

## **Pengaruh Proses Freeze-Drying terhadap Viabilitas *Streptococcus agalactiae* pada Media Chitosan, Skim Milk, dan Media Kultur BHIB**

### ***The Effect of the Freeze-Drying Process on Viability *Streptococcus agalactiae* on Chitosan Media, Skim Milk, and BHIB Culture Media***

**Aranty Fahira Ardisa<sup>1\*)</sup>, N Nafiqoh<sup>2</sup>, TH Kurniati<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Negeri Jakarta, Jakarta Timur, DKI Jakarta, Indonesia

<sup>2</sup> Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar (BRPBAT), Bogor 16151, Indonesia

<sup>\*)</sup>Penulis untuk korespondensi: arantfahiraardisa@gmail.com

**Sitasi:** Ardisa FA, Nafiqoh N, Kurniati TH. 2021. The effect of the freeze-drying process on viability streptococcus agalactiae on chitosan media, skim milk, and BHIB culture media. *In: Herlinda S et al. (Eds.), Prosiding Seminar Nasional Lahan Suboptimal ke-9 Tahun 2021, Palembang 20 Oktober 2021.* pp. 296-304. Palembang: Penerbit & Percetakan Universitas Sriwijaya (UNSRI).

#### **ABSTRACT**

*Streptococcus agalactiae* bacteria are cocci-shaped bacteria, gram positive, catalase (-) and are pathogenic that can attack fish. One of the alternative to overcome the attack of pathogenic bacteria is by giving vaccines to fish. Vaccines can be made using the freeze-drying technique, which has the advantage of maintaining the quality of the drying results. This study aims to determine the technique of making *S. agalactiae* vaccines by freeze-drying on encapsulation media and to determine the viability of *S. agalactiae* on skim milk, chitosan and BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*) culture media. The stages of making the freeze-dried vaccines include confirmation of *S. agalactiae* bacteria through Gram staining, catalase enzyme test, and detection of virulence factor genes based on cps L, cps J, and cps G genes. The vaccine was made using the freeze dryer method on chitosan encapsulation media, skimmed milk, and BHIB. The viability of bacteria in vaccine preparations was known based on the calculation of the total plate number. The test results showed the isolates were gram positive, coccus-shaped and catalase negative. The isolates were also confirmed to have cps L, cps J, and cps G genes. After 24 hours the total bacterial plate count in skim milk and chitosan medium was  $8 \times 10^{12}$  CFU/ml and  $3.2 \times 10^{12}$  CFU/ml, while in BHIB medium the number of colonies exceeds the calculation standard limit. Based on these results, the three tested media have potential as encapsulation media for *S. agalactiae* vaccine production.

**Keywords:** *freeze-drying method*, encapsulation media, *Streptococcus agalactiae*, vaccine, viability

#### **ABSTRAK**

Bakteri *Streptococcus agalactiae* merupakan bakteri berbentuk kokus, gram positif, katalase (-) dan bersifat patogen yang dapat menyerang ikan. Salah satu alternatif untuk mengatasi serangan bakteri patogen tersebut dengan cara pemberian vaksin pada ikan. Vaksin dapat dibuat dengan teknik kering beku (*freeze-drying*), yang mempunyai keunggulan dalam mempertahankan mutu hasil pengeringan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui teknik pembuatan sediaan vaksin *Streptococcus agalactiae* dengan metode kering beku pada media enkapsulasi dan mengetahui viabilitas *streptococcus agalactiae* pada media skim milk, chitosan dan media kultur BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*). Tahapan pembuatan vaksin meliputi konfirmasi bakteri *S. agalactiae* melalui pewarnaan Gram, uji enzim katalase, dan uji deteksi gen faktor virulen berdasarkan gen cps L, cps J, dan cps G. Pembuatan vaksin menggunakan metode kering beku (*freeze dryer*) pada media

enkapsulasi chitosan, skim milk, dan BHIB. Viabilitas bakteri pada sediaan vaksin diketahui berdasarkan perhitungan angka lempeng total. Hasil uji menunjukkan isolat merupakan gram positif, berbentuk coccus dan bersifat katalase negatif. Isolat juga terkonfirmasi memiliki gen cps L, cps J, dan cps G. Setelah 24 jam pembuatan vaksin, angka lempeng total bakteri pada medium skim milk dan chitosan berturut-turut sebesar  $8 \times 10^{12}$  CFU/ml dan  $3,2 \times 10^{12}$  CFU/ml, sementara pada medium BHIB jumlah koloni melampaui batas standar perhitungan. Berdasarkan hasil tersebut, ketiga media yang diujikan memiliki potensi sebagai media enkapsulasi dalam pembuatan vaksin *S. agalactiae*.

Kata kunci: metode kering beku, media enkapsulasi, *Streptococcus agalactiae*, vaksin, viabilitas

## PENDAHULUAN

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) merupakan salah satu ikan konsumsi dan memiliki nilai ekonomis yang tinggi (Fariq, 2018). Tingginya permintaan pasar akan kebutuhan ikan nila menjadikan ikan nila banyak dikembangkan di Indonesia. Permintaan ikan nila sangat beragam mulai dari bentuk ikan segar hingga dalam bentuk fillet maupun olahan. Permintaan tersebut mencakup permintaan pasar domestik maupun non domestik (Amerika dan Eropa). Produksi ikan nila tercatat sebesar 1.2 juta ton pada tahun 2017 dan mengalami peningkatan sebesar 111.61% selama kurun waktu 2011-2017 (DJPB 2018; Fitzsimmons 2018).

Menurut Wardoyo (2007), ikan nila menjadi komoditas unggulan karena mudah berkembang biak. Berdasarkan keunggulan yang dimiliki ikan nila menjadikan perikanan budidaya ikan air tawar di Indonesia memiliki potensi besar untuk dikembangkan. Namun adanya kendala yang dialami dalam proses pemeliharaan ikan nila seperti terjadinya serangan penyakit infeksi menyebabkan penurunan hasil produksi.

Penyakit infeksi pada ikan air tawar dapat disebabkan oleh virus, bakteri, jamur maupun parasit. Salah satu penyakit infeksi yang menyerang ikan adalah penyakit bacterial (Fariq, 2018). Penyakit bacterial yang banyak menyerang ikan nila adalah *streptococcosis* yang disebabkan oleh bakteri *Streptococcus agalactiae*. Infeksi *streptococcosis* dilaporkan terjadi di beberapa wilayah di Sumatera, Jawa, Kalimantan, Sulawesi, Nusa Tenggara, dan Papua, dengan berbagai gejala klinis diantaranya *meningoensefalitis*, *unilateral/bilateral exophthalmos*, *pop-eye*, berkurangnya nafsu makan, sumsum tulang belakang melengkung membentuk huruf C, dan berenang tidak menentu (*erratic*) (Amal, M.N.A., & Zamri-Saad, M. 2011; Suhermanto 2019).

Menurut Pasnik *et al.* (2009), *Streptococcus agalactiae* banyak menyerang ikan baik pada perairan umum maupun pada ikan budidaya yang menyebabkan banyak terjadinya kerusakan organ. Wabah bakteri *Streptococcus agalactiae* dapat menyebabkan kematian tinggi hingga mencapai 100% pada ikan budidaya (Hernandez *et al.*, 2009). Bakteri *S. agalactiae* dinilai menjadi penyebab kematian ikan nila di dunia (Tavares, G.C., Costa, F.A.A., Santos, R.R.D., Barony, G.M., Leal, C.A.G., & Figueiredo, H.C.P. 2016; Kannika, K., Pisuttharachai, D., Srisapome, P., Wongtavatchai, J., Kondo, H., Hirono, I., Unajak, S., & Areechon, N. 2017; Mishra, A., Nam, G. H., Gim, J. A., Lee, H. E., Jo, A., & Kim, H. S. 2018).

Ikan yang mengalami infeksi harus segera dilakukan pengobatan, pengobatan penyakit *streptococcosis* sudah banyak dilakukan diantaranya dengan vaksinasi. Vaksinasi telah terbukti menjadi strategi pencegahan penyakit yang efektif dengan kemampuan untuk mengurangi wabah penyakit (Pridgeon *et al.*, 2012). Saat ini vaksin dalam bentuk cair banyak digunakan untuk pengendalian penyakit bacterial pada ikan, akan tetapi vaksin cair

memiliki beberapa kekurangan. Menurut Sugiani *et al.* (2018), penyimpanan vaksin dalam bentuk cair hanya bertahan selama satu tahun dalam suhu 4°C. Antigen yang terkandung dalam vaksin mempunyai masa tanggal kadaluarsa tertentu dan terdapat beberapa kemungkinan produk vaksin akan cepat rusak jika di simpan pada suhu ruang.

Salah satu pengembangan vaksin pada ikan adalah dengan pembuatan sediaan vaksin dengan metode kering beku (*freeze-drying*). Menurut Sugiani *et al.* (2016), jenis sediaan vaksin kering (*powder*) lebih banyak diminati pembudidaya untuk digunakan dalam aplikasi vaksinasi. Bakteri dikeringkan pada suhu rendah (*freeze dry*) menggunakan pengeringan vakum (*vacuum drying*) dengan tujuan untuk meningkatkan daya tahan dalam proses lama waktu penyimpanan (Chavez & Ledebouer, 2007). Teknik pengeringan kering beku merupakan salah satu metode teknik pengeringan yang mempunyai keunggulan dalam mempertahankan mutu hasil pengeringan khususnya untuk produk yang sensitif terhadap panas (Novindo, 2017). Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode preparasi sediaan produk vaksin melalui metode kering beku (*freeze dry*) dengan pengeringan vakum untuk pengendalian penyakit ikan dan mengetahui viabilitas *streptococcus agalactiae* pada media skim milk, chitosan dan media kultur BHIB dengan perhitungan angka lempeng total.

## **BAHAN DAN METODE**

Digunakan isolat bakteri *S. agalactiae* koleksi Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar, depok. Isolat bakteri di isolasi dari organ ginjal ikan nila saat terjadi wabah infeksi streptococcosis, kemudian dikultur dalam media *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA; Oxoid Ltd, UK). Konfirmasi bakteri dilakukan dengan uji pewarnaan Gram, uji katalase, uji deteksi gen faktor virulen berdasarkan gen cps L, cps J, dan cps G. Pengamatan dan pengukuran sel bakteri menggunakan mikroskop *Olympus* dan kamera *Olympus*. Pembekuan dan pengeringan (*freeze dry*) dilakukan dalam deep freezer pada suhu -70°C selama 48 jam dan dikeringkan dengan vakum selama pada suhu -100°C selama 24 jam.

### **Uji Deteksi Gen Faktor Virulen**

Sediaan kultur isolat berumur 18-24 jam diambil 1-2 *loop* ose steril lalu dimasukkan ke dalam 500 µl *nuclease free water* dalam mikrotube 1.5 ml dan dihomogenkan. Ekstraksi menggunakan metode pemanasan di *thermomixer waterbath* pada suhu 98°C selama 10 menit. Selanjutnya disentrifus pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit, 400 µl supernatan yang sudah terpisah diambil dari sel bakteri dan dipindahkan ke dalam *mictotube* baru. DNA kemudian diukur konsentrasi dan kemurniannya menggunakan *nanodrop*. DNA yang akan digunakan mempunyai nilai konsentrasi 50 ng/µl dengan kemurnian 260/280 = 1-2. 10 µl amplicon PCR dielektroforesis pada 1.5% agarose gel dengan buffer TAE 1x dan marker 100 bp.

### **Uji Viabilitas Bakteri *Streptococcus agalactiae***

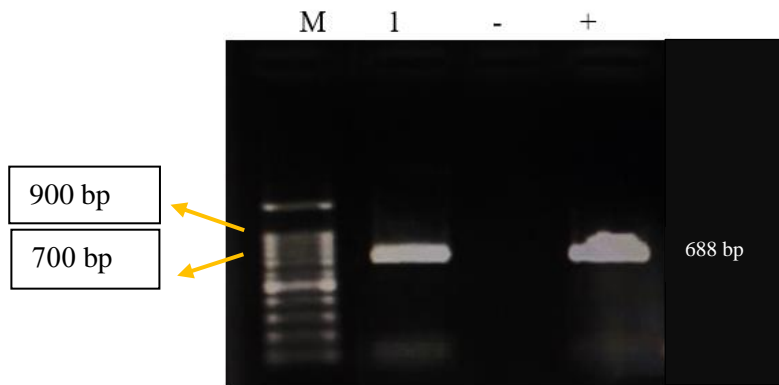
Isolat ditumbuhkan dalam media *brain heart infusion broth* (BHIB) kemudian diinkubasi dalam *incubator* pada suhu 28°C selama 48 jam. Bakteri yang tumbuh kemudian dilakukan pengenceran *serial dilution* dan diambil sebanyak 20 µl, disebar dalam BHIA dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang suhu 28°C dan dilakukan penghitungan koloni dengan metode *total plate count* (TPC).

## HASIL

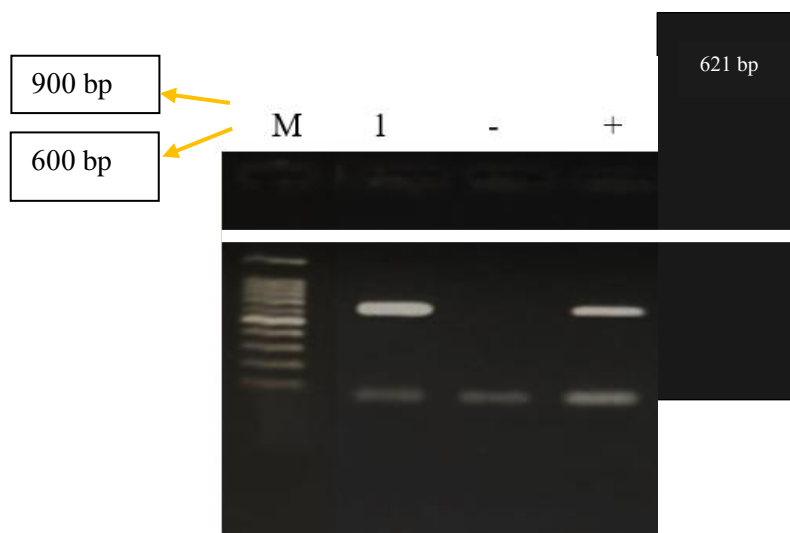
Hasil konfirmasi pewarnaan menunjukkan bakteri termasuk Gram positif dan uji katalase negatif. Bentuk koloni bakteri kokus dengan ukuran sel yang berbeda-beda, Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Anshary, H., Kurniawan, R.A., Sriwulan S., Ramli, R., & Baxa, D.V. (2014); Al-Harbi (2016) yang mengkarakterisasi bakteri *S. agalactiae* penyebab infeksi *streptococcosis* pada ikan nila di Danau Sentani Papua dan Arab Saudi.

Hasil isolasi bakteri yang diperoleh dari ginjal ikan nila, telah diperoleh 1 isolat yaitu N14G. Diagnosa PCR menggunakan primer spesifik untuk *Streptococcus agalactiae* yaitu cps L, cps J, cps G (Imperi *et al*, 2010) yang mengamplifikasikan gen 16S rDNA.

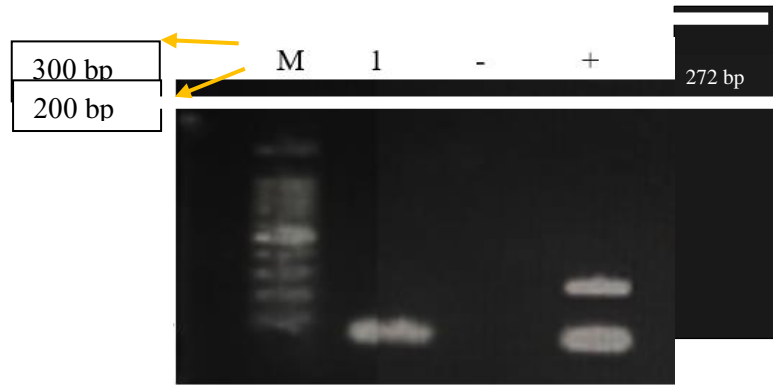
Hasil amplifikasi DNA tersebut menghasilkan pita positif, hal ini menunjukkan semua isolat merupakan bakteri *S. agalactiae*. Berdasarkan amplifikasi gen spesifik *S. agalactiae* cps L, cps J, dan cps G dengan *polymerase chain reaction* (PCR) terbukti lebih sensitif, spesifik, dan cepat dalam mendeteksi keberadaan *S. agalactiae*.



Gambar 1. Visualisasi hasil amplifikasi cps L 688 bp M=marker 100 bp, 1. Sampel, kontrol negatif dan kontrol positif



Gambar 2. Visualisasi hasil amplifikasi cps J 621 bp M=marker 100 bp, 1. Sampel, kontrol negatif dan kontrol positif



Gambar 3. Visualisasi hasil amplifikasi cps G 272 bp M=marker 100 bp, 1. Sampel, kontrol negatif dan kontrol positif

Visualisasi DNA dilakukan dengan elektroforesis dengan menggunakan 1,5% gel agarose. Pada (Gambar 1-3) menunjukkan bahwa semua sampel terbentuk pita DNA dengan ukuran 688 bp, 621 bp, dan 272 bp yang berwarna putih dan tebal. Hal ini menunjukkan pasangan primer yang digunakan menempel pada posisi yang ditargetkan. Meskipun pita DNA terbentuk dengan baik tetapi masih terdapat smear yang terlihat pada hasil cps G.

Hasil produk sediaan vaksin kering beku sel utuh *Streptococcus agalactiae* dalam bentuk serbuk disimpan dalam wadah *screw cap tubes* 2 ml dan diisi sediaan vaksin. *Freeze dry* dilakukan dengan lama waktu pengeringan  $\pm$  24 jam, angka lempeng total bakteri pada medium skim milk dan chitosan berturut-turut sebesar  $8 \times 10^{12}$  CFU/ml dan  $3,2 \times 10^{12}$  CFU/ml, sementara pada medium BHIB jumlah koloni melampaui batas standar perhitungan.

Tabel 1. Jumlah angka lempeng total *S. agalactiae* dalam media enkapsulasi chitosan, skim milk dan BHIB (CFU/mL)

Media	Pengenceran			Jumlah Koloni (CFU/mL)
	$10^{-7}$	$10^{-9}$	$10^{-11}$	
Chitosan	TBUD*	157	64	$3,2 \times 10^{12}$
Skim Milk	220	44	34	$8 \times 10^{12}$
BHIB	TBUD*	TBUD*	TBUD*	TBUD*

Keterangan : TBUD\* > 300 CFU/mL

Hasil sediaan vaksin kering beku *S. agalactiae* terdehidrasi menjadi serbuk berwarna putih kecoklatan pada medium skim milk dan chitosan berturut-turut sebesar 0,55gr dan 0,86gr, sementara pada medium BHIB berat bersih sebesar 0,19gr. Bakteri yang dikeringkan dapat menghasilkan produk yang terdehidrasi dan lebih stabil selama penyimpanan. Sediaan vaksin dalam bentuk kering yang telah terdehidrasi diharapkan mampu lebih tahan lama jika dibandingkan dengan produk vaksin cair dan dapat disimpan pada suhu ruang dengan daya simpan yang lebih lama.

Tabel 2. Berat bakteri *S. agalactiae* sesudah proses kering beku (*Freeze dry*)

Media	Berat Botol (g)	Sesudah Freeze-dry	
		Berat Kotor (g)	Berat Bersih (g)
BHIB	14.35	14.54	0.19
Chitosan	14.35	15.21	0.86
Skim Milk	14.35	14.90	0.55

Bakteri kering dapat bertahan selama lebih dari tiga bulan pada suhu 30°C. Penambahan protein dan karbohidrat juga mampu menambah masa waktu penyimpanan dan efektivitasnya dapat dipertahankan secara optimal. Penggunaan protein seperti susu skim dapat menghasilkan tingkat ketahanan bakteri kering terbaik selama penyimpanan.

## PEMBAHASAN

Penelitian tentang *S. agalactiae* sebagai penyebab utama kematian pada ikan nila sudah banyak dilakukan. Ikan nila yang terinfeksi *streptococcosis* memiliki gejala yang sama dan khas seperti penelitian Li, (2014) dan Suhermanto, (2019). Isolasi DNA dapat dilakukan baik dari organ otak, hati, limfa dan ginjal ikan nila, organ-organ tersebut merupakan organ target *S. agalactiae* yang dapat digunakan untuk mendeteksi bakteri tersebut secara langsung dari jaringan. Hasil PCR memperlihatkan bahwa ginjal merupakan organ target *S. agalactiae*, bakteri ini dapat diisolasi dan diidentifikasi dari organ tersebut. Pita positif pada 688 bp, 621 bp, dan 272 bp menggunakan primer spesifik cps L, cps J, dan cps G (Imperi *et al*, 2010) diperoleh dari organ ginjal ikan nila.

Uji konfirmasi pewarnaan gram menunjukkan bakteri termasuk Gram positif dan uji katalase negatif. Bentuk koloni bakteri kokus dengan ukuran sel yang berbeda menunjukkan bahwa bakteri merupakan *S. agalactiae*. Uji katalase yang dilakukan pada isolat untuk mengetahui kemampuan isolat dalam menghasilkan enzim katalase serta toleransi isolat terhadap oksigen. Uji katalase negatif tidak terbentuk buih pada larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang ditambahkan koloni bakteri.

Visualisasi DNA dilakukan dengan elektroforesis dengan menggunakan 1,5% gel agarose, gel agarose ini berfungsi untuk memisahkan DNA berdasarkan besarnya pasangan nukleotida penyusun DNA tersebut. Pasangan basa nukleotida dengan ukuran kecil lebih mudah bermigrasi ke kutub positif, sedangkan pasangan nukleotida dengan ukuran besar lebih sulit bermigrasi. Visualisasi pita DNA menggunakan etidium bromide (EtBr), karena EtBr dapat menyala dibawah UV (Brody & Kern 2004).

Hasil amplifikasi DNA menghasilkan pita positif dengan ukuran 688 bp menggunakan primer cps L, 621 bp primer cps J, dan 272 bp primer cps G yang berwarna putih dan tebal, hal ini menunjukkan semua isolat merupakan bakteri *S. agalactiae*.

Faktor yang mempengaruhi hasil elektroforesis salah satunya yaitu volume sampel hasil amplifikasi dan volume DNA marker. Kendala dalam penggunaan DNA marker yang ditemui dalam elektroforesis adalah separasi fragmen yang kurang baik, fragmen yang tipis atau kurang tegas dan bentuk fragmen yang tidak lurus, sehingga menyulitkan pembacaan hasil elektroforesis

Proses *freeze-drying* bakteri *S. agalactiae* merupakan proses perpindahan air secara sublimasi dari suspensi mikroba dalam medium skim milk, chitosan dan media kultur BHIB yang dibekukan dalam keadaan vakum. Proses tersebut sangat berpengaruh terhadap kestabilan sel mikroba, biasanya untuk menghilangkan atau mengurangi pengaruh tersebut digunakan medium tertentu yang bergantung kepada jenis mikroba yang digunakan.

*S. agalactiae* yang di inkubasi pada suhu 28°C selama 48 jam dalam media enkapsulasi menyatakan hasil yang berbeda, disajikan dalam Tabel 1. Jumlah angka lempeng total sediaan kering beku *S. agalactiae* masing-masing sebanyak 3,2x10<sup>12</sup> CFU/ml pada media chitosan, 8x10<sup>12</sup>CFU/ml pada media skim milk, dan TBUD pada media BHIB.

Pada setiap media enkapsulasi menghasilkan viabilitas yang berbeda, viabilitas terbaik adalah media kultur BHIB dengan jumlah koloni TBUD. Hal ini karena dipengaruhi oleh komposisi media yang digunakan. Banyaknya nutrisi yang tersedia pada media kultur BHIB dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri itu sendiri. Pada media *chitosan*

dihasilkan viabilitas yang jauh lebih sedikit dibandingkan dengan skim milk karena *chitosan* memiliki komponen polimer yang susah untuk di pecah sehingga mengakibatkan pertumbuhan bakteri menjadi lebih lambat.

Penambahan susu skim sebagai salah satu penyedia sumber energi berupa laktosa bagi bakteri, juga berperan dalam meningkatkan kandungan protein. Dalam Skim milk terkandung protein utama yaitu kasein. Adanya peningkatan kandungan protein akan semakin mendukung pembentukan sel dan perkembangbiakan *S. agalactiae* sehingga jumlahnya lebih cepat meningkat. *S. agalactiae* akan memanfaatkan sumber nitrogen dan karbon yang terdapat pada skim milk untuk hidup dan berkembang biak (memperbanyak diri). Semakin banyak jumlah mikrobia yang terdapat didalam media maka akan semakin tinggi kandungan proteinnya karena sebagian besar komponen penyusun mikrobia/ bakteri adalah protein.

Berdasarkan penelitian Sugiani *et al.*, (2018) dihasilkan nilai persentase sintasan relative (RPS) pada ikan nila (45,83%) dan gurami (31,67%) masih rendah. Hal ini sesuai dengan pernyataan Kementerian Kelautan dan Perikanan bahwa persyaratan nilai RPS untuk produk vaksin ikan yang dapat dikatakan baik dan dapat diedarkan ke pembudidaya adalah yang memiliki RPS > 50%. Capaian nilai RPS tersebut masih dapat ditingkatkan lagi dengan cara pembuatan produk vaksin menggunakan teknologi kering beku dengan memberikan tambahan perlakuan enkapsulasi pada sel bakteri sebelum dilakukan proses pengeringan untuk melindungi sel bakteri dan untuk meningkatkan tingkat kelarutan produk.

Berdasarkan Tabel 2. Berat bakteri *S. agalactiae* sesudah proses kering beku (*Freeze dry*) didapatkan hasil berat ke tiga media enkapsulasi *chitosan* 0,86 gr, skim milk 0,55 gr, dan BHIB 0,19 gr. Perbedaan berat ini disebabkan oleh adanya perbedaan karakteristik pada jenis media yang ditambahkan, serta perbedaan berat ini disebabkan oleh hilangnya kadar air dari bakteri yang telah melalui perlakuan kering beku. Selain itu, penambahan susu skim dan *chitosan* juga dapat meningkatkan kekentalan produk yang dihasilkan. Sehingga dihasilkan berat kering yang jauh lebih tinggi dari media kultur BHIB.

Bakteri *S. agalactiae* dengan penambahan *chitosan*, skim milk, dan media kultur dapat dikeringbekukan hal ini menunjukkan bahwa media enkapsulasi tersebut merupakan bahan yang memiliki daya rehidrasi yang baik. *Chitosan* merupakan biopolimer yang tersusun dari unit N-asetil-D-glukosamin dan  $\beta$  (1,4)- ikatan glikosidik (Luo & Wang 2013; Azevedo 2013; Hosseinnejad & Jafari, 2016). *Chitosan* juga berfungsi sebagai pelapis (*coating*) bahan yang akan diawetkan, selain itu *chitosan* memiliki gugus aktif yang dapat berikatan dengan mikroba dan dapat berfungsi sebagai adjuvant yang perlu diobservasi lebih lanjut. Selain itu, kitosan memiliki karakteristik unggulan yaitu adanya gugus amino bermuatan positif yang mampu menciptakan biopolimer kationik sehingga dapat larut dalam air dan memiliki aktivitas mukoadhesif serta adsorpsi yang tinggi (Hamed *et al.*, 2016; Fathi *et al.*, 2014; Azevedo, 2013). Penambahan media enkapsulasi berupa skim milk, *chitosan* maupun BHIB dinilai dapat dilakukan pada proses kering beku karena memiliki senyawa yang dapat melindungi sel atau jaringan dari kerusakan akibat pembentukan kristal es selama pembekuan dan proses *thawing*.

Skim milk memiliki potensi untuk dijadikan sebagai media enkapsulasi pada proses pembuatan sediaan vaksin *S. agalactiae* karena skim milk memiliki struktur berpori dalam produk kering yang dikeringkan dan mengandung protein yang menyediakan lapisan pelindung untuk sel (Abadias *et al.*, 2001). Saat ditamapkannya skim milk agent gugus alkohol pada peptidoglikan sel bakteri akan berikatan dengan ion karboksilat (COOH) dari protein membentuk ester. Karena gugus alkohol beresonansi stabil maka akan kehilangan protonnya (atom H), menyebabkan atom H berikatan dengan gugus hidroksil (OH) dari

karboksilat protein membentuk air (H<sub>2</sub>O). Skim milk juga dinilai cukup stabil dalam penyimpanan karena mampu mengurangi pertumbuhan mikroba dan memperlambat reaksi enzimatik (Oikonomopoulou *et al.*, 2013; Ananta *et al.*, 2005). Berdasarkan kemampuannya menembus membran sel skim milk tergolong pada Cryoprotectan ekstraseluler yang mampu menstabilkan membran fosfolipid bilayer ketika sel terdehidrasi di suhu rendah (Martin-Dejardin *et al.*, 2013).

## KESIMPULAN

Ketiga media yang diujikan memiliki potensi sebagai media enkapsulasi dalam pembuatan vaksin *S. agalactiae*. Angka lempeng total bakteri pada medium skim milk dan chitosan berturut-turut sebesar  $8 \times 10^{12}$  CFU/ml dan  $3,2 \times 10^{12}$  CFU/ml, sementara pada medium BHIB jumlah koloni melampaui batas standar perhitungan.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini telah terlaksana dengan sumber dana dari BPPBAT, Kementerian Kelautan dan Perikanan dengan judul “Pengaruh Proses *Freeze-Drying* Terhadap Viabilitas *Streptococcus agalactiae* pada Media Chitosan, Skim Milk, dan Media Kultur BHIB”. Penulis mengucapkan terima kasih atas kerja sama dalam pelaksanaan kegiatan penelitian kepada Ibu Dr. Nunak Nafiqoh, S.Pi, M.Sci dan Ibu Dr. Tri Handayani Kurniati, M.Si.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abadias M, Benabarre A, Teixidó N, Usall J, Vinas I. 2001. Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *International journal of food microbiology*. 65(3): 173-182.
- Al-Harbi AH. 2016. Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). *Aquaculture*. 464: 515-520.
- Amal MNA, Zamri-Saad M. 2011. Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*): a review. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*. 34(2): 195-206.
- Ananta E, Volkert M, Knorr D. 2005. Cellular injuries and storage stability of spraydried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal*. 15(4): 399–409.
- Anshary H, Kurniawan RA, Sriwulan S, Ramli R, Baxa DV. 2014. Isolation and molecular identification of the etiological agents of streptococcosis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in net cages in Lake Sentani, Papua, Indonesia. *SpringerPlus*. 3(1): 1-11.
- Azevedo MA. 2013. Development of nanostructures for encapsulation of vitamins. Universidade do Minho.
- Brody JR, Kern SE. 2004. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques*. 36(2): 214-216.
- Chavez BE, Ledebor AM. 2007. Drying of probiotics: optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Journal Drying Technology*. 25(7-8): 1193-1201.
- [DJPB] Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya. 2018. Data teknis Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya. Kementerian Kelautan dan Perikanan (unpublished).
- Fitzsimmons KM. 2018. Global Developments and Market Trends in Tilapia for 2018. *In: Asian Aquac Conf.* 2018, Bangkok. Thailand.



- Fariq AMJ. 2018. Pelatihan Penanganan Streptococcosis pada Ikan Nila Menggunakan Bahan Alami. *Prosiding Konferensi Nasional Pengabdian Kepada Masyarakat dan Corporate Social Responsibility (PKM-CSR)*. 1: 645-651.
- Fathi M, Martín Á, McClements DJ. 2014. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*. 39: 18–39.
- Hamed I, Özogul F, Regenstein JM. 2016. Industrial applications of crustacean byproducts (chitin, chitosan, and chito oligosaccharides): A review. *Trends in Food Science & Technology*. 48: 40–50.
- Hosseinnejad SF, Rezaei M, Zandi M, Farahmandghavi F. 2016. Development of bioactive fish gelatin/chitosan nanoparticles composite films with antimicrobial properties. *Food Chemistry*. 194: 1266–1274.
- Kannika K, Pisuttharachai D, Srisapoom P, Wongtavatchai J, Kondo H, Hirono I, Areechon N. 2017. Molecular serotyping, virulence gene profiling and pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia farms in Thailand by multiplex PCR. *Journal of applied microbiology*. 122(6): 1497-1507.
- Li YW, Liu L, Huang PR, Fang W, Luo ZP, Peng HL, Li AX. 2014. Chronic streptococcosis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), caused by *S. streptococcus agalactiae*. *Journal of Fish Diseases*. 37(8): 757-763.
- Luo Y, Wang Q. 2013. Recent advances of chitosan and its derivatives for novel applications in food science. *Journal of Food Processing & Beverages*. 1(1): 1-13
- Martin-Dejardin F, Ebel B, Lemetis G, Minh HNT, Gervais P, Cachon R, Chambin O. 2013. A way to follow the viability of encapsulated *Bifidobacterium bifidum* subjected to a freeze-drying process in order to target the colon: Interest of flow cytometry. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 49(2): 166-174.
- Mishra A, Nam GH, Gim JA, Lee HE, Jo A, Kim HS. 2018. Current challenges of *Streptococcus* infection and effective molecular, cellular, and environmental control methods in aquaculture. *Molecules and cells*. 41(6): 495.
- Oikonomopoulou VP, Krokida MK. 2013. Novel Aspects of Formation of Food Structure during Drying. *Drying Technology*. 31(9): 990–1007.
- Pasnik DJ, Evans JJ, Klesius PH. 2009. Fecal strings associated with *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Science Journal*. 6-8.
- Pridgeon JW, Yildirim-Aksoy M, Klesius PH, Srivastava KK, Reddy PG. 2012. Attenuation of a virulent *Aeromonas hydrophila* with novobiocin and pathogenic characterization of the novobiocin-resistant strain. *Journal of Applied Microbiology*. 113: 1319-1328.
- Suhermanto A, Sukenda S, Zairin Jr M, Lusiastuti AM, Nuryati S. 2019. Toksisitas sel utuh dan extracellular product (ECP) *Streptococcus agalactiae*  $\beta$ -hemolitik dan non-hemolitik pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Riset Akuakultur*. 13(4): 317-328.
- Sugiani D, Tauhid T, Purwaningsih U, Lusiastuti AM. 2018. Vaksin kering beku sel utuh bakteri *aeromonas hydrophila* untuk pencegahan penyakit motile aeromonads septicemia pada ikan lele, nila, dan gurami. *Jurnal Riset Akuakultur*. 13(2): 159-167.
- Tavares GC, de Alcântara Costa FA, Santos RRD, Barony GM, Leal CAG, Figueiredo HCP. 2016. Nonlethal sampling methods for diagnosis of *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*. 454: 237-242.