

## **IMUNITAS MATERNAL TERHADAP *Aeromonas hydrophila*: PENGARUHNYA TERHADAP FEKUNDITAS DAN DAYA TETAS IKAN PATIN SIAM (*Pangasionodon hypophthalmus*)**

**Wartono Hadie<sup>\*)</sup>, Angela Mariana Lusiastuti<sup>\*\*)</sup>, Sularto<sup>\*\*\*)</sup>, dan Evi Tahapari<sup>\*\*\*)</sup>**

<sup>\*)</sup> Pusat Riset Perikanan Budidaya  
Jl. Ragunan 20, Pasar Minggu, Jakarta Selatan 12540  
E-mail: [tono\\_hadi@yahoo.com](mailto:tono_hadi@yahoo.com)

<sup>\*\*)</sup> Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar  
Jl. Raya Sempur No.1, Bogor 16154

<sup>\*\*\*)</sup> Loka Riset Pemuliaan dan Teknologi Budidaya Perikanan Air Tawar  
Jl. Raya Sukamandi No. 2, Subang 41256

*(Naskah diterima: 21 Januari 2010; Disetujui publikasi: 12 Agustus 2010)*

### **ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemakaian vaksin *Aeromonas hydrophila* terhadap fekunditas dan daya tetas ikan patin siam, *Pangasionodon hypophthalmus*. Perlakuan yang diberikan ialah vaksin *Aeromonas (hydrovac*<sup>®</sup>) dengan dosis 0,4 mL/kg bobot induk. Pada perlakuan menggunakan adjuvan dengan perbandingan 1:1 antara vaksin dan adjuvan. Injeksi dilakukan secara intra peritoneal, masing-masing pada tiga induk betina dengan adjuvan dan tiga induk betina tanpa adjuvan. Injeksi dilakukan pada tingkat kematangan gonad kedua TKG II. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada serum induk dan ekstrak telur terdeteksi secara positif adanya antibodi, baik pada perlakuan adjuvan (VA) maupun tanpa adjuvan (VNA). Vaksinasi dapat meningkatkan fekunditas hingga 31% dan meningkatkan daya tetas hingga 13%.

**KATA KUNCI:** vaksin Hydrovac, adjuvan, *Pangasionodon hypophthalmus*

**ABSTRACT:** *Maternal immunity of Aeromonas hydrophila vaccine: effect to the fecundity and hatching rate of Pangasius hypophthalmus.*  
**By: Wartono Hadie, Angela Mariana Lusiastuti, Sularto, and Evi Tahapari**

*The aims of this research are to determine the influence of Aeromonas hydrophila vaccines against fecundity and hatchability Pangasionodon hypophthalmus Siamese catfish. Treatment of Aeromonas vaccine is given (hydrovac<sup>®</sup>) with a dose of 0.4 mL per kg of body weight. The adjuvant which use for treatment with a ratio of 1:1 between vaccines and adjuvants. Intra-peritoneal injection is done, each on three female parent with adjuvant and three female parent without adjuvant. Injection is performed at the level of gonad maturity II. Results showed that the serum of carriers and egg extracts is positively detected the existence of antibodies, both in adjuvant treatment (VA) or without adjuvant (VNA). Vaccination could increase fecundity up to 31% and increases up to 13% hatchability.*

**KEYWORDS:** *Hydrovac vaccines, adjuvants, Pangasionodon hypophthalmus*

## PENDAHULUAN

Kerugian yang ditimbulkan oleh jenis bakteri *Aeromonas* di unit pembenihan rakyat (UPR) berupa menurunnya produksi benih, karena tingginya tingkat kematian benih pada tingkat larva sampai umur 14 hari. Kematian larva di UPR umumnya terjadi pada minggu pertama (umur 4 hari) dan secara umum terjadi kematian terbesar hingga umur 14 hari. Kematian benih umumnya disebabkan oleh penyakit, yang ditimbulkan akibat tidak menerapkan prinsip biosekuriti. Pada sistem pemeliharaan di UPR yang sangat sederhana, bahkan kematian akibat penyakit bisa mencapai 95%-100%.

Kerugian ini dapat dicegah jika UPR dapat menerapkan biosekuriti atau paling tidak menggunakan desinfeksi pada media pemeliharaan larva. Akan sangat baik jika di UPR telah menerapkan perlakuan vaksinasi kepada induk untuk memperoleh kekebalan bawaan (*maternal immunity*). Diharapkan dengan dosis vaksin yang tepat dan penggunaan ajuvan akan menghasilkan kekebalan yang diturunkan (*maternal immunity*) yang baik pada benih, sehingga menghasilkan sintasan yang tinggi.

Pada hewan vertebrata tingkat tinggi, kekebalan maternal berperan dalam meningkatkan daya tahan tubuh terhadap penyakit sebelum imunitas berkembang biak (Kawahara *et al.*, 1993). Menurut Tauhid & Bastiawan (1995), kekebalan induk ikan betina akan diwariskan kepada anaknya walaupun dalam jumlah yang sedikit. Kekebalan induk (*maternal immunity*) diturunkan kepada generasi berikutnya sebagai kekebalan temporer dan akan meluruh dengan cepat seiring dengan pertambahan umur larva ikan, dan perkembangan sistem imun.

Vaksinasi merupakan salah satu cara untuk merangsang induk ikan patin membuat kekebalan spesifik. Kekebalan spesifik yang timbul akan diteruskan melalui oosit yang dihasilkan selama rentang waktu tertentu. Selanjutnya zigot yang telah memiliki kekebalan warisan dari induk betina akan memiliki ketahanan relatif terhadap bakteri dari jenis vaksin yang diberikan.

Keberhasilan vaksin yang digunakan akan dipengaruhi pula oleh ajuvan yang digunakan, baik terhadap *level* kekebalan yang dihasilkan maupun pengaruh langsung dari ajuvan tersebut terhadap kondisi induk secara fisik.

Jenis ajuvan dan dosis vaksin akan mempengaruhi level kekebalan yang dihasilkan oleh induk ikan maupun keturunannya. Menurut Baratawidjaya (2006), ajuvan harus mempunyai sifat dapat membuat depot antigen dan melepas antigen secara perlahan sehingga memperpanjang paparan antigen dengan sistem imun, mempertahankan integritas antigen, memacu respons imun dengan afinitas tinggi dan mempunyai kapasitas untuk mengintervensi sistem imun selektif yaitu sel B dan sel T.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek penggunaan vaksin *A. hydrophila* terhadap fekunditas dan daya tetas ikan patin.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Loka Riset Pemuliaan dan Teknologi Budidaya Perikanan Air Tawar (LRPTBPAT), Sukamandi, Laboratorium Kesehatan Ikan Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar (BRPBAT) Bogor, dan UPR di Sindang Barang Loji RT. 03 RW. 08 Kelurahan Loji Kecamatan Bogor Barat. Pelaksanaan ujiantang terhadap larva ikan dilakukan di Laboratorium Basah LRPTBPAT, Sukamandi.

Bahan penelitian yang digunakan meliputi: ikan uji yaitu induk ikan patin, penanda (*tag*), Vaksin (*hydrovac*<sup>®</sup>) produksi Laboratorium Kesehatan Ikan Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar di Bogor, ajuvan komplit (*Freund's adjuvant complete*), pakan alami (*Artemia*), pakan buatan (*pellet*), bahan dan alat bantu (*inject spuit*, timbangan, seser, ember, dan lain-lain).

Dalam penelitian ini rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan menggunakan dua perlakuan yaitu vaksin ditambah ajuvan dan non ajuvan dengan dosis 0,4 mL/kg induk (Tauhid & Bastiawan, 1995). Aplikasi injeksi vaksin dilakukan secara intra peritoneal (IP). Injeksi vaksin dilakukan dengan menggunakan ajuvan (VA) jenis *adjuvant complete* (AC) dan tanpa menggunakan ajuvan (VNA). Prosedur kerjanya meliputi: pematangan gonad, vaksinasi pada induk betina, pemijahan, penetasan, dan pengukuran titer antibodi pada induk dan telur.

Induk yang digunakan dalam penelitian ini diseleksi tingkat kematangan gonadnya hingga TKG II, untuk selanjutnya diperlakukan dengan vaksin. Dari sejumlah induk yang dipilih, diperoleh delapan induk betina yang seragam

tingkat kematangan gonadnya. Selanjutnya dilaksanakan perlakuan vaksin dengan ajuvan, dan tanpa ajuvan, serta kontrol. Kelompok vaksin dengan ajuvan terdiri atas tiga ekor dengan nomor (5079; 5064; 5069). Kelompok vaksinasi tanpa ajuvan adalah kelompok induk dengan nomor (5107; 5112; 5067). Tiga ekor induk untuk keperluan kontrol tidak diberi nomor tanda.

Urutan kerja mencakup kegiatan pematangan gonad meliputi pemeliharaan induk hingga mencapai tingkat kematangan gonad (TKG II). Selama tahap pematangan gonad induk diberi pakan komersial khusus untuk induk dengan ransum 3% bobot badan per hari. Induk-induk yang telah diperlakukan ditempatkan dalam happa yang terpisah agar mudah pengontrolannya. Penandaan induk dengan *microchips* yang dapat dibaca dengan *tag reader* agar ikan yang diperlakukan tidak tertukar.

Vaksinasi dilakukan dengan menggunakan injeksi vaksin *Aeromonas hydrophila* (Hydrovac®) dengan dosis 0,4 mg/kg bobot badan pada induk betina. Cara aplikasi vaksin melalui intra peritoneal (IP).

Untuk mencapai tingkat kematangan akhir, induk dirawat di kolam menggunakan happa. Hingga ikan siap memijah, induk tidak diambil serum untuk pengujian titer antibodi untuk mencegah terjadinya stres pada induk. Serum untuk titer antibodi baru diambil setelah ikan ovulasi. Pada TKG IV yaitu 30 hari setelah vaksinasi, induk ikan diinduksi menggunakan GnRH dan LHRH untuk memperoleh kematangan gonad dan keseragaman telur sebelum ovulasi.

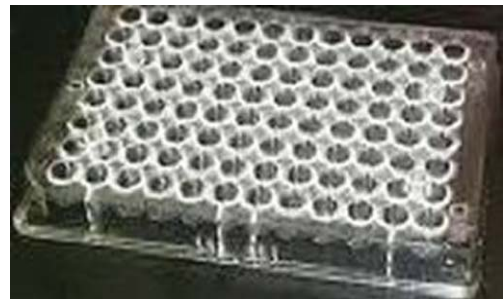
Ovulasi telur dan pengambilan sperma dilakukan dengan pemijatan (*stripping*) pada induk betina dan jantan. Telur maupun spermatozoa ditampung pada wadah yang berbeda. Selanjutnya dilakukan pembuahan dengan mencampur sel telur dengan spermatozoa. Pembuahan dilakukan secara cepat dan seksama menggunakan pengaduk bulu ayam. Setelah itu telur dicuci dengan menggunakan air bersih dan dicampur dengan larutan lumpur halus untuk menghilangkan zat penempel dari telur. Telur yang telah dibuahi siap untuk ditetaskan dalam bak penetasan.

Pengukuran titer antibodi dilakukan untuk memperoleh data penunjang terhadap vaksinasi dan diambil dari serum induk, dilakukan sebelum aplikasi dan 4 minggu

setelah aplikasi vaksin yaitu pada saat setelah pemijahan. Sampel darah dari induk diperoleh setelah ikan di-*stripping* telurnya. Pengambilan sampel untuk memperoleh serum yang cukup untuk analisis digunakan sejumlah larva dimasukkan ke dalam *microtube* dan disimpan di lemari pendingin. Pengukuran titer antibodi dilakukan di Laboratorium Kesehatan Ikan Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar, Bogor.

Pengukuran titer antibodi dilakukan pada ekstrak telur setelah ovulasi. Metode yang digunakan adalah *direct agglutination* dilakukan dengan metode Anderson (1974) yaitu *geometric mean titer* (GMT). Persiapan untuk pengukuran titer antibodi adalah sebagai berikut:

1. Pencucian telur atau larva dengan PBS 0.15 M sebanyak tiga kali;
2. Telur atau larva dilarutkan ke dalam PBS/Tween dengan perbandingan 1:4;
3. Telur atau larva digerus;
4. Sentrifugasi pada 9750 rpm selama 20 menit;
5. Supernatan dipisahkan dan disimpan di *refrigerator* dengan suhu di bawah 0°C;
6. Siapkan mikroplate 96 lubang seperti gambar berikut:



Cara pelaksanaannya:

1. Lubang 1 kosong;
2. Lubang 2-10 vertikal diisi saline 50  $\mu$ L, lubang secara horisontal dapat dipakai untuk memeriksa ulangnya;
3. Serum induk atau ekstrak telur atau ekstrak larva diisi 50  $\mu$ L pada lubang 1 dan 2;
4. Lubang dua dihomogenkan, diambil 50  $\mu$ L dipindahkan ke lubang 3 dan seterusnya sampai lubang ke-11;
5. Lubang 12 buang 50  $\mu$ L;

6. Masukkan 50 µL *A. hydrophila* dengan kepadatan 1.011 sel/mL ke dalam lubang 1 sampai lubang 12;
7. Homogenasikan campuran dalam lubang dengan menggoyangkan mikroplate secara perlahan;
8. Inkubasikan selama 30-60 menit;
9. Amati terjadinya aglutinasi;
10. Pengukuran titer antibodi dilakukan sebelum vaksinasi, pada saat ovulasi, dan pada stadia larva.

Variabel yang diamati dalam penelitian ini mencakup: fekunditas, daya tetas, titer antibodi pada induk sebelum dan 4 minggu sesudah vaksinasi, dan pada telur. Data dari variabel teknis yang dipantau dianalisis dengan menggunakan program statistik Anova, sedangkan titer antibodi diolah secara deskriptif.

## HASIL DAN BAHASAN

### Fertilisasi dan Daya Tetas

Keberhasilan pada tahap ini dari ovulasi hingga fertilisasi dan penetasan dapat dilihat pada Tabel 1.

Dari Tabel 1 terlihat adanya perbedaan fekunditas yang nyata ( $P < 0,05$ ) antara induk yang divaksin dengan ajuvan dengan induk yang tidak divaksin maupun yang divaksin tanpa ajuvan. Hingga tahap daya tetas, induk yang divaksin dengan ajuvan memberi pengaruh yang nyata terhadap kualitas telur (daya tetas). Hasil ini diduga akibat langsung

dari induksi kekebalan telur yang diberikan oleh induknya (Taukhid & Bastiawan, 1995).

Secara teoritis, manfaat dari induksi kekebalan pada induk ikan patin terhadap fekunditas, vaksinasi dengan ajuvan meningkat secara nyata dibanding vaksin tanpa ajuvan, dan kontrol. Vaksin dengan ajuvan ternyata dapat meningkatkan fekunditas sebesar 18% dibanding vaksin non ajuvan (Tabel 1). Sedangkan jika dibandingkan dengan kontrol maka, vaksin dengan ajuvan meningkatkan fekunditas sebesar 31%. Vaksin non ajuvan meningkatkan fekunditas sebesar 15% dibanding kontrol.

Secara lengkap, Tabel 2 menyajikan nilai rata-rata jumlah telur dan daya tetas dari induk ikan patin yang diperlakukan dengan vaksin dan tanpa divaksin. Daya tetasnya meningkat 11% pada penggunaan vaksin dengan ajuvan dibanding dengan vaksin non ajuvan. Sedangkan dibandingkan dengan kontrol, penggunaan vaksin dengan ajuvan daya tetasnya meningkat 13%. Daya tetas dengan menggunakan vaksin non ajuvan meningkat 3% dibanding dengan non vaksin (kontrol). Sjafei *et al.* (1992) menyatakan bahwa telur dapat mengakumulasi materi untuk digunakan sebagai cadangan makanan, termasuk antibodi yang diserap melalui peredaran darah. Kondisi yang demikian menyebabkan perlakuan vaksin dengan atau tanpa ajuvan dapat memperbaiki fekunditas dan daya tetas karena akibat terbentuknya antibodi.

Pembentukan antibodi melibatkan peningkatan sel-sel imun yaitu limfosit, monosit, dan neutrofil. Monosit dan neutrofil

Tabel 1. Keragaan telur induk ikan patin dengan perlakuan vaksin *Aeromonas hydrophila*

Table 1. Performance of fecundity of catfish *Pangasius hypophthalmus* vaccinated with *Aeromonas hydrophila*

Perlakuan ( <i>Treatment</i> )	Fekunditas ( <i>Fecundity</i> ) (g egg/kg)
Vaksin + ajuvan <i>Vaccine + adjuvant (VA)</i>	159.33 <sup>a</sup>
Vaksin non ajuvan <i>Vaccine non adjuvanted (VNA)</i>	112.00 <sup>c</sup>
Kontrol ( <i>Control</i> )	132.00 <sup>ab</sup>

Keterangan: Huruf *superscript* yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ )

Note: Different *superscript* in the same column show the significantly different ( $P < 0.05$ )

Tabel 2. Rataan jumlah telur dan daya tetas telur dari induk ikan patin yang diperoleh pada perlakuan vaksin dan kontrol

Table 2. Means of eggs and hatching rate of broodstock resulted from vaccine treatment and control

Perlakuan <i>Treatment</i>	Jumlah telur <i>Number of egg</i> ( <i>pcs/3 kg broodstock</i> )	Daya tetas <i>Hatching rate</i> (%)
Vaksin dengan ajuvan <i>Vaccine with adjuvant (VA)</i>	573,588	98.53
Vaksin non ajuvan <i>Vaccine non adjuvanted (VNA)</i>	481,212	87.94
Kontrol ( <i>Control</i> )	462,492	85.68

terutama berperan di dalam pengendalian antigen asing yang masuk di dalam tubuh. Monosit atau disebut juga makrofag lebih banyak diam di jaringan, sedangkan neutrofil menjadi sel ronda yang bergerak aktif mencari antigen asing. Hal ini menyebabkan kondisi yang lebih baik sehingga membantu memperbaiki fekunditas dan daya tetas.

#### Titer Antibodi

Data titer antibodi diambil sebagai data penunjang untuk mengetahui apakah vaksin mampu membentuk antibodi terhadap *Aeromonas hydrophila*. Titer antibodi yang dapat mengaglutinasi *Aeromonas hydrophila* dapat terdeteksi baik pada serum induk, telur, maupun larva ikan patin umur satu minggu

sampai 4 minggu yang induknya diinjeksi vaksin secara intra peritoneal baik dengan ajuvan maupun tanpa ajuvan. Titer antibodi induk, larva pada tingkat telur terlihat pada Tabel 3 dan 4.

Tabel 3 menunjukkan kondisi awal induk sebelum divaksinasi, semua rata-rata titer antibodinya negatif, kecuali nomer 5064 positif sampai pengenceran 1:16. Hal ini menunjukkan bahwa patin nomor 5064 sebelumnya pernah terpapar oleh *Aeromonas hydrophila*. Empat minggu setelah vaksinasi baru terlihat titer antibodi masing-masing induk patin mulai muncul.

Kadar antibodi serum induk setelah divaksin dengan vaksin *Hydrovac*<sup>®</sup> menggunakan ajuvan ternyata hasilnya secara rata-

Tabel 3. Titer antibodi induk ikan patin sebelum dan sesudah vaksinasi

Table 3. Antibody titre of broodstock before and after vaccination

Kode ( <i>Code</i> )	Pengenceran ( <i>Thinning</i> )								
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Sebelum vaksinasi ( <i>Before vaccine</i> ) / Kondisi awal ( <i>Initial condition</i> )									
VA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VNA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kontrol ( <i>Control</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4 Minggu sesudah vaksinasi ( <i>After 4 weeks vaccination</i> )									
VA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Keterangan (*Note*):

VA : Vaksin dengan ajuvan (*Vaccine with adjuvant*)

VNA: Vaksin non ajuvan (*Vaccine non adjuvanted*)

Tabel 4. Titer antibodi telur dari induk ikan patin yang dilakukan vaksinasi  
 Table 4. Antibody titre of egg broodstock before and after vaccination

Keterangan (Note):

VA : Vaksin dengan ajuvan (Vaccine with adjuvant)

VNA: Vaksin non ajuvan (Vaccine non adjuvanted)

rata lebih tinggi (pengenceran 1:128) dibandingkan vaksin yang menggunakan ajuvan (pengenceran 1:16). Hal ini menunjukkan bahwa vaksin dengan ajuvan dapat me-release antigen sedikit demi sedikit dan memberi kesempatan sel-sel imun untuk membentuk antibodi. Hal ini sesuai dengan pendapat Baratawidjaya (2006), bahwa ajuvan harus mempunyai sifat dapat membuat depot antigen dan melepas antigen secara perlahan sehingga memperpanjang paparan antigen dengan sistem imun, mempertahankan integritas antigen, memacu respons imun dengan afinitas tinggi dan mempunyai kapasitas untuk mengintervensi sistem imun selektif yaitu sel B dan sel T.

Ajuvan adalah substansi yang apabila ditambahkan di dalam vaksin akan dapat meningkatkan respons imun dan meningkatkan efektivitas vaksin serta dapat melipatgandakan produksi sel-sel imun yang terutama berperan dalam sistem kekebalan non spesifik. Respons imun humoral, khususnya sel T dapat dirangsang dengan pemberian antigen yang diberi ajuvan. Sebagian besar ajuvan merupakan produk dari mikroba. *Complete Freund's Adjuvant* berisi antigen *Mycobacterium* inaktif yang dapat membantu antigen utama, dalam hal ini vaksin untuk dapat meningkatkan produksi antibodi. Menurut Ellis (1988), ajuvan adalah bahan kimia yang memperlambat proses penghancuran antigen dalam tubuh serta merangsang pembentukan kekebalan, sehingga akan terjadi kontak yang lebih lama dengan makrofag dan limfosit. Hal ini akan meningkatkan kualitas respons dari kekebalan spesifik (antibodi) yang dihasilkan.

Kadar titer antibodi pada telur dari induk yang diinjeksi dengan ajuvan menunjukkan

titer yang tinggi, masih dapat dideteksi hingga pengenceran 1:128. Sedangkan pada induk yang diinjeksi tanpa ajuvan, hasil titer antibodinya pada telur lebih rendah dan terdeteksi hingga pengenceran 1:32. Serum induk dengan ajuvan ternyata memicu meningkatnya antibodi dalam telur. Serum induk yang mengandung kadar antibodi yang tinggi, pada telurnya juga diperoleh kadar antibodi yang hampir sama konsentrasinya dengan induk. Semakin besar kadar antibodi serum induk cenderung menyebabkan semakin besar kadar antibodi induk yang diturunkan ke dalam telur dan larva. Dengan demikian vaksinasi yang diberikan kepada induknya secara positif memberikan bahan kekebalan pada larva.

**KESIMPULAN**  
**VNA**

Vaksinasi *Aeromonas hydrophila* pada induk betina ikan patin dapat dilakukan secara intra peritoneal dengan dosis 0,4 mL/kg bobot induk, menggunakan ajuvan komplit pada tingkat kematangan gonad (TKG II). Penerapan vaksinasi pada induk ikan patin dengan menggunakan ajuvan dapat meningkatkan fekunditas hingga 31% dan meningkatkan daya tetas hingga 13%.

**DAFTAR ACUAN**

Anderson, D.P. 1974. Diseases of Fishes. Book 4: Fish immunology, Ed, by S.F. Snieszko and H.R. Axelrod, T.F.H. Pub., Neptune City, 23 pp.  
 Baratawidjaya, K.G. 2006. Imunologi Dasar. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Penerbit Gaya Baru, Jakarta, 88 pp.  
 Ellis, A.E. 1988. General principles of fish vaccination. Academic Press, London, p. 1-19.

- Kawahara, E., Inarimori, T., Aurano, A.A.K., Nomura, S., & Takahashi, Y. 1993. Transfer of maternal immunity of white spotted char, *Salvalinus leucomaenis* against furunculosis. *Nipon Suisan gakkaiishi*, 59(3): 567.
- Sjafei, D.S., Rahardjo, M.F., Affandi, R., Brojo, M., & Sulistiono. 1992. Fisiologi Ikan II. Reproduksi Ikan. Laboratorium Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, 213 hlm.
- Taukhid & Bastiawan, D. 1995. Pengaruh vaksinasi maternal anti-*Aeromonas hydrophila* terhadap benih ikan lele dumbo (*Clarias* sp.) yang dihasilkannya. *J. Pen. Perik. Indonesia*, p. 48-57.