

Keefektifan Vaksin *Streptococcus Agalactiae* untuk Mencegah Streptococcosis pada Ikan Nila
The Effectiveness of a *Streptococcus agalactiae* Vaccine for the Prevention of Streptococcosis on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Imam Taufik, Mulyana, Maria Angela Lusiastuti
E-mail: mulyanamarhalymsi@gmail.com

ABSTRACT

Streptococcosis is important disease on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) caused by *Streptococcus agalactiae* bacteria. The aims of this study were to determine effectiveness of a *Streptococcus agalactiae* vaccine through immersion and intraperitoneal injection for the prevention of a Streptococcosis on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Vaccination trial was conducted through immersion and intraperitoneal injection into fish with concentration 10^7 cells/ml, 10^6 cells/ml, 10^4 cells/ml, and control. Tipalia's control was injected with *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB). Fish were challenged by intraperitoneal injection with 10^3 cfu/ml of *Streptococcus agalactiae* bacteria. The results of research showed that was not significance different between treatments to survival rate of fishes. This caused by concentration of bacteria's challenge were not caused major LD₅₀ effect. Titer antibody values were showed has immunity responses that signed with blood agglutination. The clinical symptoms that observed started 72 hours after challenge's with signed by fade of body's color and swimming in the base of aquarium. The mortality of fishes started 96 hours after challenge's. The conclusion is *Streptococcus agalactiae* vaccine through immersion and intraperitoneal injection not effective enough to prevent Nile Tilapia LARASATI against Streptococcosis.

Keywords : *Streptococcus agalactiae*, vaccine, immersion, intraperitoneal injection

ABSTRAK

Streptococcosis adalah penyakit penting pada ikan Nila yang disebabkan oleh *Streptococcus agalactiae*. Tujuan dari penelitian ini ialah untuk menentukan keefektifanvaksin *Streptococcus agalactiae* melalui perendaman dan penyuntikan intraperitoneal untuk pencegahan Streptococcosis pada ikan Nila. Percobaan vaksinasi telah dilakukan melalui perendaman dan penyuntikan secara intraperitoneal ke dalam ikan dengan konsentrasi 10^7 cells/mL, 10^6 cells/mL, 10^4 cells/mL, dan kontrol. Ikan kontrol disuntik dengan BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*). Ikan uji ditantang melalui suntikan intraperitoneal pada dosis 10^3 cfu/mL*Streptococcus agalactiae*. Hasil penelitian tidak memperlihatkan perbedaan nyata diantara perlakuan terhadap kelangsungan hidup ikan. Ini disebabkan oleh karena konsentrasi ujiantang tidak disebabkan oleh pengaruh LD₅₀ utama. Nilai titer antibodi memperlihatkan respon imun yang ditandai dengan penggumpalan darah. Gejala klinis yang teramati dimulai 72 jam pasca ujiantang ditandai dengan perubahan warna tubuh dan berenang di dasar akuarium. Kematian ikan dimulai 96 jam setelah ujiantang. Vaksin *Streptococcus agalactiae* melalui perendaman suntikan intraperitoneal injection belum cukup efektif untuk mencegah ikan Nila LARASATI terhadap Streptococcosis.

Kata kunci : *Streptococcus agalactiae*, vaksin, imersi, penyuntikan intraperitoneal

Taufik, Mulyana, Maria. 2016. Efektivitas Vaksin *Streptococcus agalactiae* melalui Perendaman dan Injeksi Intraperitoneal untuk Pencegahan Streptococcosis pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Mina Sains* 2(2): 80-86.

PENDAHULUAN

Penyakit yang paling signifikan menyebabkan kerugian dalam budidaya ikan nila adalah Streptococcosis, yang disebabkan bakteri jenis *Streptococcus*. Bakteri ini bersifat patogenik, menyebar secara cepat pada padat penebaran tinggi dan dapat mengakibatkan kematian pada benih dan ikan dewasa. Ikan yang terserang Streptococcosis menunjukkan gejala seperti gerakan renang tidak menentu (*erratic*), nafsu makan kurang (*anorexia*), tubuh membentuk huruf “C”, serta menyebabkan kematian (Pasnik *et al.* 2005).

Mengingat ikan nila potensial untuk dibudidayakan, maka upaya pencegahan Streptococcosis secara dini akan mendukung kegiatan budidaya karena melalui upaya pencegahan ini, diperkirakan ikan akan mempunyai ketahanan yang tinggi terhadap serangan bakteri tersebut. Salah satu cara pencegahan yang terbaik adalah dengan cara vaksinasi (Ellis 1988). Vaksinasi dapat meningkatkan kekebalan pada tubuh ikan terhadap serangan penyakit tertentu selama beberapa waktu sehingga angka kematian dapat ditekan serendah mungkin.

Pada penelitian ini akan dilakukan pengukuran efektivitas vaksin *Streptococcus agalactiae* pada ikan nila melalui cara aplikasi perendaman dan injeksi intraperitoneal dengan melihat tingkat kelangsungan hidupnya setelah diberi ujiantang dengan bakteri *Streptococcus agalactiae*.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas vaksin *Streptococcus agalactiae* melalui perendaman dan injeksi intraperitoneal dengan melihat tingkat kelangsungan hidupnya setelah diberi ujiantang dengan bakteri *Streptococcus agalactiae*.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada tanggal 03 Agustus 2010 sampai dengan 07 September 2010. Bertempat di Laboratorium Patologi dan Laboratorium Basah Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar (BRPBAT), yang beralamat di Jl. Sempur No. 1 Bogor, telp. (0251) 31320, email : brpbat@telkom.net.

Alat dan Bahan Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah bak tandon, bak fiber, akuarium ukuran 60x40x45 cm³, blower, selang aerasi, batu aerasi, water heater 350 watt, pompa air, serok kain kasa, selang plastik, autoclave, refrigerator, inkubator, hot plates, stir plates, timbangan elektronik, tabung erlenmeyer, gelas ukur, alat suntik (*sprit*), magnetic stirrer, lemari es, sentrifuga, tabung kecil (*mikro tube*), mikropipet, mikropipet, pipet Sahli, tabung Hb-meter, pipet skala 101, Haemocytometer, pipet skala 11, thermometer, dan pH paper.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah ikan nila LARASATI yang bebas dari *Streptococcus* atau SPF (*Specific Pathogen Free*), memiliki bobot berkisar 15 – 20 g/ekor dengan jumlah sebanyak 30 ekor tiap perlakuan. Isolat bakteri *Streptococcus agalactiae* β -hemolitik (N14G) koleksi Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar Bogor. Media Brain Heart Infusion Agar (BHIA) dan Brain Heart Infusion Broth (BHIB). Serum darah, larutan salin steril, HCl 0,1 N, Aquades, larutan hayem, dan larutan turk.

Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan pola faktorial tersarang. Faktor pertama adalah cara pemberian vaksin melalui perendaman dan injeksi intraperitoneal. Faktor kedua adalah dosis vaksin (tersarang dalam cara) dengan konsentrasi 10⁷ sel/ml, 10⁶ sel/ml, 10⁴ sel/ml, dan kontrol. Setiap perlakuan dilakukan 3 kali ulangan.

Aklimatisasi ikan uji

Ikan uji yang digunakan adalah ukuran 15 – 20 gram. Ikan uji telah didiagnosa secara klinis negatif Streptococcosis dan diaklimatisasi dalam bak fiber kapasitas 200 L. Ikan uji tersebut diaklimatisasi selama satu minggu. Ikan uji dipelihara dengan pemberian pakan secara *ad libitum* dengan frekuensi pemberian pakan tiga kali sehari pada pukul 08.00, 12.00, dan 16.00 WIB. Untuk menjaga kualitas air dalam bak fiber, dilakukan penyiponan dan pergantian air sesuai kebutuhan sebanyak 25-50% dari total air.

Pembuatan Vaksin

Vaksin dibuat dengan cara mengambil 1 ose isolat *Streptococcus agalactiae* di *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA) dan ditumbuhkan di dalam 10 ml *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB), kemudian diinkubasi selama 24 jam sehingga diperoleh konsentrasi *Streptococcus agalactiae* 10^8 sel/ml. Hasil biakan tersebut dipindahkan ke dalam 90 ml *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) sehingga volume menjadi 100 ml lalu diinkubasi selama 24 jam. Selanjutnya larutan diinaktivasi dengan cara menambahkan formalin 1 % dan di vortex selama 1 jam. Kemudian ditumbuhkan kembali dalam *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA) dan diinkubasi selama 72 jam untuk mengetahui inaktifasinya (uji *viabilitas*). Jika bakteri *Streptococcus agalactiae* tidak ada yang tumbuh (inaktif) maka vaksin digunakan untuk perlakuan.

Vaksinasi

Setiap perlakuan diberikan pada 30 ekor ikan nila dengan ulangan 3 kali. Ikan nila uji direndam pada larutan vaksin selama 30 menit. Untuk ikan nila kontrol direndam dalam air tanpa vaksin. Aerasi tetap diberikan selama perendaman. Untuk aplikasi injeksi intraperitoneal dilakukan terhadap 30 ekor ikan nila uji dengan ulangan 3 kali menggunakan dosis 0,1 ml per ikan. Untuk ikan nila kontrol dilakukan injeksi dengan *Brain Heart Infusion Agar* (BHIB).

Uji Tantang Ikan Nila Uji

Setelah dua minggu pasca vaksinasi, ikan nila uji ditempatkan pada 24 akuarium, masing-masing sebanyak 30 ekor sesuai dengan perlakuan yang diberikan. Ikan nila uji pada masing-masing perlakuan diuji tantang dengan menyuntikkan secara injeksi intraperitoneal bakteri *Streptococcus agalactiae* dengan kepadatan 10^3 cfu/ml sebanyak 0,1 ml.

Parameter Pengamatan

Kelangsungan Hidup

Kelangsungan hidup (*survival rate*) diamati setiap hari pada saat masa induksi vaksin dan uji tantang. Kelangsungan hidup dapat dihitung dengan rumus (Effendie 1997) :

$$SR = Nt/No \times 100\%$$

Dimana :

SR : Survival rate (%)

Nt : Jumlah ikan nila yang hidup pada akhir pengamatan

No : Jumlah ikan nila pada awal pengamatan

Titer Antibodi

Pengamatan terhadap titer antibodi dilakukan untuk mengetahui antibodi yang dihasilkan oleh ikan setelah diberi perlakuan vaksinasi. Pengukuran titer antibodi dilakukan berdasarkan metode Anderson (1974) yaitu aglutinasi langsung dengan menggunakan *mikroplate*. Pengukuran titer antibodi dilakukan sebelum vaksinasi, minggu pertama, minggu kedua, minggu ketiga, dan minggu keempat setelah vaksinasi.

Analisis Data

Pengaruh perlakuan terhadap kelangsungan hidup dianalisa dengan menggunakan analisis sidik ragam atau uji F. Jika terdapat perbedaan antar perlakuan diuji dengan menggunakan uji Duncan taraf 5% (Gaspersz 1991), model linier dari rancangan ini adalah sebagai berikut :

$$X_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Dimana :

X_{ij} = Nilai pengamatan pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

μ = Rata-rata pengamatan (nilai tengah)

τ_i = Pengaruh vaksinasi ke-i

ϵ_{ij} = Pengaruh galat percobaan pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Untuk data titer antibodi, parameter hematologi, gejala klinis dan kualitas air dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Survival Rate/ Kelangsungan Hidup

Tabel 1 Nilai *survival rate* (%) pada akhir proses ujiantang terhadap bakteri *Streptococcus agalactiae*

Aplikasi	Konsentrasi vaksin (sel/ml)			
	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁴	Kontrol
Injeksi	85	92	84	90
Perendaman	98	91	93	91

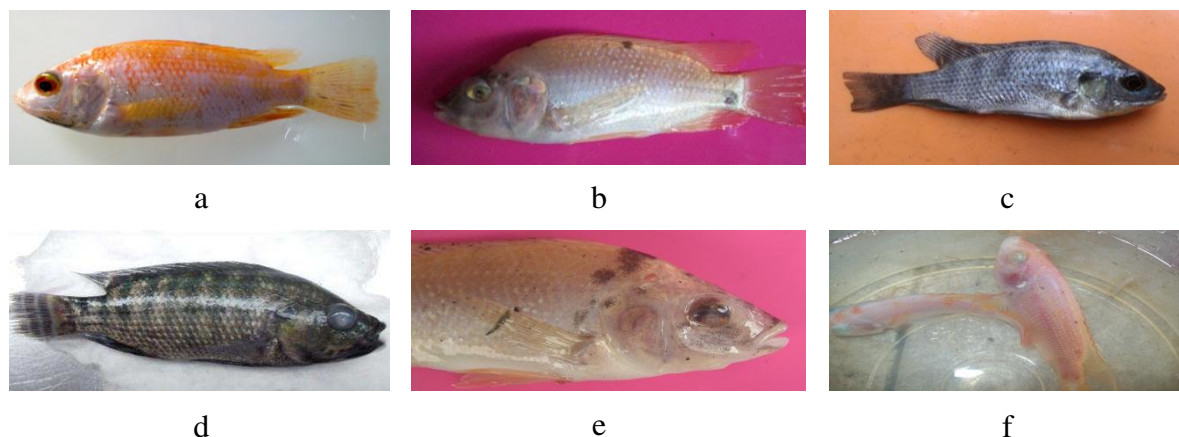
Hasil analisis ragam *survival rate* menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan nyata antar perlakuan cara pemberian vaksin dimana $F_{hitung} (= 3.19) < F_{tabel} (= 4.49)$ dan antar dosis vaksin yang diberikan juga tidak berbeda nyata dimana $F_{hitung} (= 0.74) < F_{tabel} (= 2.74)$ pada taraf 5%, sehingga ikan yang divaksinasi secara perendaman maupun secara injeksi intraperitoneal dengan ikan yang tidak divaksinasi atau kontrol tidak ada perbedaan nyata terhadap tingkat kelangsungan hidupnya. Demikian juga pada perlakuan pemberian berbagai konsentrasi vaksin yang berbeda menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata.

Titer Antibodi

Reaksi terhadap vaksinasi baru terlihat pada minggu ke-2, terutama vaksinasi melalui aplikasi injeksi intraperitoneal. Tetapi, titer antibodi melalui aplikasi injeksi intraperitoneal tidak konsisten, pada minggu ke-3 terjadi penurunan dan meningkat kembali pada minggu ke-4. Konsentrasi 10⁷ sel/mL melalui aplikasi injeksi intraperitoneal memiliki nilai titer antibodi yang fluktuatif, sedangkan vaksinasi melalui aplikasi perendaman menunjukkan nilai titer antibodi yang lebih konsisten terutama pada konsentrasi 10⁷ sel/mL dan 10⁶ sel/mL. Ikan kontrol yang divaksinasi melalui aplikasi injeksi intraperitoneal nilai titer antibodinya turun drastis setelah dilakukan ujiantang, sedangkan ikan kontrol yang divaksinasi melalui aplikasi perendaman nilai titer antibodinya justru meningkat setelah dilakukan ujiantang.

Gejala Klinis

Gejala klinis ikan nila uji ditandai dengan adanya *clear operculum*, warna tubuh memudar dan pucat, serta berenang lemah dan di dasar (Gambar 1).



Gambar 1 Gejala klinis ikan nila yang diinfeksi *S. Agalactiae*; a) nila LARASATI sehat, b) nila LARASATI sakit: warna tubuh memudar, c) nila BEST sehat, d) nila BEST sakit: warna tubuh menghitam, e) nila LARASATI *clear operculum*, f) nila LARASATI berenang lemah dan di dasar

Kualitas Air

Suhu selama penelitian memiliki kisaran antara 25°C-26°C di pagi hari dan di sore hari memiliki kisaran antara 26°C-27°C. Sedangkan nilai pH yang diukur satu minggu sekali memiliki nilai antara 6,5-7,0.

Pembahasan

Kelangsungan Hidup

Ada dua kemungkinan penyebab tidak efektifnya pemberian vaksin *Streptococcus agalactiae* pada ikan nila LARASATI: yaitu (1) berdasarkan hasil penelitian vaksin *Streptococcus agalactiae* di Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar Bogor pada tahun 2009 (Tauhid 2009; Purwaningsih

2009; dan Lusiastuti 2009) menggunakan *Streptococcus agalactiae* isolat 2 N4M yang bersifat non-hemolitik dan berkapsul tidak memberikan level protektif yang tinggi. Pada tahun 2010, diujikan isolat 3 *Streptococcus agalactiae* N14G yang bersifat β -hemolitik dan tidak berkapsul ternyata juga tidak efektif di dalam memberikan level proteksi seperti yang diharapkan yang dapat melindungi ikan dari infeksi *Streptococcus agalactiae*. Berdasarkan hasil penelitian Hardi (2010) faktor produk ekstraseluler *Streptococcus agalactiae* berpotensi sebagai *immunogenic properties*, dan kombinasi *whole cell* dari isolat 3 β -hemolitik *Streptococcus agalactiae* ternyata memberikan level proteksi yang cukup tinggi jika ditantang baik dengan β -hemolitik maupun non-hemolitik. (2) berdasarkan hasil penelitian Winarti (2010), tentang kerentanan ikan jelawat *Leptobarbus hoevenii* Blkr., terhadap infeksi bakteri *Streptococcus agalactiae* menunjukkan bahwa ikan jelawat tahan terhadap *Streptococcus agalactiae*, yang diketahui melalui ujiantang lewat injeksi intraperitoneal dan intramuskuler serta rendaman dengan dosis 10^9 cfu/ml. Jadi kemungkinannya ikan nila LARASATI juga tahan terhadap infeksi *Streptococcus agalactiae* atau harus diujiantang dengan dosis yang berbeda dengan ikan nila BEST. Dosis ujiantang yang digunakan pada nila BEST adalah 10^3 cfu/mL. Sehingga walaupun sudah divaksin, tetapi dosis ujiantang yang diberikan tidak cukup kuat, proses infeksi tetap berjalan, tetapi lambat, yang dimungkinkan terminasi akhir penyakit adalah ikan sakit lalu mati atau kemungkinan ikan sakit dan menjadi sembuh.

Titer Antibodi

Antibodi bereaksi spesifik dengan antigen membentuk senyawa kompleks berupa endapan (*presipitat*) dan gumpalan (*aglutinat*) yang ditunjukkan melalui uji *imunopresipitasi* (*imunodifusi*) *Agar Gel Precipitation Test* (AGPT) atau uji aglutinasi. Antibodi berperan sebagai *presipitin* dan *aglutinin*. Cara lain antibodi menghalangi efek antigen dengan cara blokade, yaitu bereaksi dengan *epitop* antigen sehingga antigen tidak mampu mengenal reseptor sel inang yang menyebabkan kegagalan proses perlekatan antigen pada

permukaan sel inang (antibodi bertindak sebagai *inhibin*). Cara lain adalah melalui antibodi untuk mempercepat eliminasi antigen dengan proses *opsonisasi* (antibodi sebagai *opsonin*). Antigen dalam keadaan teropsonisasi lebih mudah dikenal makrofag dan lebih efektif untuk dihancurkan.

Ikan nila uji yang divaksin tetap mampu memproduksi antibodi saat diuji aglutinasi dengan bakteri *Streptococcus agalactiae* pada minggu ke-4 pasca vaksinasi. Pada akhir pengamatan masih ditemukan adanya antibodi yang terbentuk pada ikan nila uji yang divaksinasi, ini menunjukkan bahwa kedua cara vaksinasi yang diberikan dengan berbagai macam konsentrasi mampu membantu tubuh untuk mengeliminasi bakteri patogen yang menginfeksi.

Nilai titer antibodi juga menunjukkan adanya respon imunitas pada semua perlakuan, namun tidak memberikan level proteksi yang berbeda nyata. Hal ini diduga karena tidak berfungsi secara efektif perlakuan ujiantang yang diberikan.

Gejala Klinis

Berdasarkan hasil penelitian, gejala klinis ikan nila uji yang terinfeksi *Streptococcus agalactiae* ditunjukkan adanya *clear operculum*, warna tubuh memudar, serta berenang lemah dan di dasar. Walaupun bentuk tubuh secara keseluruhan masih sama seperti ikan sehat. Berdasarkan hasil penelitian Hardi (2010) gejala klinis ikan nila BEST mulai muncul dalam waktu 72 jam pasca ujiantang ditandai dengan warna tubuh yang menghitam, dan kematian mulai terjadi dalam waktu 24 jam pasca ujiantang.

Serangan bakteri *Streptococcus agalactiae* terhadap ikan nila uji dapat dibedakan menjadi 3, yaitu: 1) ditandai adanya gejala klinis dan menyebabkan kematian, 2) tidak adanya gejala klinis tetapi menyebabkan kematian, 3) ditandai adanya gejala klinis tetapi tidak menyebabkan kematian.

Kualitas Air

Kualitas air selama penelitian yang meliputi suhu dan pH air masih dalam kisaran yang optimal untuk mendukung kehidupan ikan nila. Data suhu penelitian memiliki kisaran 25-27 °C, nilai ini masih berada dalam

kisaran syarat tumbuh normal ikan nila yaitu 14-38 °C. Demikian juga data pH hasil penelitian 6,5-7,0 masih dalam kisaran syarat tumbuh normal ikan nila. Fluktuasi suhu dan pH juga masih dalam kisaran yang tidak berbahaya bagi ikan nila.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Vaksin *Streptococcus agalactiae* yang diberikan melalui aplikasi perendaman dan injeksi intraperitoneal dengan berbagai konsentrasi tidak efektif untuk mencegah Streptococcosis pada ikan nila LARASATI.

Saran

Perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan ikan uji dari berbagai varietas ikan nila yang berbeda, agar dapat diketahui tingkat efektivitas vaksin yang diberikan dengan dosis ujiantang sesuai dengan jenis ikan uji tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Chinabut S, Limsuwan C, Kitsawat P. 1991. *Histology of the Walking Catfish, Clarias batrachus*. Thailand : International Development Research Centre (IDRC).
- Dunham RA. 2009. *Transgenic fish resistant to infectious diseases, their risk and prevention of escape into the environment and future candidate genes for disease transgene manipulation*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 32(2):139-61. Epub 2008 Feb 4.
- Effendie MI. 1997. *Biologi Perikanan*. Yayasan Pustaka Nusatama. Yogyakarta.
- Ellis AE. 1988. *General Principles of Fish Vaccination*. di dalam: *Fish Vaccination*. Academic Press. New York.
- Gasperz V. 1991. *Metode Rancangan Percobaan*. CV. Armico. Bandung.
- Hardi EH. 2010. *Vaksinasi Streptococcus agalactiae Pada Ikan Nila (Oreochromis niloticus) Menggunakan Dua Isolat Berbeda*. Disertasi Sekolah Pascasarjana IPB. Bogor.
- Lusiastuti AM. 2009. *Potensi Imunogenik sel utuh (whole cell) Streptococcus agalactiae yang divaksinasi dengan formalin untuk pencegahan streptococcosis pada ikan nila (Oreochromis niloticus)*. Laporan Penelitian Hibah Penelitian Bagi Peneliti dan Perekayasa Departemen Kelautan dan Perikanan. Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar. Pusat Riset Perikanan Budidaya. Departemen Kelautan dan Perikanan.
- Pasnik DJ, JJ Evans, PH Klesius. 2005. *Duration of Protective Antibodies and Correlation with Survival in Nile tilapia Oreochromis niloticus Following Streptococcus agalactiae Vaccination*. Diseases of Aquatic Organisms. 66:129-134.
- Purwaningsih Uni. 2009. *Potensi imunogenik sel utuh (whole cell) Streptococcus agalactiae yang diinaktivasi melalui proses pemanasan untuk pencegahan penyakit Streptococcosis pada ikan nila (Oreochromis niloticus)*. Laporan Penelitian Hibah Penelitian Bagi Peneliti dan Perekayasa Departemen Kelautan dan Perikanan. Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar. Pusat Riset Perikanan Budidaya. Departemen Kelautan dan Perikanan.
- Taukhid. 2009. *Efektivitas Pemberian Vaksin Streptococcus spp. Pada Benih Ikan Nila (Oreochromis niloticus) Melalui Teknik Perendaman Untuk Pencegahan Penyakit Streptococcosis*. Laporan Penelitian Hibah Penelitian Bagi Peneliti dan Perekayasa Departemen Kelautan dan Perikanan. Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar. Pusat Riset Perikanan Budidaya. Departemen Kelautan dan Perikanan.
- Wedemeyer GA, Yasutake WT. 1977. *Clinical Methods for the Assessment of the Effect Environment Stress on the Fish Health*.

Technical Paper of the US Fish and Wildlife Service. US Depart of the Interior Fish and Wildlife Service. 89:1-17.

Winarti. 2010. *Kerentanan Ikan Jelawat Leptobarbus hoevenii Blkr Terhadap Infeksi Bakteri Patogen*. Thesis Sekolah Pascasarjana IPB. Bogor.