



Jurnal Sains Akuakultur Tropis

Departemen Akuakultur

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan – Universitas Diponegoro

Jl. Prof. Soedarto, SH, Tembalang, Semarang 50275

Telp. (024) 7474698, Fax.: (024) 7474698

Email: sainsakuakulturtropis@gmail.com, sainsakuakulturtropis@undip.ac.id

Efektivitas dari Vaksin Inaktif *Edwardsiella tarda* Menggunakan Adjuvan Polimerik Alami dari Nanopartikel Ekstrak Biji *Salvia hispanica* L. Terhadap Kesehatan Ikan *Pangasianodon hypophthalmus*

Effectivity of Inactivated *Edwardsiella tarda* Vaccine with Natural Polymeric Adjuvant from *Salvia hispanica* L. Seed Extract Nanoparticles to Health of *Pangasianodon hypophthalmus*

Shara Jayanti^{1*}, Kartika P², Amiqatul F³, Hamdani⁴, Zayafika M⁴, Syofriani⁴, M.Evan Fauzi⁵

¹Fisheries Pathology Technic of Marine and Fisheries Polytechnic Sidoarjo

²Fish Aquaculture Technic of Marine and Fisheries Polytechnic Sidoarjo

³Fish Aquaculture Technic of Marine and Fisheries Polytechnic Jembrana

⁴Fish Aquaculture Technic of Marine and Fisheries Polytechnic AUP Pariaman

⁵Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya

* Corresponding author: sharajayanti@gmail.com

DOI: 10.14710/sat.v9i2.28552

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian vaksin *E. tarda* inaktif dengan adjuvan nanopartikel ekstrak *Salvia hispanica* L terhadap kesehatan ikan patin. Pembuatan nanopartikel kitosan - ekstrak herbal dilakukan dengan menimbang 1 gram ekstrak herbal biji *Salvia hispanica* L. dalam tabung reaksi. Adjuvan herbal dilarutkan dalam 35 mL etanol absolut dan dicampur dengan 15 ml air suling dalam gelas kimia 2000 mL, kemudian ditambahkan 100 mL larutan yang terdiri dari 0,1 gram kitosan dalam 100 ml larutan asam asetat glasial 1% ditambahkan secara bertahap. Ditambahkan larutan yang terdiri dari 0,035 gram NaTPP dalam 350 ml, sambil diaduk dengan kecepatan stabil selama 2 jam menggunakan pengaduk magnetik. Analisis ukuran partikel adalah 135,21 nm. Nilai (IC50) adjuvant nanopartikel adalah 11,2 mg/L. Hasil penelitian menunjukkan jumlah sel eritrosit paling sedikit berasal dari ikan yang diberi perlakuan E (vaksinasi dan adjuvan dengan dosis 2 IC50) dengan nilai $2,05 \times 10^6$ sel / mm³ masih dalam ambang batas normal dan jumlah leukosit paling banyak juga terdapat pada ikan E dengan nilai $6,96 \times 10^4$ sel/mm³, Hal ini ditutupi oleh persentase hematokrit terendah juga pada ikan yang diberi perlakuan E yaitu sebesar 15%. Penurunan kadar hematokrit ini menjadi indikator bahwa vaksin yang diberikan pada ikan mempunyai hubungan korelasi positif yang ditandai dengan peningkatan sel fagosit berupa monosit (5%) dan limfosit (85%) yang berarti antibodi pada ikan yang diberi perlakuan E paling optimal menghasilkan antibodi dari plasma sel limfosit B dan ikan perlakuan E memiliki nilai ABW (97.5 gram), ADG (0.43 gram/hr) and SR (97.5%). Pemberian vaksin dengan penambahan adjuvan efektif mencegah Edwardsiosis.

Keywords: Nanoparticle Adjuvant, *Salvia hispanica*.L, *Edwardsiella tarda*, *Pangasianodon hypophthalmus*

PENDAHULUAN

Edwardsiella tarda dapat menyebabkan Edwardsiellosis yang ditandai dengan terjadinya luka pada kulit yang menjalar ke daging dan menimbulkan perdarahan hingga berkembang menjadi bisul kemudian menghasilkan abses dan mengakibatkan kematian massal pada ikan air tawar maupun ikan air asin (A'yunin *et.al.*, 2020). Vaksinasi merupakan salah satu tindakan pencegahan penyakit dengan cara meningkatkan daya tahan tubuh ikan agar terhindar dari patogen dan meminimalisir penggunaan antibiotik. Beberapa jenis vaksin telah diaplikasikan pada budidaya ikan dan terbukti efektif dalam mengendalikan penyakit pada ikan (Agung, 2023). Banyak faktor yang menyebabkan respon vaksinasi yang dihasilkan tidak sesuai harapan yaitu jenis vaksin, dosis vaksin, aplikasi vaksin, dan program vaksinasi yang dilakukan (Putri, *et al.*, 2012). Tujuan utama vaksinasi adalah untuk menginduksi sistem imun protektif. Beberapa jenis vaksin telah diformulasikan dengan penambahan adjuvan (kata Latin *adjuvare*, yang berarti "membantu") yang dikombinasikan dengan antigen spesifik untuk menghasilkan respons imun yang lebih kuat. Bahan yang dapat digunakan sebagai adjuvan adalah garam mineral, produk mikroba, emulsi, saponin, sitokin, polimer, bahan herbal, nanopartikel, mikropartikel, dan liposom (George *et.al.*, 2013). Adjuvan polimer dari kitosan dapat meningkatkan respon imun terhadap vaksin dengan meningkatkan aktivasi sel imun dan merangsang produksi sitokin, sehingga memperkuat kemampuan tubuh untuk mendeteksi dan melawan agen patogen. Selain itu, adjuvan polimer juga mampu memperpanjang paparan antigen terhadap sistem imun dengan membentuk depot antigen di tempat suntikan sehingga antigen dilepaskan secara bertahap yang dapat memicu respon imun berkelanjutan dan memperpanjang *duration of action* terhadap patogen tertentu. Adjuvan berbasis polimer herbal mampu meningkatkan aktivasi sel dendritik yang berperan penting dalam pengenalan dan penyajian antigen kepada sel T, peningkatan aktivasi sel dendritik dan berbanding lurus dengan peningkatan respon imun adaptif (Jinyau *et.al.*, 2023).

Biji *Salvia hispanica* L terdiri dari komponen zat aktif seperti polifenol, antioksidan, vitamin asam lemak omega-3, mineral, dan peptida. Kandungan antioksidan dan polifenol melindungi sel beta pankreas dari inflamasi (Waseem *et al.*, 2022). Nanoteknologi menghasilkan partikel dengan ukuran 1×10^{-9} dengan skala ukuran partikel 0,1-300 nm (Winarno *et.al.*, 2010) dan nanopartikel herbal dapat meningkatkan kemampuan aktivitas antioksidan dan pelepasan obat 74 kali lebih tinggi (Dewandari *et al.*, 2013). Optimasi vaksinasi ikan dengan penambahan adjuvan telah banyak dilakukan, namun untuk adjuvan dari nanopartikel ekstrak herbal yaitu biji *Salvia hispanica* L dengan enkapsulasi menggunakan polimer kitosan belum pernah dilakukan. Tujuan penelitian ini adalah untuk melakukan optimasi dan uji efektivitas kandidat vaksin inaktif *Edwardsiella tarda* pada ikan *Pangasianodon hypophthalmus* dengan memanfaatkan adjuvan polimer alami dari nanopartikel ekstrak *Salvia hispanica* L. terhadap beberapa parameter yang berkaitan dengan kesehatan ikan seperti kondisi kesehatan fisik ikan dan profil darah ikan *Pangasianodon hypophthalmus*.

Bahan dan Metode

Bahan

Pangasianodon hypophthalmus, *Salvia hispanica* L seed, *Edwardsiella tarda*, Tryptic Soy Agar (TSA), Tryptic Soy Broth (TSB), NaTPP, TSIA, MIO, MR-VP, Chitosan, Aquadest, Acetat Acid 1%, Formaldehyde 10%, etanol 96%, Mc. Farland standard, PBS and NaCl.

Metode

Formulasi Ekstrak Nanopartikel

Menimbang 1 gram ekstrak herbal biji *Salvia hispanica* L dalam tabung reaksi. kemudian dilarutkan dalam 35 mL etanol dan dicampur dengan 15 mL akuades dalam gelas kimia 2000 mL, kemudian ditambahkan 100 mL larutan yang terdiri dari 0,1 gram kitosan dalam 100 mL larutan asam asetat glasial 1%. Selanjutnya, secara bertahap ke dalam campuran tersebut ditambahkan larutan yang terdiri dari 0,035 gram NaTPP dalam 350 ml akuades, disertai pengadukan dengan kecepatan stabil selama 2 jam dengan pengaduk magnet. Setelah semua bahan tercampur, pengadukan dilakukan kembali dengan pengaduk magnet selama kurang lebih 2 jam dengan kecepatan stabil.

DPPH (2,2 Diefenil-1-Pikrildhidrasil)

Pengamatan efek antioksidan dilakukan dengan metode DPPH free radical scavenging dan pengukuran absorbansi dilakukan dengan spektrofotometer UV-Vis pada $\lambda = 516$ nm (Simanjuntak, 2019). Pengamatan efek antioksidan diawali dengan pengujian larutan DPPH sebagai kontrol negatif. Sebanyak 4 mL larutan DPPH dipipet, disimpan selama ± 30 menit dalam ruang gelap kemudian diamati absorbansinya. Tahap selanjutnya adalah pengujian efek antioksidan nanopartikel ekstrak biji *Salvia hispanica* L. dalam berbagai konsentrasi. Sebanyak 0,5 ml nanopartikel ekstrak biji *Salvia hispanica* L. (200, 400, 600, 800, 1000 ppm) dipipet, ditambahkan 3,5 ml larutan DPPH kemudian dikocok. Campuran larutan disimpan selama 30 menit

dalam ruang gelap kemudian diamati absorbansinya. Hasil pengamatan dinyatakan dalam persentase penghambatan dengan rumus:

$$\% \text{ in } h \text{ ibisi} = \text{Abs kontrol} - \text{Abs Uji} \times 100\% \text{ (1)}$$

Uji Postulat Koch

Kultur *E. tarda* sebagai antigen utama untuk formulasi vaksin, dilakukan uji postulat Koch. Uji postulat Koch dilakukan dengan menyuntikkan setiap isolat bakteri sebanyak 0,1 mL (kepadatan 107 CFU/mL) secara intramuskular pada 25 ekor ikan lele di setiap akuarium, yang diulang sebanyak 3 kali. Pengamatan dan pencatatan dilakukan setiap hari selama 14 hari dengan memperhatikan gejala klinis eksternal dan internal.

Identifikasi Fenotipik

Pengamatan morfologi koloni dilakukan pada bakteri di media TSA. Isolat bakteri yang telah dimurnikan kemudian dikultur dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Morfologi koloni yang diamati berupa bentuk koloni dan uji biokimia, meliputi uji pewarnaan Gram, motilitas dengan media MIO, serta kemampuan fermentasi gula dengan media TSIA dan MR-VP dengan indikator Methyl Red.

Formulasi vaksin inaktif *Edwardsiella tarda*

Metode pembuatan vaksin *Edwardsiella tarda inaktif* dengan penambahan adjuvan adalah isolat bakteri *Edwardsiella tarda* dikultur dalam media cair TSB, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Pengayaan dilakukan dengan memindahkan inokulum *Edwardsiella tarda* dari media TSB ke media TSA kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Kemudian bakteri *E. tarda* dipanen dengan cara dikumpulkan dan dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer. Vaksin diinaktivasi dengan menambahkan formalin 1% kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Uji viabilitas bakteri dilakukan pada media TSA spesifik dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Apabila bakteri tidak tumbuh lagi, dilakukan pencucian formalin menggunakan PBS dengan cara disentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 30 menit. Sentrifugasi dilakukan sebanyak 3 kali, setiap kali supernatan dibuang. Kepadatan vaksin inaktif dihitung menggunakan spektrofotometer ($\lambda = 625 \text{ nm}$) yang mengacu pada standar Mc Farland. Vaksin diberikan kepada setiap ikan uji melalui metode injeksi intraperitoneal dengan dosis vaksin 0,1 ml/ikan dengan kepadatan bakteri 1012 sel/mL. kandidat vaksin tidak aktif *E. tarda* dikultur ulang pada media TSA selama 1 x 24 jam untuk memastikan tidak ada bakteri yang tumbuh pada media tersebut.

Aplikasi Vaksin *E. tarda Inaktif* dan Adjuvan Nanopartikel

Sebanyak 225 ekor ikan (*Pangasianodon hypophthalmus*) berukuran (10-12) cm dengan berat 70-90 gram yang akan digunakan dalam penelitian ini diberi perlakuan vaksin *Edwardsiella tarda inaktif* dengan adjuvan nanopartikel ekstrak biji *Salvia hispanica* L. melalui rute intraperitoneal. Setelah proses aklimatisasi dan aplikasi vaksin, dilakukan.

- A (A1, A2, A3): Ikan patin yang disuntik dengan vaksin *E. tarda yang diinaktifkan* cfu/mL dan tanpa *Salvia hispanica* . Ekstrak biji L nanopartikel adjuvant
- B (B1, B2, B3): Ikan patin yang disuntik dengan vaksin *E. tarda inaktif* cfu/mL dan *Salvia hispanica* . Adjuvan nanopartikel ekstrak biji L (1/4 IC50)
- C (C1, C2, C3): Ikan patin yang disuntik dengan vaksin *E. tarda inaktif* cfu/mL dan *Salvia hispanica* . Adjuvan nanopartikel ekstrak biji L (1/2 IC50)
- D (D1, D2, D3): Ikan patin yang disuntik dengan vaksin *E. tarda inaktif* cfu/mL dan *Salvia hispanica* . Adjuvan nanopartikel ekstrak biji L (IC50)
- E (E1, E2, E3): Ikan patin yang disuntik dengan *E. tarda inaktif* cfu/mL dan adjuvan nanopartikel ekstrak biji *Salvia hispanica* . L (2IC50)

Pengambilan Darah

Darah diambil melalui vena kaudalis menggunakan spuit 1 cc dengan ukuran jarum 26G (Reyes *et.al.*, 2018). Sebelum pengambilan darah, spuit dibilas dengan EDTA 10% sebagai antikoagulan. Posisi jarum untuk pengambilan darah adalah 45° dan ditarik perlahan hingga darah masuk ke dalam tabung. Sampel darah disimpan dalam tabung eppendorf (Maftuch., 2020). Pengambilan darah dilakukan untuk mengetahui jumlah eritrosit dan leukosit, diferensial leukosit dan hematokrit.

Analisis Data

Analisis data menggunakan Analisis Varians (ANOVA) *one way* dengan parameter sel darah merah, sel darah putih.

Periode dan Lokasi Studi

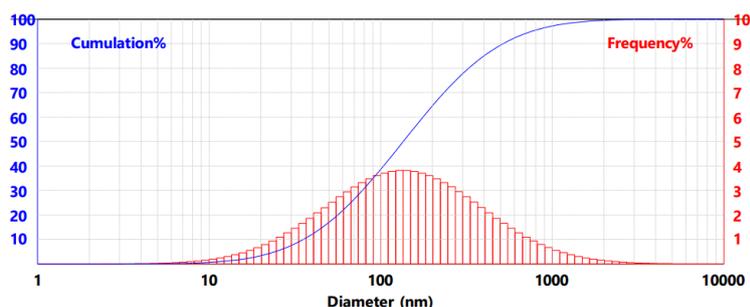
Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Patologi Ikan Politeknik Kelautan dan Perikanan Sidoarjo, Unit Layanan Penelitian Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Laboratorium Parasit FPIK Universitas Brawijaya. Penelitian ini dilaksanakan selama 7 (tujuh) bulan, yaitu Mei-November 2024.

HASIL DAN PEMBAHASAN

HASIL

Nanopartikel

Nanopartikel adalah partikel koloid dengan ukuran antara (10-1000) nm. Kesesuaian bentuk sediaan nanopartikel, diperlukan untuk memperoleh sistem yang dapat memberikan hasil terapi yang optimal (Martien *et.al.*, 2012). Beberapa hasil penelitian nanopartikel herbal menunjukkan bioavailabilitas dan sifat fungsional lainnya meningkat secara signifikan.



Gambar 1. Hasil PSA Nanopartikel biji *Salvia hispanica* L. by PSA BioBase

Hasil dari analisis ukuran partikel menunjukkan ukuran distribusi rata-rata sebesar 135,21 nm, seperti grafik pada Gambar 1. *Particle Size Analyzer* (PSA) yang digunakan pada penelitian ini adalah BioBase. Kemampuan partikel nano untuk menembus dinding sel juga lebih efisien sehingga tingkat absorpsi sediaan obat herbal dalam tubuh juga tinggi (Syukri *et.al.*, 2018). Ukuran dari suatu partikel berpengaruh terhadap target reseptor zat aktif, kelarutan obat, dan level aktivitas farmakologi suatu zat aktif (Liza *et.al.*, 2022). Kemampuan nanopartikel untuk meningkatkan disolusi disebabkan oleh fakta bahwa semakin kecil ukuran partikel suatu sediaan, maka luas permukaannya akan semakin meningkat (Sun *et.al.*, 2012). Luas permukaan yang semakin besar semakin besar juga jumlah zat aktif yang mampu diabsorpsi dalam tubuh (Amalia *et.al.*, 2020).

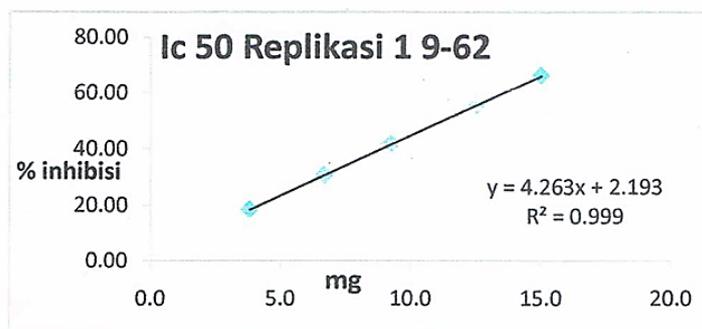
DPPH

Respon terhadap antibody yang tepat terutama Th 1 dimana sel T *helper* ini mampu melindungi organisme dari patogen intraseluler. Selain itu kitosan juga bersifat mukoadhesif yang membuatnya cocok untuk optimasi vaksin dikarenakan cepat mengangkut antigen menuju lokasi efektor imun tubuh. Ekstrak herbal sering digunakan untuk obat dan adjuvan (Woods *et.al.*, 2017).

Uji aktivitas senyawa antioksidan dengan metode DPPH dilakukan untuk mengetahui nilai IC₅₀ dari nanopartikel ekstrak biji *Salvia hispanica* L. Nilai IC₅₀ merupakan konsentrasi senyawa antioksidan yang memberikan inhibisi sebesar 50% terhadap radikal bebas DPPH. Hasil nilai absorpsi dan persen inhibisi nanopartikel ekstrak biji *Salvia hispanica* L. pada berbagai konsentrasi dapat dilihat pada Tabel 7 dan 8. Nilai persen inhibisi yang telah diperoleh selanjutnya dikonversi dalam kurva untuk mendapatkan persamaan regresi sehingga dapat ditentukan nilai IC₅₀ dari nanopartikel ekstrak biji *Salvia hispanica* L. (Gambar 6 dan 7). Berdasarkan persamaan regresi $y = 4,237x + 2,993$, nilai IC₅₀ dari ekstrak nanopartikel ekstrak biji *Salvia hispanica* L. adalah sebesar 11,2 mg/mL.

Tabel 1. Hasil Uji DPPH replikasi 1

Nomor	Konsentrasi Sampel (mg/mL)	Absorbansi Sampel	% Inhibisi
1	3,8	0,66820	18,45
2	6,7	0,56769	30,72
3	9,3	0,47596	41,91
4	12,6	0,36345	55,64
5	15,5	0,27580	66,34
IC 50 (mg)			11,2



Gambar 2. Grafik IC 50 adjuvan *Salvia hispanica*.L

Uji Postulat Koch *E. tarda*

Reinfeksi untuk pemenuhan postulat Koch dilakukan dengan injeksi bakteri hasil kultur pada ikan sehat. Uji infeksi dilakukan melalui route intraperitoneal dengan dosis 10^7 cfu/ikan pada 20 ekor ikan patin dan dipelihara selama 7 hari untuk diamati gejala klinis eksternal dan internal serta tingkat mortalitas ikan akibat penyuntikan tersebut. Ikan yang telah terindikasi penyakit dan atau sudah mati, dilakukan swab dari organ ginjal dan hepar kemudian dikultur pada media TSA.

Uji Postulat Koch dilaksanakan untuk mengetahui apakah isolate murni bakteri mampu menimbulkan patogenitas terhadap ikan patin. Hasil uji coba postulat koch menunjukkan gejala klinis eksternal, internal, dan mortalitas ikan patin. Gejala klinis pada fisik ikan patin setelah uji postulat Koch yaitu terdapat exophthalmia pada mata, haemoragi pada abdomen, posterior fin dan area mulut(oral)serta pembengkakan pada kloaka serta kematian (A'yunin *et.al.*,2020). Luka dan erosi pada bagian mulut ikan patin dan exophthalmia ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Luka dan erosi pada bagian Mulut Ikan Patin dan Exophthalmia

Formulasi dan Aplikasi Kandidat Vaksin *E. tarda* dan Adjuvan

Dilakukan pengkayaan dengan memindahkan inokulum *Edwardsiella tarda* dari media TSB ke media TSA lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Kemudian dilakukan pemanenan bakteri *E. tarda* dengan cara dikumpulkan dengan batang spreader dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer menggunakan corong. Vaksin diinaktivasi dengan penambahan formalin 1% kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Uji viabilitas bakteri dilakukan pada media spesifik TSA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Jika bakteri sudah tidak tumbuh, dilakukan pencucian formalin menggunakan PBS dengan cara disentrifuse dengan kecepatan 3500 rpm selama 30 menit. Sentrifuse dilakukan sebanyak 3 kali, setiap kali sentrifuse, supernatant dibuang. Dihitung kepadatan vaksin inaktif dengan spektrofotometer ($\lambda=625$ nm) mengacu pada standar McFarland. Vaksin diberikan pada setiap ikan uji dengan metode penyuntikan secara intraperitoneal dengan dosis pemberian vaksin 0,1 ml/ikan dengan kepadatan bakteri 10^{12} sel/mL. Aplikasi vaksin dilakukan secara intraperitoneal ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Aplikasi Vaksin *E.tarda* dan adjuvant nanopartikel ekstrak *Salvia hispanica* L.

Uji Profil Darah

Pengambilan darah ikan dilaksanakan dengan cara mengambil darah ikan pada bagian vena caudalis yang terletak di bagian ventral tulang vertebrae dengan spuit 1 cc. Darah yang sudah diambil kemudian dimasukkan dalam vacutainer 3 cc yang sudah mengandung EDTA.

Hasil Perhitungan Sel Leukosit Ikan Patin

Leukosit merupakan komponen sel darah yang berperan dalam sistem pertahanan tubuh ikan. Aplikasi imunostimulan, jumlah leukosit juga dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti umur ikan, aktivitas otot, aksitasi dan masa estras serta kondisi stress pada ikan. Jumlah leukosit dapat mengalami penurunan apabila ikan berada dalam kondisi stress (Lubis *et al.*, 2016). Jumlah leukosit dihitung dengan menggunakan haemocytometer. Sel leukosit diamati di bawah mikroskop dengan ukuran pembesaran 10x dan total leukosit dihitung pada empat kotak besar di bagian sudut kiri dan kanan atas serta pada sudut kiri dan kanan bawah (Maftuch *et al.*, 2020). Jumlah leukosit pada ikan normal adalah $2 - 5 \times 10^4$ sel/mm³. Hasil perhitungan total leukosit ikan patin sebelum perlakuan dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Total Leukosit} = \sum \text{Leukosit terhitung} \times 50 \text{ sel/mm}^3 \quad (2)$$

Tabel 2. Rata-rata jumlah Leukosit Pada Ikan Patin sel/mm³

Ikan	Dosis (adjuvant)	Minggu 1 (Awal)	Minggu 2 (H+7 Vaksin 1)	Minggu 3 (H+7 Vaksin 2)	Minggu 4 (Akhir)
A	0	$3,38 \times 10^4$	$2,50 \times 10^4$	$2,45 \times 10^4$	$2,67 \times 10^4$
B	2,79	$3,48 \times 10^4$	$2,49 \times 10^4$	$2,7 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$
C	5,58	$3,79 \times 10^4$	$2,54 \times 10^4$	$2,63 \times 10^4$	$2,94 \times 10^4$
D	11,15	$3,49 \times 10^4$	$5,90 \times 10^4$	$5,87 \times 10^4$	$6,41 \times 10^4$
E	22,3	$3,54 \times 10^4$	$6,49 \times 10^4$	$6,56 \times 10^4$	$6,96 \times 10^4$

Pada penelitian ini ikan dipelihara selama 4 minggu atau sekitar 28-30 hari. Perhitungan jumlah leukosit pada Tabel 2, dilaksanakan sebanyak 4x. Perhitungan pertama dilaksanakan pada ikan sebelum diberikan perlakuan. Perhitungan jumlah leukosit kedua dilakukan H+7 setelah perlakuan (vaksinasi pertama), kemudian dilanjutkan dengan perhitungan jumlah leukosit ketiga yaitu H+7 setelah perlakuan (vaksinasi booster kedua). Perhitungan terakhir yaitu keempat dilakukan pada minggu terakhir perlakuan H+14 setelah vaksin booster kedua. Jumlah leukosit pada ikan patin sebelum perlakuan tidak berbeda nyata, sedangkan pada H+7 setelah perlakuan pertama tepatnya di minggu ke-2, ikan yang diberikan vaksin tanpa adjuvant dan adjuvant $\frac{1}{4}$ IC50 memiliki jumlah leukosit yang tidak berbeda nyata, dan pemberian vaksin bersama adjuvant 2 IC50 memiliki jumlah leukosit yang berbeda nyata. Pada H+ 7 setelah perlakuan kedua tepatnya di minggu ke-3 menunjukkan bahwa pemberian vaksin bersama adjuvat 2 IC50 juga menunjukkan perbedaan yang signifikan lebih banyak daripada jumlah leukosit ikan perlakuan lainnya. Di minggu terakhir yaitu minggu ke-4 dapat disimpulkan bahwa ikan yang diberikan vaksin tanpa adjuvant (ikan A), ikan yang divaksin dengan dosis adjuvant $\frac{1}{4}$ IC50 (ikan B) dan $\frac{1}{2}$ IC50 (ikan C) memiliki jumlah leukosit yang tidak

berbeda nyata. Hal ini berbeda dengan ikan yang divaksin bersama dengan adjuvant IC50 dan 2 IC50 yang menunjukkan nilai jumlah leukosit yang berbeda nyata.

Leukosit memiliki banyak sekali kelompok sel seperti sel B plasma yang mampu menghasilkan antibodi sebagai hasil respon dari sistem imunitas berupa pertahanan humoral. Meningkatnya total leukosit memperlihatkan peningkatan kekebalan tubuh ikan terhadap suatu antigen. Jumlah total leukosit yang meningkat pada ikan yang divaksinasi dengan menggunakan bahan tambahan adjuvant nanopartikel ekstrak *Salvia hispanica* .L menunjukkan bahwa vaksin yang masuk ke dalam tubuh ikan akan lebih optimum untuk menstimulasi respon imun positif tubuh ikan. Hal ini sesuai dengan teori empiris dari beberapa penelitian sebelumnya yang membuktikan bahwa formulasi berbahan dasar kitosan juga telah dibuktikan dapat meningkatkan maturasi *dendritic cell* (DC), serta meningkatkan titer antibodi IgG. Kitosan dan turunannya dapat digunakan sebagai bahan pembantu nanopartikel herbal yang diformulasikan Bersama sehingga memiliki kemampuan untuk meningkatkan aktivitas antioksidan dan pelepasan obat 74 x lebih tinggi, termasuk pemberian vaksinasi didalamnya (Dewandari, *et.al.*, 2013).

Hasil Perhitungan Sel Eritrosit Ikan Patin

Jumlah eritrosit dihitung dengan hemositometer tipe Improved Neubauer. Darah terlebih dahulu diencerkan dengan larutan Hayem 200 kali pengenceran lalu di letakkan di Counting Chamber kemudian dilakukan penghitungan pada perbesaran 10X.

Jumlah butir eritrosit dihitung dengan rumus:

$$\text{Jumlah Eritrosit} = \frac{\text{Jumlah Eritrosit pada 5 Kotak Hitung} \times \text{Angka Pengenceran (200)kali}}{\text{Volum Total darah dalam lima kotak hitung (0,02)}} \quad (3)$$

Tabel 3. Jumlah Eritrosit Pada Ikan Patin

Ikan	Dosis (adjuvant)	mg/L	Minggu 1 (Awal)	Minggu 2 (H+7 Vaksin 1)	Minggu 3 (H+7 Vaksin 2)	Minggu 4(Akhir)
A	0		4,93 x 10 ⁶	4,63 x 10 ⁶	4,38 x 10 ⁶	3,90 x 10 ⁶
B	2,79		4,57 x 10 ⁶	4,19 x 10 ⁶	4,27, x 10 ⁶	3,96 x 10 ⁶
C	5,58		4,93 x 10 ⁶	4,98 x 10 ⁶	4,56 x 10 ⁶	3,80 x 10 ⁶
D	11,15		4,81 x 10 ⁶	4,61 x 10 ⁶	3,70 x 10 ⁶	2,51x 10 ⁶
E	22,3		4,79 x 10 ⁶	3,34 x 10 ⁶	3,26 x 10 ⁶	2,05 x10 ⁶

Pada penelitian ini, seperti halnya perhitungan jumlah leukosit. dimana perhitungan jumlah eritrosit juga dilakukan sebanyak 4x dan hasilnya tercantum dalam Tbel 3, dilaksanakan sebanyak 4x. Perhitungan pertama dilaksanakan pada ikan sebelum diberikan perlakuan. Perhitungan jumlah leukosit kedua dilakukan H+7 setelah perlakuan (vaksinasi pertama), kemudian dilanjutkan dengan perhitungan jumlah leukosit ketiga yaitu H+7 setelah perlakuan (vaksinasi booster kedua). Perhitungan terakhir yaitu keempat dilakukan pada minggu terakhir perlakuan H+14 setelah vaksin booster kedua. Jumlah eritrosit pada ikan patin sebelum perlakuan tidak berbeda nyata, sedangkan pada H+7 setelah perlakuan pertama tepatnya di minggu ke-2 , ikan yang diberikan vaksin tanpa adjuvant dan adjuvant ¼ IC50 memiliki jumlah eritrosit yang tidak berbeda nyata, namun berdasarkan analisa anova pemberian vaksin bersama adjuvant ½ IC50, IC50 dan 2 IC50 juga memiliki jumlah eritrosit yang tidak berbeda nyata. Pada H+ 7 setelah perlakuan kedua tepatnya di minggu ke-3 menunjukkan bahwa pemberian vaksin bersama adjuvant ½ IC50, IC50 dan 2 IC juga menunjukkan perbedaan yang signifikan sedikit jumlah eritrosit ikan daripada ikan dengan perlakuan vaksinasi tanpa adjuvant dan dengan ¼ IC50. Di minggu terakhir yaitu minggu ke-4 dapat disimpulkan bahwa ikan yang diberikan vaksin tanpa adjuvant (ikan A), ikan yang divaksin dengan dosis adjuvant ¼ IC50 (ikan B) berbeda nyata dengan jumlah eritrosit yang mendapatkan vaksinasi dan adjuvant dengan dosis ½ IC50 (ikan C), IC50 dan 2 IC50.

Jumlah eritrosit paling sedikit berasal dari ikan yang diberikan perlakuan vaksinasi dan adjuvant dengan dosis 2 IC50 yaitu dengan nilai 2,05 x 10⁶ cell/mm³. Penurunan jumlah eritrosit yang berkaitan dengan jumlah sel leukosit dan nilai total hematokrit dapat dikaitkan dengan penurunan kadar hematokrit dapat dijadikan indikator bahwa vaksin dan adjuvan yang diberikan pada ikan memiliki hubungan korelasi positif dalam peningkatan total leukosit pada tubuh ikan (Wintoko *et.al.*, 2013)

Hematokrit, dan Differensial Leukosit

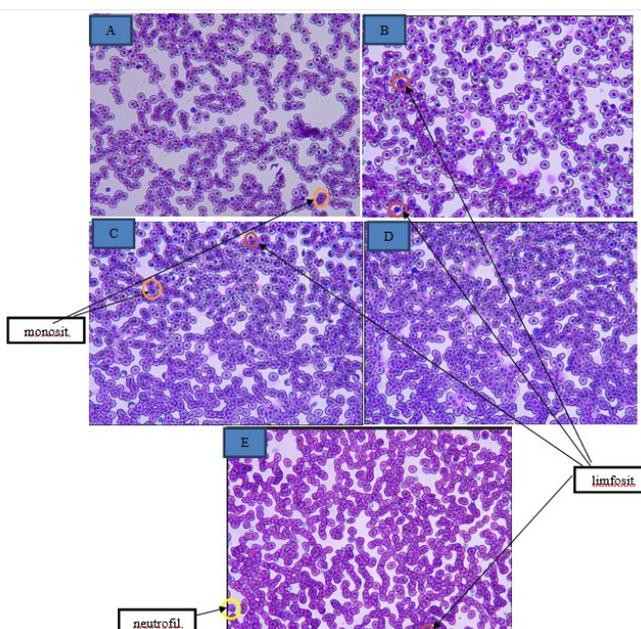
Tabel 4. Jumlah rerata Hematokrit darah ikan patin setelah perlakuan

No	Kode Sampel	Dosis adjuvant mg/L	Hematokrit (%) (awal)	Hematokrit (%) (akhir)
1.	A	0	45	42
2.	B	2,79	43	37
3.	C	5,58	44	39
4.	D	11,15	45	22
5.	E	22,3	45	15

Tabel.5 Persentase differensial sel leukosit

No.	Kode	% Limfosit	% Neutrofil	% Monosit	% Basofil	% Eosinofil
1	A	72	12	16	0	0
2	B	82	12	6	0	0
3	C	75	9	16	0	0
4	D	84	7	9	0	0
5	E	85	10	5	0	0

Persentase rata-rata nilai hematokrit pada ikan pada perlakuan E yang divaksinasi dengan adjuvant (2 IC50) sebesar 15% namun pada ikan yang divaksin tanpa adjuvant memiliki nilai hematokrit sebesar 42%. Penurunan nilai hematokrit pada ikan yang divaksinasi menunjukkan adanya perubahan fisiologis akibat vaksinasi dalam tubuh ikan. Menurunnya kadar hematokrit dapat dijadikan indikator bahwa vaksin yang diberikan pada ikan memiliki hubungan korelasi positif dalam peningkatan total leukosit pada tubuh ikan. Dalam hal ini peningkatan total leukosit akibat pemberian adjuvan, secara tidak langsung dapat meningkatkan respon imun alami yang ditandai dengan peningkatan sel fagosit berupa monosit dan limfosit (Tabel 5). Sel-sel fagosit tersebut memiliki hubungan korelasi terhadap uji titer antibodi yang telah dilakukan, yaitu sel fagosit berfungsi sebagai pengenalan antigen atau vaksin yang diberikan pada tubuh ikan. Dengan demikian sel fagosit yaitu limfosit dapat mengenali antigen, dan dapat merangsang sel memori, dan sel B untuk menghasilkan antibodi, yang peningkatannya terlihat pada reaksi aglutinasi dengan uji titer antibodi. Antibodi tidak saja meningkatkan pertahanan humoral tetapi juga pertahanan seluler sehingga hasil kerja masing-masing maupun hasil kerja antara pertahanan humoral dan seluler meningkat (Kaunang, *et al.*, 2024). Pengamatan diferensial sel leukosit dicantumkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Histopat Differensial Sel Leukosit pada ikan patin perlakuan A, B,C,D dan E pada perbesaran 400x

Leukosit dibagi atas 2 (dua) kelompok yaitu granulosit (neutrofil, eosinofil dan basofil) dan agranulosit (monosit dan limfosit). Berdasarkan hasil pemeriksaan diferensial sel leukosit didapatkan hasil bahwa terdeteksi sel limfosit dan neutrophil serta monosit. Bentuk dari ketiga sel ini berbeda sehingga dapat diidentifikasi berdasarkan morfologinya. Sel monosit merupakan sel leukosit yang paling besar dan berfungsi untuk mencerna sel sel yang rusak serta membantu sistem kekebalan tubuh. Monosit dalam melaksanakan fungsi sistem imun berperan sebagai macrophage yakni menelan dan menghancurkan sel, mikroorganisme dan benda asing yang bersifat pathogen (Moenek, *et.al.*, 2024). Neutrofil akan meningkat (neutrofilia) sebagai respon terhadap inflamasi atau infeksi (Sihombing *et al.*, 2024). Sel limfosit terdiri dari sel T dan sel B, dimana sel ini sangat berperan pada kekebalan tubuh spesifik. Sel B plasma merupakan sel yang menghasilkan antibodi. Sedangkan sel neutrophil berperan dalam fagosit (merespon secara langsung antigen yang masuk kedalam tubuh) (Prakoewa, 2020). Sel leukosit yang diproduksi akan tinggi jika terdapat infeksi pada tubuh ikan. Peningkatan jumlah leukosit ini terkait dengan kinerja sistem imun ikan dalam mereduksi antigen yang masuk. Semakin meningkatnya serangan pathogen atau antigen yang masuk maka akan semakin meningkat pula produksi leukosit dalam darah. Respon ikan terhadap stresor bergantung pada jenis stres yang dialami oleh ikan tersebut, dimana peningkatan jumlah sel darah putih, penurunan kadar hematokrit dan peningkatan neutrofil bergantung pada jenis *stress* yang dialami (Martin *et al.*, 2004).

Parameter Kesehatan Ikan

Pada penelitian ini juga dilakukan pengamatan parameter kesehatan ikan, adapun parameter yang diamati adalah ADG, ABW, serta nilai *Survival Rate* (SR).

ADG (Average Daily Growth) dan ABW (Average Body Weight)



Gambar 6. Penimbangan Bobot ikan dan pengukuran panjang tubuh ikan

Tabel 6. ABW Ikan Patin (gram) dan ADG (gram/hari) Ikan Patin

	ABW1 (gram)	ABW2 (gram)	ABW3 (gram)	ABW4 (gram)	ABW total	ADG (w1-w2)	ADG (w2-w3)	ADG (w3-w4)	ADG TOTAL (g/hr)
A	80	82	84	85	82,75	0,29	0,29	0,14	0,24
B	85	86	88	89	87	0,14	0,29	0,14	0,19
C	95	96	97	101	97,25	0,14	0,14	0,57	0,29
D	90	92	95	97	93,5	0,29	0,43	0,29	0,33
E	92	96	100	102	97,50	0,29	0,57	0,43	0,43

Pemeliharaan ikan dilakukan selama 4 minggu. *Average Body Weight* (ABW) adalah bobot rata-rata ikan hasil sampling. ABW dihitung dengan mengambil sampel ikan dan ditimbang menggunakan timbangan dan dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (Fahrurrozi *et.al.*, 2023):

ABW: bobot ikan total/jumlah ikan (4)

ADG : bobot awal-bobot akhir/jumlah hari (5)

Berdasarkan tabel 14, dapat diketahui bahwa ABW terbesar terdapat pada ikan perlakuan E dengan nilai ABW 97,50 gram kemudian disusul dengan ikan perlakuan C dengan nilai ABW sebesar 97,25 gram, ikan perlakuan D sebesar 93,5 gram, ikan B sebesar 87 gram dan terakhir ABW paling kecil dari ikan perlakuan A sebesar 82,75. Penelitian yang sudah dilakukan juga menunjukkan bahwa pertambahan berat atau bobot ikan setiap hari (ADG) dengan nilai paling besar adalah pada ikan dengan perlakuan E yaitu 0,43 gram/hari. ADG yang paling kecil adalah ikan perlakuan B yaitu 0,19 gram/hari. ADG pada ikan patin ini dapat dinyatakan normal dikarenakan terdapat pertambahan bobot ikan dan ikan dalam keadaan sehat meskipun di *challenge* dengan bakteri E. tarda dikarenakan pemberian vaksinasi serta adjuvant. Total ABW dan ADG dipengaruhi oleh kualitas pakan, performa kesehatan ikan dan tingkat *stressor* yang ada (Fahrurrozi *et.al.*, 2023).

Tabel 7 Pertambahan Panjang Tubuh dari Ikan Patin

Ikan	P1 (cm)	P2 (cm)	P3 (cm)	P4 (cm)	Pertambahan Panjang (cm/hr) (P1-P2)	Pertambah an Panjang (cm/hr) (P2-P3)	Pertambahan Panjang (cm/hr) (P3-P4)	Pertambahan Panjang Total (cm/hr)
A	22	22,1	22,4	22,5	0,01	0,04	0,01	0,02
B	23	23,2	23,5	23,8	0,03	0,04	0,04	0,04
C	21,5	21,8	22,1	22,6	0,04	0,04	0,07	0,05
D	22	22,3	22,8	23	0,04	0,07	0,03	0,05
E	22,2	22,8	23,1	23,5	0,09	0,04	0,06	0,06

Ket : P = rata – rata panjang ikan patin setiap minggu

Pemeliharaan ikan dilakukan selama 4 minggu. Pertumbuhan Panjang ikan rata-rata hasil sampling dilakukan setiap minggu selama masa pemeliharaan. Pertambahan panjang dihitung dengan mengambil sampel ikan dan diukur panjangnya menggunakan penggaris. Pertumbuhan Panjang ikan harian paling optimum berada pada ikan perlakuan E yaitu 0,06 cm/hari, disusul dengan ikan perlakuan C dan B yaitu dengan pertambahan Panjang 0,05 cm/hari, ikan perlakuan B dengan nilai 0,04 cm/hari dan terakhir pada ikan A yaitu 0,02 cm/hari. Pertambahan Panjang ikan berbanding lurus dengan nilai ABW dan ADG pada tabel 14. Pada awal pertumbuhannya, pertumbuhan panjang lebih cepat dibandingkan pertambahan bobot, dan sebaliknya setelah ukuran dewasa pertambahan bobot lebih cepat dari pertambahan panjangnya. Perbedaan sifat pertumbuhan ini disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya ketersediaan pakan, jenis kelamin, umur, sifat genetik, kualitas perairan, dan ketahanan terhadap penyakit. Pertumbuhan dapat dilihat dari perubahan bobot tubuh dan ukuran panjang total ikan nila. Semakin banyak makanan yang diserap oleh ikan pertumbuhan ikan semakin tinggi, Pertumbuhan merupakan perubahan ukuran ikan baik dalam berat, panjang maupun volume selama periode waktu tertentu yang disebabkan oleh perubahan jaringan akibat pembelahan sel otot dan tulang yang merupakan bagian terbesar dari tubuh ikan sehingga menyebabkan penambahan bobot ikan (Hudoyo, *et al.*, 2018).

Survival Rate (%)

Derajat Kelangsungan hidup/*survival rate* merupakan presentase dari jumlah ikan yang hidup dan jumlah ikan yang hidup dan jumlah ikan pada akhir penelitian (Madinawati, dkk, 2011). Rumus perhitungan *Survival Rate* (SR) adalah :

$$SR = (Nt/N0) \times 100\% \text{ (6)}$$

Keterangan:

SR (Survival Rate): Kelangsungan Hidup (%)

Nt : jumlah ikan akhir penelitian (ekor)

N0 : jumlah ikan awal penelitian (ekor).

Tabel 8. Survival Rate (%) Ikan Patin Selama 4 minggu

	Minggu 1 (Awal)	Minggu 2	Minggu 3	Minggu 4 (Akhir)	SR (%)
A	40	35	32	28	90
B	40	38	36	34	90
C	40	40	37	36	92,5
D	40	40	39	36	95
E	40	40	40	39	97,5

Berdasarkan hasil penelitian yang sudah dilakukan, dapat diketahui bahwa nilai survival rate (%) ikan yang divaksinasi nilai SR >75%. Nilai SR tinggi menunjukkan bahwa ikan dalam keadaan sehat dan vaksinasi dinyatakan protektif terhadap infeksi antigen.

Kesimpulan

Hasil analisis ukuran partikel menunjukkan rata-rata ukuran distribusi sebesar 135,21 nm. Hasil nilai absorbansi DPPH nanopartikel ekstrak biji *Salvia hispanica* L. memiliki nilai persentase penghambatan yang dapat ditentukan dengan nilai IC50 sebesar 11,2 mg/L. Pada pemeriksaan darah ikan lele jumlah eritrosit dapat disimpulkan bahwa ikan dengan jumlah eritrosit paling sedikit berasal dari ikan yang diberi perlakuan E (vaksinasi dan adjuvan dengan dosis 2 IC50) dengan nilai sebesar $2,05 \times 10^6$ sel/mm³ namun masih dalam ambang batas normal dan dalam hal ini berbanding terbalik dengan jumlah leukosit dimana jumlah leukosit terbanyak juga terdapat pada ikan E dengan nilai sebesar $6,9^6 \times 10^4$ sel/mm³ hal ini berkorelasi dengan persentase hematokrit terendah juga pada ikan yang diberi perlakuan E yaitu sebesar 15%. Penurunan kadar hematokrit dapat dijadikan indikator bahwa vaksin yang diberikan pada ikan memiliki korelasi positif dalam meningkatkan total leukosit akibat pemberian dengan adjuvan karena secara tidak langsung dapat meningkatkan respon imun alamiah yang ditandai dengan peningkatan sel fagosit berupa monosit (5%) dan limfosit (85%) yang berarti antibodi pada ikan dengan perlakuan E paling optimal karena antibodi diproduksi oleh sel plasma limfosit B. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan vaksinasi dengan penambahan adjuvan pada dosis 2 IC50 (22,3 mg/L) mampu mengoptimalkan keseluruhan vaksin *Edwardsiella tarda* inaktif karena hal ini dibuktikan pula dengan uji titer antibodi dimana ikan dengan perlakuan E memiliki nilai $2 \log 11$ yang berarti nilai titer antibodi sebesar 11. Semakin tinggi nilai titer antibodi maka semakin protektif terhadap infeksi antigen tertentu. Pada pemeriksaan kesehatan ikan, ikan dengan perlakuan E mempunyai nilai ADG, ABW dan SR terbaik dengan nilai ABW (97,5 gram), ADG (0,43 gram/jam) dan SR (97,5%). Pemberian vaksin dengan penambahan adjuvan efektif mencegah *Edwardsiosis*, diharapkan untuk penelitian selanjutnya mampu memproduksi produk vaksin beradjuvan secara legal, bersertifikat dan siap edar.

Ucapan Terimakasih

Penelitian ini telah disetujui dan didanai oleh Pusat Pendidikan Kementerian Kelautan dan Perikanan pada tahun 2024. Kami mengucapkan terima kasih kepada BIMA KKP 2024 yang telah mendukung penelitian kami..

Daftar Pustaka

- Lukman A A.2023. Vaksinasi Ikan Sebagai Upaya Peningkatan Kekebalan Tubuh Pada Ikan.Jurnal Inovasi Penelitian.Vol.3 (8): 7263-7270.
- Amalia, R. F., Purwaningsih, H., Susanti, D., & Pratiwi, V. M. (2020). Analisis Pengaruh Rasio Pelarut Etanol Terhadap Kinerja Nanopartikel Silika Mesopori dari Sekam Padi sebagai Material Pengantar Obat. Jurnal Teknik ITS, 9(1), F66–F71
- A'yunin, Q., Budianto, Sri A., dan Dwi CP 2020. Analisis Kondisi Kesehatan Ikan Patin *Pangasius sp.* yang Terinfeksi Bakteri *Edwardsiella tarda*, *Jurnal Budidaya Perairan dan Kesehatan Ikan* , Vol 9 (2): 164-172.
- Devi Y.J.A. Moenek, Aven B. Oematan dan Novianti N. Toelle.2024. Total Leukosit dan Diferensial Leukosit Darah Ayam Kampung yang Terpapar *Ascaridia galli* Secara Alami.Jurnal Partner Politeknik Pertanian Negeri Kupang, Vol 24 (2), halaman 991 – 997.
- Dwi D. P., Agung A C, Zairiful.2012. Waktu Vaksinasi Avian Influenza (AI) yang Tepat untuk Menghasilkan Respon Immunologis Protektif pada Ayam Ras Pedaging. Jurnal Penelitian Pertanian Terapan, Vol 12(3):150-155.
- Flora Ramona Prakoeswa.2020. Peranan Sel Limfosit Dalam Immunologi. Jurnal Sains Kesehatan.Vol. 2 No. 4:525-537.
- Fredi Wintoko, Agus Setyawan, Siti Hudaidah dan Mahrus Ali.2013. Immunogenitas Heat Killed Vaksin Inaktif *Aeromonas salmonicida* Pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). e-Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan Volume II No 1 Oktober 2013 ISSN: 2302-3600.
- Jenny Ria Sihombing, Helena Rugun Nauli Nainggolan, Nathalia Elizabeth Rouli Sipahutar, Sarah Elisabet Siagian.2024. Karakteristik Hitung Jumlah Sel Leukosit Pasien Demam Tifoid yang Dirawat di RSU Martha Friska Multatuli Medan. Manuju: Malahayati Nursing Journal, Vol. 6 (6) : 2374-2382.
- Kun Tanti Dewandari, Sri Yuliani. dan Yasni Sedarnawati. 2013. Ekstraksi dan Karakterisasi Nanopartikel Ekstrak Sirih Merah. J Pascapanen.Vol 10 (2):58-71
- Liu Jinyao, Pan Chao, Wang Lu, Zhang M, Li Juanjuan, Liu Jinqiu.2023. *In Situ* Polymerization-Mediated

- Antigen Presentation. Journal of the American Chemical Society.ACS Publication.
- Liza, J., Sinka, D., Nemes, D., Ujhelyi, Z., Judit, V., Fenyvesi, F., & Gyöngyösi, A. (2022). Self- Nano and Microemulsifying Drug Delivery Systems Containing Curcumin.
- Maftuch, Farida M., Henny S., Jauharotul A., dan Muhammad A. A. 2020. Effect of Giving Crude Extract of Stink Bean Pod (*Parkia Speciosa*) on the Hematology of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Infected with *Pseudomonas aeruginosa* Bacteria. International Journal of Scientific & Technology Research.Vol 9(2): 4933 – 4938.
- Martien, R., Adhyatmika, A., Irianto, I. D. K., Farida, V., & Sari, D. P. (2012). Perkembangan teknologi nanopartikel sebagai sistem penghantaran obat. Majalah Farmaseutik, 8(1), 133–144
- Martin ML, Namura DT, Miyazaki DM, Pilarsky F, Ribero K, De Castro MP, dan De Campos CM. 2004. Physiological and haematological respons of *Oreochromis niloticus* exposed to single and consecutive Buletin Veteriner Udayana Vol. 6 No. 1:449-456.
- Muhammad D. H. S, Haeruddin, Siti R.2018. Length - Weight Relation of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Growing Medium with Addition Enzyme EZ-plus (Laboratory Scale). JOURNAL OF MAQUARES Volume 7, Nomor 1, Tahun 2018, Halaman 150-156.
- Mutwiri George, Babiuk L.A, Awate S. 2013. Adjuvant Mechanism of Action.Frontiers in Immunology.National Center for Biotechnology Information. PMC PubMed Central. doi: 10.3389/fimmu.2013.00114. PMID: 23720661; PMCID: PMC3655441.
- N.Woods, K. Niwasabutra, Natural Vaccine Adjuvants and Immunopotentiators Derived From Plants, Fungi, Marine Mutwiri George, Babiuk L.A, Awate S. Adjuvant Mechanism of Action.Frontiers in Immunology.National Center for Biotechnology Information. PMC PubMed Central.
- Nauval Gibran Lubis, Sugito, Zuhrahwati, Zuraidawati, Nuzul Asmilia, Hmny, Ummu Balqis.2016.Jurnal Medika Veterinaria.Vol.10 (1):31:33.
- Reyes, A. T. dan Nikko C.A. 2018. White Blood Cell Response of Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus* L.) to Single, Double, and Multiple Bacterial Infections. Adv Pharmacol Clin Trials. 3(5): 1 – 12.
- Syukri, Martien, R., Lukitaningsih, E., & Nugroho, A. E. (2018). Novel Self-Nano Emulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) of andrographolide isolated from *Andrographis paniculata* Nees: Characterization, in-vitro and in-vivo assessment. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 47, 514–520.
- Sun, J., Wang, F., Sui, Y., She, Z., Zhai, W., Wang, C., & Deng, Y. (2012). Effect of particle size on solubility, dissolution rate, and oral bioavailability: evaluation using coenzyme Q10 as naked nanocrystals. International journal of nanomedicine, 5733–5744
- Waseem Khalid, Arshad MS, Aziz A, Rahim MA, Qaisrani TB, Afzal F, Ali A, Ranjha MMAN, Khalid MZ, Anjum FM. 2022. Chia seeds (*Salvia hispanica* L.): A therapeutic weapon in metabolic disorders. Food Sci Nutr. 2022 Dec 15;11(1):3-16. doi: 10.1002/fsn3.3035. PMID: 36655089; PMCID: PMC9834868.
- Winarno, F.G. and Fernandez, I.E. 2010. Nanoteknologi Bagi Industri Pangan dan Kemasan. Bogor: Mbrion Press.
- Wulan Pingkan Julia Kaunang, Alexandra Manginsihi, Anjel Mona Nelwan, Syania Aditia Monintja.2024.Antibodi.Buku Ajar Mata Kuliah Dasar Biomedik III. Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Sam Ratulangi Manado.Vol 1(1) : 1-12