

## **Peningkatan Efikasi Vaksinasi pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) dengan Penambahan Ekstrak Tanaman Terung Asam dan Lempuyang**

*(INCREASED EFFICACY OF VACCINATION IN TILAPIA  
(OREOCHROMIS NILATICUS) WITH THE ADDITION OF THE SOLANUM FEROX  
AND BITTER GINGER (ZINGIBER ZERUMBET) PLANT EXTRACTS)*

**Esti Handayani Hardi,  
Komsanah Sukarti, Maulina Anggridini**

Department Akuakultur,  
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Mulawarman  
Jl. Gunung Tabur, Gunung Kelua, Samarinda Ulu,  
Samarinda, Kalimantan Timur, Indonesia, 75123  
Tel./Fax: +62-541-749159; Email: [estieriyadi2011@gmail.com](mailto:estieriyadi2011@gmail.com)

### **ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis kemampuan ekstrak terung asam (*Solanum ferox*/SF) dan lempuyang (*Zingiber zerumbet*/ZZ) dalam meningkatkan efikasi vaksin bakteri *Pseudomonas* sp. (EP-02) yang diberikan melalui perendaman pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Dosis yang digunakan yaitu ekstrak SF 600 mg.L<sup>-1</sup>; ZZ 200 mg.L<sup>-1</sup> dan kepadatan bakteri vaksin yang digunakan 10<sup>8</sup> CFU.mL<sup>-1</sup>, rasio antara ekstrak terung asam, ekstrak lempuyang dan vaksin adalah 1:1:1. Pengujian diawali dengan merendam selama 20 menit ikan nila (*O. niloticus*) dengan campuran vaksin dan ekstrak tanaman terung asam/SF dan lempuyang/ZZ, dilanjutkan dengan uji tantang dengan bakteri gabungan *Aeromonas hydrophila* (EA-01) dan *Pseudomonas fluorescens* (EP-02) (kepadatan bakteri masing-masing 10<sup>5</sup> CFU.mL<sup>-1</sup>) melalui injeksi intramuskular sebanyak 0,1 mL pada hari ke-7 (d7), 14 (d14) dan 21 (d21) pascavaksinasi. Pengamatan imunitas non spesifik dan spesifik serta tingkat kelangsungan hidup diukur pada minggu ke-2 pasca uji tantang. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aplikasi ekstrak SF dan ZZ pada vaksinasi mampu meningkatkan imunitas non spesifik (parameter darah) dan imunitas spesifik (indeks fagositik/IP dan titer antibodi) sejak hari ke-7/d7 pemberian, sedangkan pemberian vaksin saja tanpa ekstrak baru terjadi peningkatan secara signifikan pada hari ke-14/d14 pascavaksinasi. Peningkatan kelangsungan hidup pascainfeksi dengan bakteri *A. hydrophila* dan *P. fluorescens* juga lebih tinggi pada ikan yang diberikan vaksin dan ekstrak. Sebagai kesimpulan, penambahan ekstrak SF dan ZZ mampu meningkatkan kinerja vaksin lebih cepat dan lebih efektif sejak hari ke-7/d7 infeksi.

Kata-kata kunci: vaksinasi; adjuvant; *Solanum ferox*, *Zingiber zerumbet*; *Oreochromis niloticus*

### **ABSTRACT**

This research was aimed to evaluate the *Solanum ferox*/SF and bitter ginger (*Zingiber zerumbet*/ZZ) in increasing the effectiveness of the *Pseudomonas* sp. (EP-02) vaccine through immersion in tilapia (*Oreochromis niloticus*). The dose used was 600 mg.L<sup>-1</sup> of SF; 200 mg.L<sup>-1</sup> of ZZ and vaccine bacterial density used 10<sup>8</sup> CFU.mL<sup>-1</sup>, the ratio between vaccine and extract was 1: 1: 1. The test were begun with immersion the tilapia in the vaccine and extract for 20 minutes, the challenges test was done on day 7<sup>th</sup> (d7), 14<sup>th</sup> (d14) and 21<sup>th</sup> (d21) post-vaccination with the combined bacteria *Aeromonas hydrophila* (EA-01) and *Pseudomonas fluorescens* (EP-01) (concentration of each bacteria was 10<sup>5</sup> CFU.mL<sup>-1</sup>) through intramuscular injection of 0.1 mL each fish. Abnormal swimming patterns, pathology of anatomy, total mortality, survival rate, RPS, were measured at week 2 after the challenge test. Application of SF and ZZ extracts in vaccination can increase the non specific (haematology parameters) and specific immunity (phagocytic index and antibody) since d7 of vaccination. While the increasing fish immunity in vaccine groups occurred in d14 post vaccination. The extract administration in vaccination reduced the fish mortality; increased SR and RPS of tilapia faster than the vaccination group. In conclusion, addition of SF and ZZ extracts can increase the efficacy of vaccines faster and more effectively from day 7<sup>th</sup> of infection.

Keywords: vaccination; adjuvant; *Solanum ferox*; *Zingiber zerumbet*; *Oreochromis niloticus*

## PENDAHULUAN

Penyakit yang disebabkan oleh bakteri patogen *Aeromonas hydrophila* dan *Pseudomonas fluorescens* masih menjadi penyebab kematian dalam budidaya ikan. Kedua bakteri ini menyebabkan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) mengalami eksophtalmia, permukaan tubuh menghitam, dan luka pada organ terinfeksi (Hardi *et al.*, 2014; Hardi *et al.*, 2016; 2017). Berbagai cara penanggulangan sudah dilakukan, antara lain menggunakan vaksin *Pseudomonas* (Yuliani *et al.*, 2014; Hardi *et al.*, 2014b; Sauqie *et al.*, 2016), ekstrak tanaman rempah (Hardi *et al.*, 2016a; 2016b; 2017a,b), antibakteri dari bakteri antagonistik dan komponen bakteri (Hardi *et al.*, 2016c) dan hasilnya menunjukkan aktivitas penghambatan yang cukup baik.

Vaksinasi merupakan cara yang paling aman untuk mengendalikan patogen melalui peningkatan imunitas spesifik ikan (Evensen, 2016). Penggunaan vaksin *Pseudomonas* sp. untuk pencegahan penyakit bakterial pada ikan nila sudah dilakukan baik secara laboratorium (Yuliani *et al.*, 2016) dan secara lapang di keramba jaring apung (Sauqie *et al.*, 2017) dengan tingkat proteksi terhadap infeksi bakteri *A. hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. mencapai 70-90%. Namun, kendalanya adalah sistem imun spesifik yang terbentuk membutuhkan waktu yang cukup lama, yakni sekitar tiga minggu pascavaksinasi, dan terkadang infeksi sudah terjadi lebih cepat di lingkungan budidaya (Hardi *et al.*, 2014b; Pasnik *et al.*, 2005) di samping itu pemberian vaksin membutuhkan *booster* atau pemberian vaksinasi ulang. Untuk menanggulangi hal tersebut, dibuatlah ramuan vaksin yang dapat meningkatkan imunitas ikan lebih cepat dan tingkat proteksi yang lama. Caranya adalah dengan menambahkan *adjuvant* ke dalam vaksin yang dapat memperlambat pelepasan vaksin dalam tubuh ikan, akibatnya proses perangsangan zat kebal berlangsung lebih lama.

*Adjuvant* seringkali ditambahkan ke dalam vaksin untuk meningkatkan imunogenisitas vaksin. Schijns (2001) menyatakan bahwa *adjuvant* dapat melepas antigen secara perlahan sehingga memperpanjang paparan antigen dengan sistem imun, mempertahankan integritas antigen, dan memicu respons imun dengan afinitas tinggi. Lebih lanjut, Rajput *et al.* (2007) menyatakan bahwa vaksin dengan penambahan *adjuvant* dapat meningkatkan

potensi sistem imun serta menambah lamanya perlindungan terhadap suatu infeksi penyakit pada hewan dan manusia.

Beberapa bahan *adjuvant* yang digunakan pada ikan antara lain Freund's *adjuvants* (Stills, 2005); lipopolisakarida/LPS (Kawakami *et al.*, 1998); *mineral oil adjuvant* (Mutoloki *et al.*, 2010); garam aluminium (Jiao *et al.*, 2010), *β*-glucans (Robertsen *et al.*, 1999; Dalmo dan Bøgwald, 2008); *cytokine* (Caipang *et al.*, 2009); lipopeptida (Hoel dan Lillehaug, 1997); ekstrak tanaman *Quillaja saponaria* berupa saponin (Wang *et al.*, 2016); gabungan ekstrak tanaman *Ocimum sanctum* (Tulsi), *Withania somnifera* (Ashwagandha), *Tinospora cordifolia* (Guduchi) dan *Embllica officianalis* (Amalaki) (Priyadarshini *et al.*, 2012).

Pengembangan bahan alami sebagai bahan *adjuvant* dan imunomodulator sudah mulai dikembangkan untuk meningkatkan sistem imun ikan (Zhu *et al.*, 2013; Pasquale *et al.*, 2015), karena adanya kandungan saponin didalamnya (Freitas *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2016; Hardi *et al.*, 2016 a, b; 2017a, b; Hardi *et al.*, 2019).

Vaksinasi melalui metode perendaman telah banyak dilakukan untuk ikan dengan hasil yang sangat baik (Johnson dan Amend 1983; Hastein *et al.*, 2005; Joosten *et al.*, 1997), meskipun beberapa ahli menganggap metode injeksi lebih efektif untuk meningkatkan imunitas spesifik ikan (Hardi *et al.*, 2013; Gudding *et al.*, 1999; Evensen *et al.*, 2005). Pemberian ekstrak SS dan ZZ bersama dengan vaksin *Pseudomonas* sp. secara injeksi mampu meningkatkan imunitas spesifik ikan nila (Hardi *et al.*, 2018). Artikel penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi ekstrak terung asam dan lempuyang dalam meningkatkan efikasi vaksin *Pseudomonas* sp. yang diberikan secara perendaman pada benih ikan nila.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Agustus sampai Desember 2018 di Laboratorium Mikrobiologi Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan dan Fakultas Kehutanan Universitas Mulawarman, Samarinda, Kalimantan Timur.

### Ikan Uji

Ikan uji yang digunakan adalah ikan nila (*O. niloticus*) berukuran  $10 \pm 0,3$  g diperoleh dari Desa Sebulu, Kabupaten Kutai Kartanegara,

Kalimantan Timur. Sebelum ikan digunakan, dilakukan pemeriksaan dengan mengisolasi organ insang dan ginjal pada media *Glutamate Starch Phenol* (GSP), jika bakteri tidak tumbuh, ikan dapat digunakan, jika ada bakteri yang tumbuh, ikan direndam dalam larutan formalin 3% selama lima menit, metode diulang jika masih ditemukan ikan sampel yang teridentifikasi membawa bakteri *Aeromonas* dan *Pseudomonas*. Ikan nila yang digunakan untuk tujuh kelompok pengujian sebanyak 210 ekor.

### **Bakteri *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, dan *Pseudomonas* sp.**

Isolat bakteri *A. hydrophila* (EA-01), *Pseudomonas* sp. (EP-01), *P. fluorescens* (EP-02) didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Perairan FPIK Unmul, Samarinda. Isolat bakteri (*stock*) disimpan dalam media *Brain Heart Infusion Broth*/BHIB (DIFCO®) dan media padat *Brain Heart Infusion Agar*/BHIA, (DIFCO®). Pengujian bakteri *Aeromonas* dan *Pseudomonas* dilakukan dengan pengujian Biokimia (SNI 7303-2009) dan dilanjutkan dengan menggunakan API 20 NE Biomerieux<sup>o</sup> untuk mengidentifikasi bakteri Gram negatif *non-Enterobacteriaceae*. Untuk menghitung kepadatan bakteri menggunakan metode total plate count (TPC), dengan prosedur seperti yang dilakukan Hardi *et al.* (2016a).

### **Persiapan Vaksin**

Vaksin dibuat dengan membiakkan bakteri *Pseudomonas* sp. (EP-01) pada media BHIB, selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C setelah diperoleh kepadatan bakteri 10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup>, ditambahkan formalin 3% dan dikultur kembali pada suhu 30°C selama 24 jam dan homogenkan menggunakan *shaker*. Selanjutnya vaksin diuji keamanannya dengan mengisolasi kandidat vaksin pada media BHIA, jika dalam waktu 72 jam tidak tumbuh, maka vaksin aman untuk digunakan.

### **Persiapan Bakteri Uji Tantang**

Bakteri yang digunakan untuk uji tantang adalah bakteri patogen *A. hydrophila* (EA-01) dan *P. fluorescens* (EP-02) yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Perairan, FPIK Unmul. Bakteri uji ditumbuhkan dalam media cair BHI selama 24 jam pada suhu 30°C. Kepadatan yang digunakan untuk masing-masing bakteri adalah 10<sup>5</sup> CFU mL<sup>-1</sup>, bakteri yang digunakan untuk uji tantang dicampur antara EA-01:EP-02 adalah 1:1.

### **Persiapan Ekstrak**

Ekstrak yang digunakan adalah ekstrak terung asam atau terung dayak (*Solanum ferox/SF*) 600 mg.L<sup>-1</sup> dan ekstrak lempuyang (*Zingiber zerumbet/ZZ*) 200 mg.L<sup>-1</sup>. Pengenceran dilakukan dengan menggunakan aquades steril. Ekstrak dibuat dengan menggunakan pelarut etanol dengan menggunakan metode Hardi *et al.* (2016a,b) dan proses ekstraksi dilakukan di laboratorium Kimia Kayu, Fakultas Kehutanan, Universitas Mulawarman.

### **Uji Efikasi Vaksin dan Ekstrak**

Vaksin *Pseudomonas* sp. (EP-02), ekstrak SF dan ZZ dicampurkan dengan perbandingan 1:1:1 dan pemberiannya secara perendaman selama 20 menit. Larutan yang berisi vaksin dan ekstrak untuk perendaman sebanyak 2 L untuk 10 ekor ikan. Ikan yang telah direndam dengan vaksin dan ekstrak selanjutnya dipelihara dalam akuarium uji dan dilakukan uji tantang dengan bakteri *A. hydrophila* (EA-01) dan *P. fluorescens* (EP-02) pada hari ke-7 (d7), 14 (d14), dan 21 (d21) pascavaksinasi (Tabel 1.) dan dipelihara hingga minggu ke-2 setelah uji tantang. Secara terperinci, pengujian yang dilakukan.

Penelitian pengujian kemampuan ekstrak SF dan ZZ dalam meningkatkan efikasi vaksin EP-01 pada ikan nila dilakukan dalam tujuh kelompok/group (A-G), dan masing-masing group diulang sebanyak tiga kali dan setiap group terdiri dari tiga akuarium uji yang berisi 30 ekor ikan nila.

### **Uji Tantang dengan bakteri *A. hydrophila* dan *P. fluorescens***

Uji tantang dilakukan dengan menginjektikan ikan dengan bakteri gabungan EA-01:EP-02 dengan perbandingan 1:1 kepada ikan yang telah divaksinasi. Kepadatan masing-masing bakteri uji 10<sup>5</sup> CFU.mL<sup>-1</sup>, penginjeksian bakteri dilakukan secara intramuskular sebanyak 0,1 mL setiap ekor ikan pada d7, d14, dan d21 pascavaksinasi (sesuai perlakuan pada Tabel 1.).

### **Parameter Penelitian**

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini diukur pada minggu ke-2 setelah uji tantang sehingga waktunya menyesuaikan dengan waktu uji tantang yang dilaksanakan sejak d7, d14, dan d21 pascavaksinasi. Beberapa parameter, yang diukur antara lain: 1) Pola renang, patologi anatomi organ luar dan organ dalam ikan nila, mengikuti metode Hardi *et al.*

Tabel 1. Perlakuan uji efikasi vaksin *Pseudomonas* sp. dan ekstrak (terung asam/SS dan lempuyang/ZZ) pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*).

Perlakuan	Jenis Perlakuan	Waktu ujiantang	Pengamatan parameter uji pada Minggu ke 2 setelah ujiantang
A	Vaksin + <i>S. ferox</i> + <i>Z. zerumbet</i>	Hari ke- 7	Hari ke- 21
B	Vaksin + <i>S. ferox</i> + <i>Z. zerumbet</i>	Hari ke- 14	Hari ke- 28
C	Vaksin + <i>S. ferox</i> + <i>Z. zerumbet</i>	Hari ke- 21	Hari ke- 35
D	Vaksin	Hari ke- 7	Hari ke- 21
E	Vaksin	Hari ke- 14	Hari ke- 28
F	Vaksin	Hari ke- 21	Hari ke- 35
G	Tidak divaksin dan tidak diberi ekstrak	Hari ke- 14	Hari ke- 28

(2018); 2) Parameter darah total leukosit, total eritrosit, kadar hematokrit, hemoglobin dilakukan mengikuti prosedur Blaxhall dan Daisley (1973); 3) Parameters imunitas spesifik yaitu Indeks Phagositik/IP, titer antibodi mengikuti metode Hardi *et al.* (2018); 4) Tingkat mortalitas dan tingkat kelangsungan hidup (*Survival Rate/SR*), dan Relative Percent Survival (RPS) dihitung untuk mengetahui efikasi vaksinasi dihitung dengan menggunakan rumus Ellis (1988) dan Amend (1981). Pengukuran RPS dilakukan untuk membandingkan efikasi vaksin antara ikan yang diberi vaksin dan ekstrak (A, B, C) dan ikan yang diberi Vaksin (D, E, F). Ada pun rumus  $RPS = [1 - \{(\% \text{ ikan yang mati pada perlakuan vaksin}) \times (\% \text{ ikan yang mati pada perlakuan kontrol})^{-1}\}]$ , sedangkan  $SR = [(\text{jumlah ikan yang hidup pada akhir pengamatan}) \times (\text{jumlah ikan pada awal penelitian})^{-1}] \times 100$ .

#### Analisis Data

Seluruh data (parameter penelitian yang diukur) disajikan dalam nilai rata-rata dan standar deviasi. Selanjutnya selain data pola renang, patologi anatomi organ luar dan organ dalam dianalisis menggunakan sidik ragam non parametrik (two-way Analysis of Variance SPSS 22 Inc., USA). Untuk hasil berbeda nyata pada taraf  $P < 0,05$  dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Karakteristik Bakteri *Aeromonas* dan *Pseudomonas*

Bakteri yang digunakan untuk vaksin dan uji tantang adalah *Aeromonas* dan *Pseudomo-*

*nas*, untuk meyakinkan bahwa bakteri yang digunakan adalah benar, maka bakteri ditumbuhkan di media *Glutamate Starch Phenol* (GSP) dan selanjutnya diuji menggunakan API 20 NE. Secara terperinci karakteristik bakteri disajikan dalam Tabel 2. dan Tabel 3.

### Patologi anatomi organ luar

Pemberian ekstrak SF dan ZZ mampu meningkatkan efikasi vaksin EP-01 pada ikan nila, diindikasikan dengan berkurangnya abnormalitas pola berenang, patologi anatomi organ luar dan organ dalam ikan nila pascainfeksi dengan bakteri EA-01 dan EP-02 (Tabel 4). Ikan yang terinfeksi bakteri EA-01 dan EP-02 menunjukkan gejala eksoptalmia pada mata, sirip gripis dan terkadang timbul pendarahan (Hardi *et al.*, 2014a; Hardi *et al.*, 2016; 2017; Anderson, 1992), sedangkan ikan pada perlakuan vaksin dan ekstrak (perlakuan A, B, C) ikan tidak menunjukkan gejala tersebut pascainfeksi, dan hanya sebanyak 10-20% ikan menunjukkan abnormalitas pada perlakuan ikan yang diberi vaksin (D, E, F). Ikan kontrol tanpa vaksin dan ekstrak (G) sebanyak 20-72% menunjukkan abnormalitas berenang dan patologi anatomi organ luar dan organ dalam pasca infeksi kedua bakteri patogen.

### Parameter Darah Ikan

Peningkatan efikasi vaksin EP-01 dengan pemberian ekstrak SF dan ZZ (A, B, C) juga terlihat dari peningkatan total leukosit yang berbeda nyata dibandingkan dengan vaksinasi tanpa ekstrak (D, E, F) dan kontrol (G) ( $P < 0,05$ ). Begitu juga dengan total eritrosit pada perlakuan vaksin dengan ekstrak (A, B, C) berbeda nyata dibandingkan dengan perlakuan vaksin (D, E) dan kontrol (G), sedangkan untuk parameter

Table 2. Karakteristik bakteri *Aeromonas* dan *Pseudomonas* menggunakan metode biokimia (SNI 7303-2009)

Kode Bakteri	Gram	Katalase	Motilitas	Mannitol Fermentatif	O/F	Tumbuh di media NaCl	Bacterial Group
EA-01	-	+	+	+	F+	+	<i>Aeromonas</i>
EP-01	-	+	-	-	O-	+	<i>Pseudomonas</i>
EP-02	-	+	-	-	O-	+	<i>Pseudomonas</i>

Keterangan: EA-01= *Aeromonas hydrophila* 1 ; EP-01= *Pseudomonas* sp.: EP-02= *P. fluorescens* ; O/F= Uji Oksidatif Fermentatif ; O= Oksidatif; F= Fermentatif

Table 3. Karakteristik bakteri *Aeromonas* dan *Pseudomonas* menggunakan uji API 20 NE

Active Ingredients	EA-01	EP-01	EP-02
L-arginine	+	+	+
Trisodium citrate	-	+	+
Urea	-	+	+
Lypolysis	-	+	+
L-tryptophane	-	-	+
Sodium pyruvate	+	-	-
Gelatin	+	+	+
Starch hydrolysis	+	+	+
D-mannitol	+	+	+
Inositol	+	-	+
D-sorbitol	+	+	+
D-sucrose	+	+	+
Amylase	+	+	+
L-arabinose	-	+	+
Oxidase	+	-	-
Siderophore	-	+	+

Keterangan: EA-01= *Aeromonas hydrophila* 1 ; EP-01= *Pseudomonas* sp.: EP-02= *P. fluorescens*.

Tabel 4. Persentase terjadinya perubahan pola renang dan perubahan patologi anatomi organ luar dan organ dalam ikan nila pada minggu ke-2 ujiantang

Pola renang dan patologi anatomi	Persentase perubahan (%) pada perlakuan:						
	A	B	C	D	E	F	G
Berenang berputar	0	0	0	0	0	0	20
Berenang di dasar akuarium	0	0	0	10	0	0	50
Pergerakan lemah	0	0	0	20	10	0	55
Patologi anatomi organ luar:							
Warna tubuh hitam	0	0	0	10	10	0	72
Sisik lepas	0	0	0	20	20	10	58
Mata menonjol	0	0	0	20	0	0	65
Mata berkabut ( <i>opacity</i> )	0	0	0	10	10	0	65
Operkulum luka/pucat ( <i>clear operculum</i> )	0	0	0	20	10	10	45
Sirip gripis	0	0	0	10	10	10	40
Patologi anatomi organ dalam:							
Organ dalam pucat	0	0	0	20	20	20	48
Organ dalam berair	0	0	0	20	10	0	42

Keterangan: A-G merujuk pada Tabel 1.

hematokrit tidak terjadi peningkatan yang signifikan pada semua perlakuan. Kadar hemoglobin pada perlakuan vaksin dan ekstrak lebih tinggi dan berbeda nyata ( $P<0,05$ ) dibandingkan dengan tanpa ekstrak dan dengan perlakuan kontrol.

### Titer Antibodi

Produksi antibodi mulai terjadi sejak minggu ke-2 pada ujiantang d7, namun jumlahnya baru berbeda nyata ( $P<0,05$ ) pada ujiantang pada d14 dan d21 baik pada perlakuan vaksin dan ekstrak (A, B, C) maupun perlakuan vaksin saja (D, E, F).

### Indeks Fagositik (%)

Indeks fagositik/IP ditentukan dengan menghitung jumlah sel darah putih (monosit, limfosit, dan neutrophil) yang melakukan aktivitas fagositik dengan pewarnaan Giemsa. Hasil penelitian menunjukkan, pemberian ekstrak pada vaksinasi mampu meningkatkan nilai IP secara signifikan ( $P<0,05$ ) dibandingkan dengan perlakuan vaksin dan kontrol. Dilihat dari waktu ujiantangnya, sejak ujiantang d7 ikan telah menunjukkan peningkatan nilai IP, artinya penambahan ekstrak mampu meningkatkan efikasi vaksin dalam meningkatkan aktivitas IP ikan nila.

Tabel 5. Parameter darah ikan nila pada minggu ke-2 pasca ujiantang

Parameter darah	Perlakuan						
	A	B	C	D	E	F	G
Total leukosit (sel.mm <sup>-3</sup> )	170.800±10 <sup>d</sup>	489.60013 <sup>c</sup>	419.200±15 <sup>c</sup>	11.000±20 <sup>b</sup>	11.800±10 <sup>b</sup>	13.20012 <sup>b</sup>	2.639±15 <sup>a</sup>
Total eritrosit (sel.mm <sup>-3</sup> )	3.166.667 <sup>d</sup>	2.550.000 <sup>b</sup>	2.300.000 <sup>b</sup>	1.890.000 <sup>c</sup>	1.410.000 <sup>c</sup>	2.190.000 <sup>b</sup>	628.054 <sup>a</sup>
Hematokrit (%)	12±0,3 <sup>b</sup>	8±0,2 <sup>a</sup>	6±0,2 <sup>a</sup>	14±0,3 <sup>b</sup>	10±0,2 <sup>a</sup>	16±0,3 <sup>b</sup>	6±0,3 <sup>a</sup>
Hemaglobin (g%)	4,5±0,1 <sup>b</sup>	4,7±0,1 <sup>b</sup>	4,6±0,1 <sup>b</sup>	7±0,2 <sup>a</sup>	6,5±0,1 <sup>a</sup>	7±0,1 <sup>a</sup>	8±0,1 <sup>a</sup>

Keterangan: A-G merujuk pada Tabel 1.

Tabel 6. Titer antibodi (-log<sub>2</sub>) ikan nila pada minggu ke-2 ujiantang

Bakteri uji aglutinasi	Perlakuan						
	A	B	C	D	E	F	G
<i>Aeromonas hydrophila</i>	8 <sup>a</sup>	11 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>	8 <sup>a</sup>	10 <sup>b</sup>	10 <sup>b</sup>	8 <sup>a</sup>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	11 <sup>b</sup>	10 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>	10 <sup>b</sup>	10 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>	7 <sup>a</sup>

Keterangan: A-G merujuk pada Tabel 1.

Tabel 7. Indeks fagositik (%) ikan nila pada minggu ke-2 ujiantang

Perlakuan	Indeks fagositik (%)
A	20,00±0,5 <sup>c</sup>
B	22,00±1,0 <sup>c</sup>
C	28,00±0,6 <sup>c</sup>
D	14,00±1,0 <sup>b</sup>
E	10,00±1,5 <sup>b</sup>
F	16,00±1,0 <sup>b</sup>
G	6,0±0,5 <sup>a</sup>

Keterangan: A-G merujuk pada Tabel 1.

### Tingkat Kelangsungan Hidup Ikan

Peningkatan secara signifikan ( $P<0,05$ ) pada tingkat kelangsungan hidup ikan nila pascainfeksi bakteri EA-01 dan EP-02 pada d7, d14 dan d21 terlihat pada ikan yang diberi vaksin dengan ekstrak (A, B, C) dan perlakuan vaksin (D, E, F), dibandingkan dengan kontrol (G). Peningkatan SR dan RPS ikan nila pada perlakuan vaksin d21 (F) tidak berbeda nyata dibandingkan dengan semua perlakuan vaksin plus ekstrak (A, B, C). Ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak mampu meningkatkan kelangsungan hidup ikan nila pascainfeksi dengan bakteri patogen sejak d7 dan d14 ujiantang dan nilainya sama dengan pemberian

vaksin d21. Nilai RPS 2 menunjukkan peningkatan efikasi vaksin EP-01 dengan pemberian ekstrak SF dan ZZ sebesar 29-55%. Sama halnya dengan penambahan *adjuvant* vaksin *V. anguillarum* pada ikan turbot, menunjukkan adanya peningkatan RPS pasca ujiantang pada hari ke-14 dan 28 (Wang *et al.*, 2016).

Pemanfaatan *adjuvant* dalam vaksinasi pada manusia (Wang *et al.*, 2016; Pasquale *et al.*, 2015) dan ikan (Hardi *et al.*, 2019) sudah dilakukan, karena terbukti dapat meningkatkan kemampuan imunitas dari vaksin yang diberikan. Beberapa bahan yang bersifat sebagai *adjuvant* antara lain aluminium, emulsi air dalam minyak/*water-in-oil emulsions* (Freund's adjuvants), bagian dari sel mikroorganisme dan komponen dari ekstrak tanaman (Bo-Kun Su dan Chen, 2008)

Ekstrak tanaman seperti *Boesenbergia pandurata*, *S. ferox*, *Z. zerumbet*, *Azadirachta indica*, *O. sanctum*, *Curcuma longa* yang memiliki kandungan saponin, flavonoid, dan karbohidrat memiliki kemampuan sebagai imunomodulator dan juga *adjuvant* karena meningkatkan IP, *respiratory burst*, dan *alternative complement activity* serta *lysozyme* (Gjessing *et al.*, 2012; Hardi *et al.*, 2016a dan 2017 a,b; Harikrishnan *et al.*, 2009).

Data pengujian menunjukkan pencampuran ekstrak SF dan ZZ dengan vaksin EP-01 mampu meningkatkan total leukosit, total eritrosit, titer antibodi dan IP ikan nila dibandingkan dengan ikan nila yang diberi vaksin tanpa ekstrak (group D, E, F) dan ikan kontrol (group G). Peningkatan mulai terjadi pada waktu ujiantang d7 hingga d21. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak

mampu mempercepat peningkatan imunitas non spesifik dan spesifik ikan nila. Hal serupa juga terlihat dari hasil penelitian penggunaan ekstrak tanaman untuk meningkatkan efikasi vaksin juga telah dilakukan oleh Hardi *et al.* (2018); Song dan Hu (2009); Milgate dan Roberts (1995); Bagherwal (2011); Wang *et al.* (2016). Peningkatan efikasi vaksin yang diberi ekstrak tersebut disebabkan oleh kemampuan saponin meningkatkan respons imun pada jaringan mukosa dan menghambat penempelan virus/bakteri pada sel inang, melalui pengerusakan membrane sel protein (Tam dan Roner., 2011; Sasaki *et al.*, 1998). Menurut Wang *et al.* (2016) saponin dari tanaman *Quillaja saponaria* mampu meningkatkan efektivitas komplemen, fagositosis sel makrofag, dan meningkatkan respons pembentukan antibodi pada ikan.

Hasil penelitian juga menunjukkan adanya peningkatan titer antibodi dan IP pada ikan nila yang diberi penambahan ekstrak dalam vaksin, hal ini diduga karena ekstrak mempercepat penyajian antigen yang diperlukan untuk aktivasi limfosit T dan limfosit B spesifik seperti hasil penjabaran oleh Sun *et al.* (2009); Tafalla *et al.* (2017); Ribeiro dan Schijns (2010); dan Dalmo *et al.* (2016). Selain itu, peningkatan titer antibodi dan IP selaras dengan peningkatan SR dan RPS ikan nila pascainfeksi dengan bakteri *A. hydrophila* dan *P. fluorescens*. Kelangsungan hidup relatif ikan yang diberi dengan vaksin dan ekstrak terhadap ikan yang hanya diberi vaksin saja (RPS 2) menunjukkan adanya peningkatan RPS yaitu sebesar 29-55%. Sama halnya dengan penggunaan vaksin *Edwardsiella tarda* yang dicampur dengan *curdlan* dan saponin *Quil A* tanaman mampu meningkatkan kelangsungan

Tabel 8. Tingkat mortalitas, kelangsungan hidup dan kelangsungan hidup relatif ikan nila pada minggu ke-2 pasca ujiantang

Parameter	Perlakuan						
	A	B	C	D	E	F	G
Mortalitas (%)	20 <sup>b</sup>	15 <sup>b</sup>	10 <sup>b</sup>	28 <sup>c</sup>	25 <sup>c</sup>	22 <sup>b</sup>	95,45 <sup>a</sup>
SR(%)	80 <sup>b</sup>	85 <sup>b</sup>	90 <sup>b</sup>	72 <sup>c</sup>	75 <sup>c</sup>	78 <sup>c</sup>	4,55 <sup>a</sup>
RPS 1 (%)	79 <sup>a</sup>	84 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	71 <sup>b</sup>	74 <sup>b</sup>	77 <sup>b</sup>	
RPS 2 (%)	29 <sup>a</sup>	40 <sup>b</sup>	55 <sup>c</sup>				

Keterangan.

SR : Survival rate/ kelangsungan hidup

RPS1 : Kelangsungan Hidup Relatif terhadap ikan kontrol (Group G)

RPS 2 : Kelangsungan Hidup Relatif terhadap ikan yang di vaksin (Group D, E, F)

Keterangan A-G merujuk pada Tabel 1.

hidup secara signifikan dibandingkan dengan tanpa penggunaan saponin *Quil A* (Ashida *et al.*, 1999).

Keberhasilan ekstrak tanaman SS dan ZZ dalam vaksin *Pseudomonas* sp. dapat dilihat melalui peningkatan imunitas non spesifik dan imunitas spesifik ikan nila serta peningkatan SR dan RPS pascainfeksi dengan bakteri patogen. Mekanisme peningkatan tersebut dapat melalui beberapa cara antara lain melalui peningkatan produksi antibodi untuk bereaksi dengan epitop antigen sehingga antigen tidak mampu mengenal reseptor sel inang, dan menyebabkan kegagalan proses perlekatan antigen pada permukaan sel inang atau menghambat infeksi bakteri (Kato *et al.*, 2012), atau dapat juga melalui percepatan eliminasi antigen melalui proses opsonisasi (antibodi sebagai opsonin), antigen dalam keadaan teropsonisasi lebih mudah dikenal makrofag dan lebih efektif untuk dihancurkan (LaPatra *et al.*, 2010).

### SIMPULAN

Simpulan dari penelitian ini adalah penggunaan ekstrak SS dan ZZ mampu meningkatkan efikasi vaksin (*Pseudomonas* sp.) melalui metode perendaman ditandai dengan peningkatan imunitas spesifik dan non spesifik ikan nila, kelangsungan hidup dan tingkat proteksi terhadap infeksi bakteri *A. hydrophila* dan *P. fluorescens*.

### SARAN

Pengembangan ekstrak *S. ferox* dan *Z. zerumbet* sebagai bahan untuk meningkatkan efikasi vaksin *Pseudomonas* sp. dapat ditingkatkan dengan melakukan pemisahan komponen saponin dalam ekstrak untuk mengetahui peranan spesifik dalam meningkatkan imunitas ikan.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis berterima kasih kepada Universitas Mulawarman, Samarinda, atas bantuan dana penelitian yang diberikan melalui Islamic Development Bank/IDB 4 in 1 Research dengan nomor 339 / UN17.11 / PL / 2017. Penulis juga berterima kasih kepada Program Studi

Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Mulawarman atas *support* dan bantuannya selama penelitian.

### DAFTAR PUSTAKA

- Amend DF. 1981. Potency testing of fish vaccines. *Dev Biol Stand* 49: 447–454.
- Anderson DP. 1992 Immunostimulants, adjuvants and vaccine carriers in fish: Applications to aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases* 2: 281-307. doi: 10.1016/0959-8030(92)90067-80.
- Ashida T, Okimasu E, Ui M, Heguri M, Oyama Y, Amemura A. 1999. Protection of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* against experimental edwardsiellosis by formalin-killed *Edwardsiella tarda* in combination with oral administration of immunostimulants. *Fisheries Sci* 65: 527–530.
- Bagherwal P. 2011 Phytosaponin adjuvants: A better option for vaccines. *Int J Pharmtech Res* 3: 1837–1842.
- Blaxhall PC, Daisley KW. 1973. Routine Haematological Methods for Use with Fish Blood. *J of Fish Biol* 5: 577-581
- Bo-Kun Su, Chen JC. 2008. Effect of saponin immersion on enhancement of the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology* 24 : 74-81.
- Caipang CMA, Hirono I, Aoki T. 2009 Modulation of the early immune response against viruses by a teleostean interferon regulatory factor-1 (IRF-1). *Comp Biochem Physiol A* 152: 440–446.
- Dalmo R, Bøgwald J, Tafalla C. 2016. Adjuvants and delivery methods: current and novel. Dalam: Adams A (eds) *Fish Vaccines. Birkhauser Advances in Infectious Diseases*. Basel. Springer. Hlm. 75-104.
- Dalmo RA, Bøgwald J. 2008  $\beta$ -Glucans as conductors of immune symphonies. *Fish Shell-fish Immunol* 25: 384–396.
- Ellis AE. 1988. Current aspects of fish vaccination. *Diseases of Aquatic Organisms* 4: 159 164.



- Evensen O, Brudeseth B, Mutoloki S. 2005. The vaccine formulation and its role in inflammatory processes in fish – effects and adverse effects. *Dev Biol (Basel)* 121: 117–125
- Evensen Ø. 2016. Development of fish vaccines: focusing on methods. Dalam: Adams A (eds) *Fish Vaccines. Birkhauser Advances in Infectious Diseases*. Basel. Springer. Hlm. 53-74.
- Freitas EO, Casas CP, Borja-Cabrera GB, Santos FN, Nico D, Souza LOP, Tinoco LW, da Silva BP, Palatnik M, Parente JP, Palatnik-de-Sousa CB. 2006. Acylated and deacylated saponins of *Quillaja saponaria* mixture as adjuvants for the FML-vaccine against Visceral leishmaniasis. *Vaccine* 24: 3909-3920.
- Gjessing MC, Falk K, Weli SC, Koppang EO, Kvellestad A. 2012. A sequential study of incomplete Freund's adjuvant-induced peritonitis in Atlantic cod. *Fish Shellfish Immunol* 32: 141–150.
- Gudding R, Lillehaug A, Evensen O. 1999. Recent developments in fish vaccinology. *Vet Immunol Immunopathol* 72: 203–212.
- Hardi EH, Pebrianto CA. 2012. Bacteria Levels Difference Pathogenecity *Aeromonas* sp and *Pseudomonas* sp. on Tilapia. *Jurnal Ilmu Perikanan Tropis* 16: 35-39.
- Hardi EH, Sukenda, Harris E, Lusiastuti AM. 2013. Potential vaccine candidate of *Streptococcus agalactiae* for prevent streptococosis on nila tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Veteriner* 14(3): 408-416.
- Hardi EH, Pebrianto CA, Hidayanti T, Handayani RT. 2014a. Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* via some port entry in cultured Nila Tilapia (*Oreochromis niloticus*) from Loa Kulu Kutai Kartanegara Kalimantan Timur. *Jurnal Kedokteran Hewan* 8(2): 130-134.
- Hardi EH, Saptiani G, Pebrianto CA. 2014b. Monovalent *Pseudomonas* sp. vaccine for fish diseases controlling in aquaculture, Loa Kulu Kabupaten Kutai Kartanegara, East Borneo. Samarinda. Laporan hasil penelitian terapan dosen perguruan tinggi negeri (PTN) dan perguruan tinggi swasta (PTS) tahun 2014 di Kalimantan Timur, Badan Penelitian dan Pengembangan Daerah Provinsi Kalimantan Timur.
- Hardi EH, Kusuma IW, Suwinarti W, Agustina, Abbas I, Nugroho RA. 2016a. Antibacterial activities of some Borneo plant extracts against pathogenic bacteria of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas* sp. *AAFL Bioflux* 9(3): 638-646.
- Hardi EH, Kusuma IW, Suwinarti W, Agustina, Nugroho RA. 2016b. Antibacterial activity of *Boesenbergia pandurata*, *Zingiber zerumbet* and *Solanum ferox* extracts against *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas* sp. *Nusantara Bioscience* 8(1): 18-21.
- Hardi EH, Kusuma IW, Suwinarti W, Saptiani G, Agustina. 2016c. Antagonistic activity of extra cellular product and component bacteria of *Pseudomonas* sp. against *Aeromonas hydrophila* from tilapia aquaculture in East Borneo. AIP Conference Proceedings 1755, 130001. doi: 10.1063/1.4958545. Jogjakarta, UGM. 2015
- Hardi EH, Saptiani G, Kusuma IW, Suwinarti W, Nugroho RA. 2017a. Immunomodulatory and antibacterial effects of *Boesenbergia pandurata*, *Solanum ferox*, and *Zingiber zerumbet* on tilapia, *Oreochromis niloticus*. *AAFL Bioflux* 10(2): 182:190.
- Hardi EH, Kusuma IW, Suwinarti W, Saptiani G, Sumoharjo, Lusiastuti AM. 2017b. Utilization of several herbal plant extracts on Nile tilapia in preventing *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas* sp. bacterial infection. *Nusantara Bioscience* 9(2): 220-228.
- Hardi EH, Sukarti K, Agriandini M, Kusuma IW, Nugroho RA. 2018. The comparative studies of Borneo plant extracts to increase vaccine efficacy in tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Jurnal Akuakultur Indonesia* 17 2): 158–167.
- Hardi EH, Nugroho RA, Isnansetyo A, Agriandini M, Kusuma IW, Sidik AS. 2019. Simultaneous Administration of *Boesenbergia pandurata* Extract and Vaccination to Stimulate Immune Response in Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Pakistan Journal Biology Science* 22 (9): 419-426.
- Harikrishnan R, Balasundaram C, Kim MC, Kim JS, Han YJ, Heo MS. 2009. Innate immune response and disease resistance in *Carassius auratus* by triherbal solvent extracts. *Fish Shellfish Immunol* 27: 508-515.

- Hastein T, Gudding R, Evensen O. 2005. Bacterial vaccines for fish an update of the current situation worldwide. *Dev Biol (Basel)* 121: 55–74.
- Hoel K, Lillehaug A. 1997. Adjuvant activity of polar glycopeptidolipids from *Mycobacterium chelonae* in experimental vaccines against *Aeromonas salmonicida* in salmonid fish. *Fish Shellfish Immunol* 7: 365–376.
- Jiao XD, Cheng S, Hu YH, Sun L. 2010a. Comparative study of the effects of aluminium adjuvants and Freund's incomplete adjuvant on the immune response to an *Edwardsiella tarda* major antigen. *Vaccine* 28: 1832–1837.
- Johnson KA, Amend DF. 1983. *Comparison of efficacy of several delivery methods using Yersinia ruckeri bacterin on rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson. J Fish Dis* 6(4): 331-336.
- Joosten PHM, Tiemersma E, Threels, Caumartin-Dhieux C, Rombout HWM. 1997. Oral vaccination of fish against *Vibrio anguillarum* using alginate microparticles. *Fish Shellfish Immunol* 5: 10
- Kato G, Kondo H, Aoki T, Hirono I. 2012. Mycobacterium bovis BCG vaccine induces non-specific immune responses in Japanese flounder against *Nocardia seriolae*. *Fish Shellfish Immunol* 7(7): 471-485.
- Kawakami H, Shinohara N, Sakai M. 1998. The non-specific stimulation and adjuvant effects of *Vibrio anguillarum* bacterin, M-glucan, chitin and Freund's complete adjuvant against *Pasteurella piscicida* infection in yellowtail. *Fish Pathol* 33: 287–292.
- LaPatra SE, Plant KP, Alcorn S, Ostland V, Winton J. 2010. An experimental vaccine against *Aeromonas hydrophila* can induce protection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis* 33: 143–151.
- Milgate J, Roberts DCK. 1995. The nutritional & biological significance of saponins. *Nutr Res* 15: 1223–1249.
- Mutoloki S, Cooper GA, Marjara IS, Koop BF, Evensen Ø. 2010. High gene expression of inflammatory markers and IL-17A correlates with severity of injection site reactions of Atlantic salmon vaccinated with oil-adjuvanted vaccines. *BMC Genomics* 27(11): 336.
- Pasnik DJ, Evans JJ, Panangala VS, Klesius PH, Shelby RA, Shoemaker CA. 2005. Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy. *Journal of Fish Diseases* 28: 205–212.
- Pasquale AD, Preiss S, de Silva FT, Garcon N. 2015. Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond. *Vaccines* 3: 320–343.
- Priyadarshini M, Manissery JK, Mohan CV, Keshavanath P. 2012. Effect of immuplus on Growth and Inflammatory Response to Freund's Complete Adjuvant in Common Carp, *Cyprinus carpio* (L.). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 12: 291-299.
- Rajput ZI, Hu S, Xiao C, Arijo AG. 2007. Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. *Journal of Zhejiang University Science B* 8(3): 153-161.
- Ribeiro C, Schijns VEJC. 2010. Immunology of vaccine adjuvants. Dalam: Davies G (ed) *Vaccine adjuvants, methods in molecular biology*. New York. Springer Science Business Media. Hlm. 1–14
- Robertsen B. 1999. Modulation of the non-specific defence of fish by structurally conserved microbial polymers. *Fish Shellfish Immunol* 9: 269–290.
- Sasaki S, Sumino K, Hamajima K, Fukushima J, Ishii N, Kawamoto S, Mohri H, Kensil CR, Okuda K. 1998. Induction of systemic and mucosal immune responses to human immunodeficiency virus type 1 by a DNA vaccine formulated with QS-21 saponin adjuvant via intramuscular and intranasal routes. *J Virol* 72: 4931–4939.
- Sauqi RY, Hardi EH, Agustina. 2016. Efikasi Vaksin Pseumulvacc® pada Budidaya Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) di Kabupaten Kutai Kartanegara. *Jurnal Ilmu Perikanan Tropis* 22(1): 30–35.
- Schijns VE. 2001. Induction and direction of immune responses by vaccine adjuvants. *Crit Rev Immunol* 21: 75–85.
- Sommerset I, Krossoy B, Biering E, Frost P. 2005. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Rev Vaccines* 4: 89–101.

- Song X, Hu S. 2009. Adjuvant activities of saponins from traditional Chinese medicinal herbs. *Vaccine* 27: 4883–4890.
- Standardisasi Nasional Indonesia. 2009. Metode Identifikasi Bakteri *Aeromonas hydrophila* secara biokimia. SNI 7303:2009.
- Stills HF. 2005. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR* 46: 280–293.
- Sun HX, Xie Y, Ye YP. 2009. Advances in saponin based adjuvants. *Vaccine* 27: 1787–1796.
- Tafalla C, Gonzalez L, Castro R, Granja AG. 2017. B cell-activating factor regulates different aspects of B cell functionality and is produced by a subset of splenic B cells in teleost fish. *Frontiers in Immunology* 8: 295–300.
- Tam KI, Roner MR. 2011. Characterization of in vivo anti-rotavirus activities of saponin extracts from *Quillaja saponaria* Molina. *Antiviral Research* 90: 231–241.
- Wang Y, Wang X, Huang J, Jun Li. 2016. Adjuvant Effect of *Quillaja saponaria* Saponin (QSS) on Protective Efficacy and Igm Generation in Turbot (*Scophthalmus maximus*) upon Immersion Vaccination. *International Journal of Molecular Sciences* 17: 325–338.
- Welch TJ, LaPatra S. 2016. Yersinia ruckeri lipopolysaccharide is necessary and sufficient for eliciting a protective immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Fish Shellfish Immunol* 49: 420–426.
- Yuliani, Hardi EH, Agustina. 2014. Efikasi Vaksin Monovalen *Aeromonas hydrophila* pada Budidaya Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Ilmu Perikanan Tropis* 20(1): 10–15.
- Zhu LY, Nie L, Zhu G, Xiang LX, Shao JZ. 2013. Advances in research of fish immune-relevant genes: a comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. *Dev Comp Immunol* 39:39–62.