Sanders.
- Zahra AS, Padilah B, Azila A, Rimatulhana R, Shahidan H. 2008. Multiple streptococcal species infection in cage-cultured red tilapia but showing similar clinical signs. Diseases in asian aquaculture VI. Fish health section, asian fisheries society, manila, philippines. hlm 550.