

Pengaruh Nanovaksin Berbasis Nanopartikel *Hybrid Chitosan* pada Sel Darah Ikan Kerapu Cantang yang Diinfeksi VNN

(The Effect of a Chitosan Hybrid Nanoparticle-based Nanovaccine on the Blood Cells of Cantang Grouper Infected with VNN)

Gian Suryanatha Hartawan¹, Uun Yanuhaar^{2*}, Muhammad Musa², Heru Suryanto³, Gunanti Mahasri⁴, Apri Supii⁵, Nico Rahman Caesar⁶

(Diterima Maret 2023/Disetujui Agustus 2023)

ABSTRAK

Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.) adalah salah satu spesies ikan kerapu bernilai ekonomi tinggi dan telah banyak dibudidayakan. Permasalahan penyakit *Viral nervous necrosis* (VNN) yang disebabkan oleh infeksi *Betanodavirus* dapat menyebabkan kejadian kematian massal bagi ikan kerapu cantang. Tindakan pencegahan yang dianggap efektif untuk mencegah penyakit VNN adalah melalui tindakan vaksinasi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian nanovaksin rekombinan protein *Chlorella vulgaris* berbasis nanopartikel *Hybrid chitosan* dalam meningkatkan respons imunitas ikan kerapu cantang yang diinfeksi VNN. Penelitian ini terdiri atas lima perlakuan yang terdiri atas K+ (Ikan kerapu cantang terinfeksi VNN), K- (Ikan kerapu cantang sehat), T1 (Ikan kerapu cantang sehat yang diberi nanovaksin 33 µl kemudian diuji tantang VNN), T2 (Ikan kerapu cantang sehat yang diberi nanovaksin 66 µl kemudian diuji tantang VNN), dan T3 (Ikan kerapu cantang sehat yang diberi nanovaksin 112 µl kemudian diuji tantang VNN). Parameter yang diamati adalah hematologi, tingkat *Relative percentage survival* (RPS) nanovaksin dan tingkat *Survival rate* (SR). Hasil penelitian didapatkan bahwa pemberian nanovaksin mampu meningkatkan respons imunitas ikan yang ditunjukkan dengan peningkatan respons hematologi, RPS, dan SR ikan kerapu cantang dibandingkan perlakuan tanpa pemberian nanovaksin. Dosis terbaik pemberian nanovaksin pada penelitian ini adalah 33 µl.

Kata kunci: nanovaksin, penyakit ikan, Virus, *C. vulgaris*, ikan kerapu

ABSTRACT

Cantang grouper (*Epinephelus* sp.) is a fish with a high economic value and has been widely cultivated. VNN disease, caused by *Betanodavirus* infection, can lead to mass mortality of cantang grouper. Precautions considered effective in preventing *Viral nervous necrosis* (VNN) disease include vaccination. This study aimed to determine the effect of administering recombinant *Chlorella vulgaris* protein nanovaccine based on chitosan hybrid nanoparticles in increasing the immune response of cantang grouper infected with VNN. The study consisted of five treatments: K+ (cantang grouper infected with VNN), K- (healthy cantang grouper), T1 (healthy cantang grouper given 33 µl of nanovaccine and then challenged with VNN), T2 (healthy cantang grouper given 66 µl of nanovaccine and then tested with a VNN challenge), and T3 (healthy cantang grouper given 112 µl of nanovaccine and then tested with a VNN challenge). The parameters observed were haematology, nanovaccine *Relative percent survival* (RPS), and *Survival rate* (SR) levels. The study results showed that administering the nanovaccine increased the immune response of the fish, as indicated by an increase in haematology response, RPS, and SR in cantang grouper compared to the treatment without nanovaccine administration. The best dose of nanovaccine in this study is 33 µl.

Keywords: fish disease, nanovaccines, virus, *C. vulgaris*, grouper

PENDAHULUAN

Ikan kerapu cantang (*Epinephelus* sp.) merupakan jenis ikan kerapu hibrida (persilangan antara ikan kerapu macan betina dan kerapu kertang jantan) yang telah banyak dibudidayakan oleh masyarakat karena mempunyai peluang pasar yang besar, nilai ekonomis yang tinggi, performa pertumbuhan, dan sistem imunitas yang lebih baik dibandingkan induknya (Rochmad 2020; Ollin *et al.* 2021). Seiring dengan perkembangan budi daya ikan kerapu cantang, permasalahan penyakit infeksius masih sering ditemukan. Menurut Khumaidi *et al.* (2019), penyakit *Viral nervous necrosis*

¹ Program Magister Budidaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Jl. Veteran No.16, Malang 65145

² Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Jl. Veteran No.16, Malang 65145

³ Fakultas Teknik, Universitas Negeri Malang, Jl. Semarang No.5, Malang, 65145

⁴ Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga Kampus C, Jl. Dr.Ir. H. Soekarno, Surabaya 60115

⁵ Research Center of Marine and Land Biotechnology, National Research and Innovation Agency Indonesia, Malaka, Pemenang, Lombok Utara 83352

⁶ Program Doktor Ilmu Lingkungan, Sekolah Pascasarjana, Universitas Brawijaya, Jl. MT. Haryono No.169, Malang 65145

* Penulis Korespondensi: E-mail: doktoruun@ub.ac.id

(VNN) merupakan penyakit viral yang dapat menyebabkan kematian massal pada ikan kerapu cantang. VNN disebabkan oleh infeksi *Betanodavirus* yang menyebabkan gangguan pada sistem saraf, retina mata hingga berbagai organ pada tubuh ikan. Kasus VNN pada ikan kerapu dilaporkan terjadi pada semua stadia siklus hidup ikan kerapu dengan tingkat mortalitas mencapai 100% (Sulistiyono *et al.* 2020; Yanuhar *et al.* 2021).

Tindakan pencegahan penyakit VNN pada ikan kerapu cantang dapat dilaksanakan melalui pemberian vaksinasi. Vaksinasi menjadi salah satu cara yang efektif dalam mengendalikan infeksi VNN melalui peningkatan respons imunitas tubuh ikan dan mampu memberikan proteksi lebih lama terhadap VNN (Hazreen-Nita *et al.* 2019; Ma *et al.* 2019). Vaksin rekombinan menjadi salah satu jenis vaksin yang telah dikembangkan untuk mencegah penyakit VNN, seperti pemanfaatan gen kapsid *Nodavirus* (Vimal *et al.* 2014), kapsid VNN isolat Indonesia (Mahardika *et al.* 2019), dan vaksin rekombinan protein peridinin klorofil *Chlorella vulgaris* (Yanuhar *et al.* 2020 Hak Cipta No. EC00202054834). Protein peridinin klorofil *Chlorella vulgaris* memiliki kemampuan untuk meningkatkan kinerja protein β -actin dan reseptor MHC pada sistem imunitas tubuh ikan (Yanuhar *et al.* 2020).

Kelemahan vaksin rekombinan protein adalah material vaksin mudah terdegradasi di dalam tubuh dan induksi respons imunitas yang pendek. Untuk mengurangi kelemahan ini, pemanfaatan material *adjuvant* hingga pengembangan nanovaksin dapat dilaksanakan. Nanovaksin merupakan vaksin yang dikembangkan dengan memanfaatkan nanopartikel sebagai bahan transport vaksin dan *Immunostimulatory agents* (Maina *et al.* 2020; Celis-Giraldo *et al.* 2021). Salah satu nanopartikel yang telah dimanfaatkan dalam pengembangan vaksin adalah *Chitosan*. *Chitosan* merupakan polimer karbohidrat alami yang diperoleh dari *Chitin* eksoskeleton krustasea maupun insekta yang telah termodifikasi melalui pemisahan grup *acetyl* (Gong *et al.* 2022).

Chitosan dalam pengembangan vaksin dimanfaatkan sebagai bahan *adjuvant* dan sebagai pengirim material vaksin yang dipengaruhi oleh sifat *Chitosan* yang *biodegradable*, biokompatibel, mampu melewati ruang antarsel untuk menuju organ target, dan efektif dalam mengikat material vaksin. *Chitosan* telah dimanfaatkan sebagai material pengantar bahan vaksin ikan dengan kemampuan untuk meningkatkan stimulasi respons imunitas *adaptive* dan mampu meningkatkan imunitas *mucosal* ikan (Vinay *et al.* 2018). Penelitian ini bertujuan untuk memahami pengaruh pemberian nanovaksin rekombinan protein *Chlorella vulgaris* berbasis nanopartikel *hybrid chitosan* dalam meningkatkan respons imunitas ikan kerapu cantang yang diinfeksi VNN yang diamati parameter hematologi, tingkat level proteksi relatif (RPS), dan *Survival rate* (SR).

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2022–Februari 2023 di Laboratorium Demplot Pengujian Nanovaksin Riset Kolaborasi Indonesia, Laboratorium Genetika Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang, dan Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Hasil Perikanan Surabaya I, Surabaya.

Desain Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental dan rancangan percobaan penelitian rancangan acak lengkap (RAL). Penelitian ini terdiri atas 5 perlakuan dan 3 ulangan yang terdiri atas: K + (Terinfeksi VNN), K- (Sehat), T1 (Dosis nanovaksin rekombinan protein *C. vulgaris* berbasis nanopartikel hybrid chitosan 33 μ l dan diuji tantang VNN), T2 (Dosis nanovaksin rekombinan protein *C. vulgaris* berbasis nanopartikel hybrid chitosan 66 μ l dan diuji tantang VNN), dan T3 (Dosis nanovaksin rekombinan protein *C. vulgaris* berbasis nanopartikel hybrid chitosan 112 μ l dan diuji tantang VNN).

Ikan kerapu cantang (*Epinephelus* sp.) yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 225 ekor berukuran \pm 10–15 cm yang berasal dari Teluk Kode, Malaka, Kabupaten Lombok Utara, Nusa Tenggara Barat. Ikan dipelihara pada bak plastik berukuran 40 L dengan masing-masing perlakuan berisi 15 ekor ikan dan diaklimatisasi ketika ikan pertama tiba di laboratorium. *Viral nervous necrosis* (VNN) yang digunakan pada penelitian berasal dari ikan yang telah dinyatakan positif terinfeksi VNN dan terkonfirmasi melalui pemeriksaan metode PCR yang diperoleh dari BKIPM Surabaya I. Penelitian dilaksanakan selama 28 hari dengan parameter yang diuji terdiri atas parameter hematologi (total eritrosit dan total leukosit), diferensial leukosit, *Relative percentage survival* (RPS), dan *Survival rate* (SR).

Produksi Nanovaksin Rekombinan *Chlorella vulgaris* Berbasis Nanopartikel Hybrid Chitosan

Produksi nanovaksin rekombinan protein *C. vulgaris* berdasarkan penelitian Yanuhar *et al.* (2020) dengan modifikasi. Produksi nanovaksin rekombinan diawali dengan *screening* disertai identifikasi sampel *Chlorella vulgaris* yang berasal dari perairan Situbondo, Jawa Timur. Mikroalga yang telah diperoleh, kemudian dikultur pada skala laboratorium dan massal dengan kapasitas 500–1500 L yang kemudian dilanjutkan dengan isolasi pigmen peridinin klorofil (70 kDa). Protein yang telah diperoleh, kemudian diperbanyak dengan teknik *cloning* dengan mentransformasikan protein pada bakteri *E. coli* vector pTA2 yang ditumbuhkan pada media yang sesuai. Deteksi gen vaksin rekombinan dilakukan dengan metode RT-PCR dengan primer T3 (3'-CTTTAGTGA GGGTTAAT-5') dan T7 Promoter (3'-TAATACGACTCACTATAGGG-5').

Pembuatan nanopartikel *chitosan* memanfaatkan larutan kitosan polimer yang mengacu pada Izaguirre-Hernández *et al.* (2017). *Chitosan* sebanyak 2 mg/mL dicampur dengan asam asetat 0,175% yang kemudian dihomogenisasi dengan *magnetic stirrer*. Larutan *chitosan* dibuat volume 50 mL yang kemudian dimasukkan ke dalam *beaker glass* dan ditambahkan dengan 35 mL larutan TPP konsentrasi 1 mg/mL secara perlahan-lahan untuk membentuk suspensi nanopartikel. Larutan dihomogenisasi dengan *magnetic stirrer* selama 1 jam dan disentrifugasi selama 30 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Suspensi nanopartikel diambil dan ditambahkan *ultrapure water* dan nanopartikel disimpan pada suhu sekitar 4°C atau suhu *Frozen*.

Vaksin rekombinan yang telah diperoleh, kemudian diformulasi dengan nanopartikel *chitosan* untuk formulasi nanovaksin. Formulasi komposisi bahan vaksin rekombinan *C. vulgaris* dengan nanopartikel adalah 1: 0,25. Selanjutnya melakukan homogenisasi selama 1 jam menggunakan *magnetic stirrer*. Perbandingan ini diperoleh dari perhitungan dosis vaksin yang akan diberikan pada ikan kerapu, yaitu 33 µl, 66 µl, dan 112 µl (Yanuhar *et al.* 2020; Sukkarun *et al.* 2022).

Uji *In-Vivo* Nanovaksin Rekombinan Protein *Chlorella vulgaris*

Uji *in-vivo* nanovaksin pada ikan kerapu cantang dilakukan melalui metode oral dengan teknik sonde yang dilakukan sebanyak 2 kali pada hari ke-0 dan *booster* vaksin pada hari ke-7. Uji tantang VNN pada penelitian ini dilakukan sebanyak 3 kali pada hari ke-3, 5, dan 9 melalui pemberian pakan pelet yang telah dicampur dengan potongan daging ikan yang positif terinfeksi VNN.

Pengambilan Darah Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.)

Pengambilan darah pada ikan kerapu cantang dilakukan untuk pemeriksaan hematologi ikan. Metode pengambilan darah pada penelitian ini mengacu pada Yanuhar *et al.* (2020). Pengambilan darah dilakukan sebanyak 5 kali pada hari ke-0, 7, 14, 21, dan 28. Area pengambilan darah terdapat pada *musculus* di dekat *anal-fin* yang kemudian disimpan di dalam tabung *vacutainer* ungu EDTA 3 mL (Onemed, Indonesia).

Pengukuran Eritrosit dan Leukosit Ikan Kerapu Cantang

Jumlah total eritrosit dan total leukosit pada penelitian ini dihitung menggunakan *Haemocytometer Neubauer* (Assistant, Germany) yang mengacu pada metode Alipin dan Sari (2020). Perhitungan jumlah eritrosit dilakukan dengan menghisap darah yang telah diperoleh menggunakan pipet thoma sampai skala 0,5 yang kemudian ditambahkan larutan Ht hingga skala 101, kemudian dilakukan homogenisasi selama 3–5 menit. Cairan pertama dan kedua dibuang, selanjutnya diteteskan pada *Haemocytometer* yang kemudian ditutup *cover glass*. Jumlah sel eritrosit dihitung

menggunakan mikroskop perbesaran 400x. Rumus perhitungan eritrosit:

$$\sum \text{eritrosit: } \sum \text{eritrosit yang terdapat pada 80 kotak kecil} \times 10^4 \text{ sel / mm}^3$$

Perhitungan jumlah leukosit menggunakan *Haemocytometer* dengan cara darah sampel dihisap menggunakan pipet thoma hingga skala 0,5 yang kemudian ditambahkan dengan larutan Turk mencapai skala 11 dan dihomogenisasi selama 5 menit. Dua tetes pertama dalam pipet dibuang dan larutan diteteskan pada *Haemocytometer* dan ditutup *cover glass*. Perhitungan jumlah sel leukosit dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x dan dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\sum \text{leukosit: } \sum \text{leukosit pada 64 kotak} \times 50 \text{ sel/mm}^3$$

Kadar Hemoglobin (Hb)

Perhitungan kadar hemoglobin pada penelitian ini menggunakan metode Sahli (Haemometer Marwa, Pakistan). Tabung sahinometer diisi dengan HCl 0,1 N hingga skala 10. Darah ikan diambil dengan pipet hingga skala 20 mm³ serta dihomogenisasi. Akuades ditambahkan pada tabung hingga warna berubah seperti warna standar (g/dL) (Sudirman *et al.* 2021).

Diferensial Leukosit

Perhitungan diferensial leukosit pada darah ikan kerapu cantang dilaksanakan dengan pembuatan ulas darah menggunakan pewarnaan giemsa. Darah diteteskan pada *object glass* dan dibuat ulas darah. Ulasan darah yang telah dibuat dikeringkan dan difiksasi dengan larutan *methanol* (Sigma-Aldrich, USA) selama 5 menit. Preparat diwarnai dengan pewarna Giemsa (Sigma-Aldrich, USA) selama ±30 menit, kemudian dikeringkan dan dibilas dengan akuades. Preparat ulas darah diamati dengan mikroskop (Olympus CX23, Jepang) perbesaran 400x untuk mengamati limfosit, monosit, dan *neutrophil* (Widyaningrum *et al.* 2017). Persentase sel limfosit, monosit, dan *neutrophil* dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Persentase sel (\%): } \sum \text{Jumlah sel} \times 100$$

Tingkat *Relative Percentage Survival* (RPS) dan *Survival rate* (SR)

Nilai RPS dan SR dihitung berdasarkan rumus yang mengacu pada Zhang *et al.* (2017) dan Ashfaq *et al.* (2019):

$$\begin{aligned} \text{RPS(\%)} &: (1 - (\% \text{ mortalitas ikan yang divaksin}) / (\% \text{ mortalitas ikan kontrol})) \times 100 \\ \text{SR (\%)} &: \text{Jumlah ikan pada akhir penelitian} / \text{jumlah ikan pada awal penelitian} \times 100 \end{aligned}$$

Pengukuran Kualitas Air

Pengukuran kualitas air dilakukan setiap hari. Parameter kualitas air yang diukur ialah suhu, pH, salinitas, dan kadar oksigen terlarut (DO). Selain itu, kotoran yang berada di dasar wadah pemeliharaan dibersihkan setiap hari.

Analisis Data

Data total eritrosit, kadar hemoglobin, total leukosit, dan diferensial leukosit yang telah diperoleh, kemudian dianalisis dengan uji ANOVA. Untuk mengetahui pengaruh pada setiap perlakuan, dilakukan uji lanjut dengan uji LSD (*Least Significance Different*) dan Duncan pada taraf 5%. Analisis data RPS dan SR pada penelitian ini diperoleh berdasarkan perhitungan rumus SR dan RPS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perhitungan Total Eritrosit

Perhitungan rata-rata eritrosit ikan kerapu cantang (Tabel 1) selama 28 hari berkisar antara $1,94-2,25 \times 10^6$ sel/mm³. Hasil analisis statistik menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$), yakni perlakuan pemberian nanovaksin rekombinan protein *Chlorella vulgaris* berbasis nanopartikel *hybrid chitosan* memiliki total eritrosit yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan tanpa pemberian nanovaksin dengan total eritrosit tertinggi terdapat pada perlakuan T1 ($2,25 \times 10^6$ sel/mm³) yang diberi nanovaksin dosis 33 µl. Rata-rata eritrosit ikan kerapu cantang pada penelitian ini masuk dalam kategori rentang normal. Menurut Yuhana *et al.* (2019), rata-rata eritrosit ikan kerapu adalah $1,05 \times 10^6-3 \times 10^6$ sel/mm³.

Pemberian nanovaksin rekombinan *C. vulgaris* berbasis nanopartikel *hybrid chitosan* mampu meningkatkan rata-rata eritrosit yang dipengaruhi oleh

peningkatan respons imunitas. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Junirahma dan Yanuher (2020) bahwa vaksin rekombinan *C. vulgaris* memiliki kemampuan dalam meningkatkan respons sistem imunitas ikan yang disertai peningkatan jumlah eritrosit yang dimiliki oleh ikan. Pengukuran eritrosit pada perlakuan nanovaksin menunjukkan adanya peningkatan pada hari ke-21 dan hari ke-28 yang dipengaruhi respons fisiologis tubuh untuk menggantikan eritrosit yang lisis akibat infeksi VNN. Menurut Yuhana *et al.* (2019), peningkatan rata-rata eritrosit berhubungan dengan proses homeostatis tubuh ikan untuk memproduksi eritrosit dalam jumlah lebih banyak untuk menggantikan eritrosit yang mengalami kerusakan akibat infeksi mikroorganisme.

Perhitungan Total Leukosit

Analisis hasil perhitungan rata-rata leukosit disajikan pada Tabel 2. Hasil perhitungan jumlah leukosit tertinggi terdapat hasil analisis ANOVA yang menunjukkan bahwa pemberian nanovaksin rekombinan protein *C. vulgaris* berbasis nanopartikel *hybrid chitosan* berpengaruh nyata ($P < 0,05$) pada peningkatan total leukosit yang dimiliki ikan kerapu cantang yang ditunjukkan dengan total leukosit tertinggi terdapat pada perlakuan T1, yaitu sebesar $1,76 \times 10^5$ sel/mm³. Hasil perhitungan rata-rata leukosit perlakuan T2 ($1,63 \times 10^5$ sel/mm³) dan T3 ($1,60 \times 10^5$ sel/mm³) menunjukkan adanya peningkatan leukosit, namun masih berada di bawah perlakuan T1. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian nanovaksin mampu

Tabel 1 Rata-rata total eritrosit ($\times 10^6$ sel/mm³) Ikan Kerapu Cantang

Perlakuan	Lama pemeliharaan					Rata-rata
	H-0	H-7	H-14	H-21	H-28	
K+	2,06	2,04	1,94	1,83	1,84	$1,94 \pm 0,10^a$
K-	2,05	2,1	2,09	2,11	2,11	$2,09 \pm 0,02^b$
T1	2,12	2,24	2,26	2,3	2,36	$2,25 \pm 0,08^d$
T2	2,09	2,16	2,2	2,27	2,29	$2,20 \pm 0,09^{cd}$
T3	2,1	2,12	2,11	2,18	2,22	$2,14 \pm 0,05^{bc}$

Keterangan: Angka Rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama pada satu kolom menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata pada uji LSD dan uji Duncan pada taraf uji $\alpha=5\%$. K+ (Ikan terinfeksi VNN), K- (Ikan Sehat), T1 (Dosis nanovaksin rekombinan protein *C. vulgaris* berbasis nanopartikel hybrid chitosan 33 µl dan diuji tantang VNN), T2 (Dosis nanovaksin rekombinan protein *C. vulgaris* berbasis nanopartikel hybrid chitosan 66 µl dan diuji tantang VNN), dan T3 (Dosis nanovaksin rekombinan protein *C. vulgaris* berbasis nanopartikel hybrid chitosan 112 µl dan diuji tantang VNN).

Tabel 2 Rata-rata total leukosit ($\times 10^5$ sel/mm³) ikan kerapu cantang

Perlakuan	Lama Pemeliharaan					Rata-rata
	H-0	H-7	H-14	H-21	H-28	
K+	1,14	1,68	1,72	1,7	1,7	$1,58 \pm 0,25^b$
K-	1,12	1,13	1,13	1,13	1,12	$1,12 \pm 0,05^a$
T1	1,21	1,86	1,94	1,91	1,89	$1,76 \pm 0,30^b$
T2	1,16	1,7	1,78	1,76	1,77	$1,63 \pm 0,26^b$
T3	1,19	1,74	1,72	1,69	1,67	$1,60 \pm 0,23^b$

Keterangan: Angka Rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama pada satu kolom menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata pada uji LSD dan uji Duncan pada taraf uji $\alpha=5\%$. K+ (Ikan terinfeksi VNN), K- (Ikan Sehat), T1 (Dosis nanovaksin rekombinan protein *C. vulgaris* berbasis nanopartikel hybrid chitosan 33 µl dan diuji tantang VNN), T2 (Dosis nanovaksin rekombinan protein *C. vulgaris* berbasis nanopartikel hybrid chitosan 66 µl dan diuji tantang VNN), dan T3 (Dosis nanovaksin rekombinan protein *C. vulgaris* berbasis nanopartikel hybrid chitosan 112 µl dan diuji tantang VNN).

meningkatkan rata-rata leukosit ikan kerapu cantang. Menurut Alipin dan Sari (2020), rata-rata leukosit ikan teleostei adalah 2×10^4 – $1,5 \times 10^5$ sel/ mm³.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian nanovaksin rekombinan *Chlorella vulgaris* berbasis nanopartikel *hybrid chitosan* mampu meningkatkan rata-rata leukosit sebagai respons terhadap antigen yang masuk ke dalam tubuh. Menurut Yanuhar *et al.* (2020), vaksin rekombinan *C. vulgaris* mengandung protein peridinin klorofil yang memiliki kemampuan untuk meningkatkan aktivasi dan respons imunitas. Kondisi ini memengaruhi peningkatan respons imunitas yang dimiliki ikan untuk melawan infeksi VNN. Peningkatan rata-rata leukosit pada perlakuan ujiantang dipengaruhi oleh respons tubuh untuk mencegah perkembangan mikroorganisme di dalam tubuh melalui pengiriman lebih banyak komponen sistem imun pada jaringan yang terinfeksi dan mengalami inflamasi (Dangeubun & Metungun 2017).

Perbedaan nilai rata-rata leukosit pada semua perlakuan dapat dipengaruhi oleh kondisi stress, umur ikan, aktivitas fisiologis, pemberian vaksin, dan kemampuan ikan dalam merespons benda asing yang masuk ke dalam tubuh. Imunosupresi diduga terjadi pada perlakuan T3 yang diberi dosis 112 µl yang ditunjukkan dengan rata-rata leukosit yang lebih rendah. Dengan demikian, respons imunitas ikan dalam melawan infeksi VNN tidak maksimal. Menurut Yusuf *et al.* (2021), imunosupresi pada tubuh ikan dapat dipengaruhi dosis vaksin yang diberikan terlalu tinggi atau rendah yang memengaruhi tubuh ikan sehingga tidak mampu merespons rangsangan antigenik bahan vaksin secara maksimal dan respons imun yang dibentuk tidak terlalu maksimal.

Kadar Hemoglobin (Hb)

Kadar hemoglobin pada ikan kerapu cantang disajikan pada Tabel 3. Analisis statistik menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$), yakni perlakuan pemberian nanovaksin rekombinan protein *Chlorella vulgaris* berbasis nanopartikel *hybrid chitosan* memiliki kadar hemoglobin yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan tanpa pemberian nanovaksin dengan rata-rata kadar Hb tertinggi terdapat pada perlakuan T1 yang diberi dosis 33 µl (6,8 g/dL). Hasil pengukuran kadar hemoglobin pada semua perlakuan dalam penelitian ini

masih berada pada rentang normal. Menurut Alipin and Sari (2020), kadar hemoglobin normal ikan kerapu antara 2,0–14 g/dL.

Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan dan penurunan kadar hemoglobin yang berhubungan dengan jumlah eritrosit yang terdapat pada tubuh ikan. Peningkatan kadar hemoglobin pascapemberian nanovaksin dipengaruhi oleh kemampuan nanovaksin untuk meningkatkan respons imunitas terhadap infeksi penyakit. Menurut Sukenda *et al.* (2015) dan Saparuddin (2018), pemberian vaksin dapat memengaruhi proses metabolisme di dalam tubuh ikan dan peningkatan proses metabolisme dapat memengaruhi peningkatan nafsu makan dan transport nutrisi oleh eritrosit akan lebih lancar yang menyebabkan peningkatan kadar hemoglobin di dalam tubuh ikan. Penurunan kadar hemoglobin pada perlakuan pemberian ujiantang dipengaruhi oleh infeksi VNN yang terjadi di dalam tubuh ikan. Infeksi mikroorganisme di dalam tubuh ikan akan menyebabkan lisis eritrosit yang selanjutnya akan memengaruhi penurunan kadar hemoglobin yang disertai dengan gangguan proses transportasi oksigen dan nutrisi (Alipin & Sari 2020).

Diferensial Leukosit

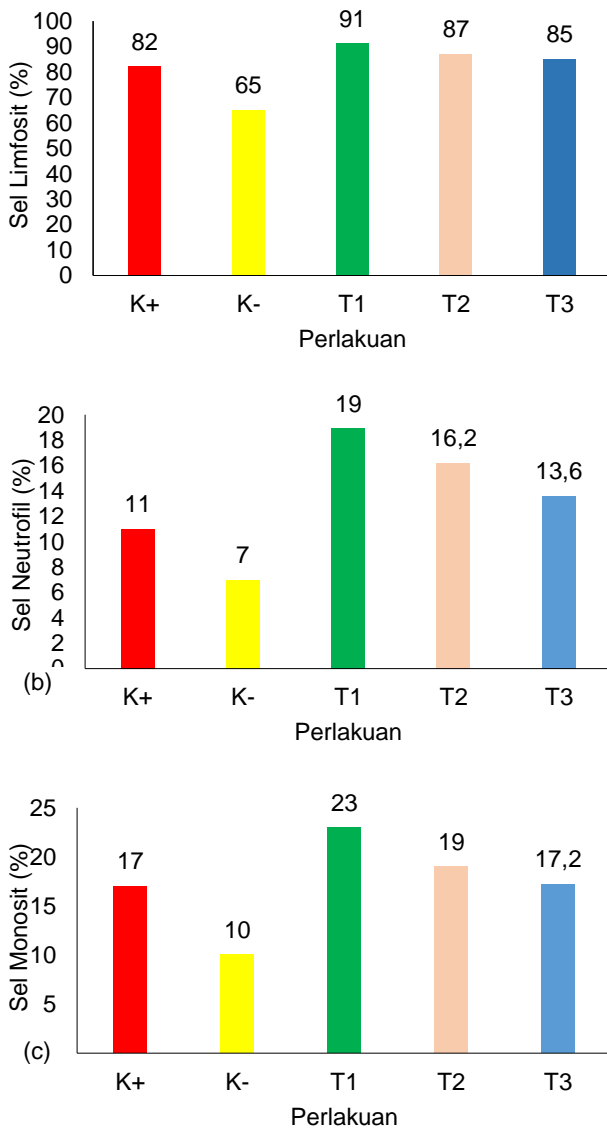
Diferensial leukosit yang diamati pada penelitian ini terdiri atas sel limfosit, monosit, dan *neutrophil* yang disajikan pada Gambar 1. Analisis ANOVA menunjukkan bahwa pemberian nanovaksin rekombinan *C. vulgaris* berbasis nanopartikel *hybrid chitosan* berpengaruh nyata ($P < 0,05$) pada peningkatan persentase sel limfosit, *neutrophil*, dan monosit dibandingkan perlakuan tanpa pemberian nanovaksin. Berdasarkan perhitungan rerata persentase sel limfosit pada ikan kerapu cantang pada penelitian ini pada perlakuan K + sebesar (82%), K- (65%), T1 (91%), T2 (87%), dan T3 (85%). Rata-rata persentase sel limfosit tertinggi ditemukan pada perlakuan T1 yang diberi nanovaksin dengan dosis 33 µl. Menurut Santika *et al.* (2019), persentase limfosit normal pada ikan kerapu adalah 60-80%.

Peningkatan persentase sel limfosit ikan kerapu cantang yang diberi nanovaksin dan terinfeksi VNN dipengaruhi oleh benda asing yang masuk ke dalam tubuh disertai dengan respons imunitas tubuh. Hal ini sesuai dengan pernyataan Wahjuningrum *et al.* (2022)

Tabel 3 Nilai Rata-rata kadar hemoglobin (g/dL) ikan kerapu cantang

Perlakuan	Lama pemeliharaan					Rata-rata
	H-0	H-7	H-14	H-21	H-28	
K+	5,2	4,8	4,6	4,4	4,6	4,7 ± 0,30 ^a
K-	5,4	5,6	5,6	5,6	5,8	5,6 ± 0,14 ^b
T1	6,2	6,6	7	7,2	7,2	6,8 ± 0,43 ^d
T2	6	6,4	6,2	6,6	6,7	6,3 ± 0,28 ^{cd}
T3	6,2	5,6	5,6	5,8	6	5,8 ± 0,26 ^{bc}

Keterangan: Angka Rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama pada satu kolom menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata pada uji LSD dan uji Duncan pada taraf uji $\alpha = 5\%$. K+ (Ikan terinfeksi VNN), K- (Ikan Sehat), T1 (Dosis nanovaksin rekombinan protein *C. vulgaris* berbasis nanopartikel hybrid chitosan 33 µl dan diuji tantang VNN), T2 (Dosis nanovaksin rekombinan protein *C. vulgaris* berbasis nanopartikel hybrid chitosan 66 µl dan diuji tantang VNN), dan T3 (Dosis nanovaksin rekombinan protein *C. vulgaris* berbasis nanopartikel hybrid chitosan 112 µl dan diuji tantang VNN).



Gambar 1 Diferensial sel leukosit ikan kerapu cantang. a) Sel Limfosit, b) Sel *neutrophil*, dan c) Sel monosit. K+ (Ikan terinfeksi VNN), K- (Ikan Sehat), T1 (Dosis nanovaksin rekombinan protein *C. vulgaris* berbasis nanopartikel hybrid chitosan 33 µl dan diuji tantang VNN), T2 (Dosis nanovaksin rekombinan protein *C. vulgaris* berbasis nanopartikel hybrid chitosan 66 µl dan diuji tantang VNN), dan T3 (Dosis nanovaksin rekombinan protein *C. vulgaris* berbasis nanopartikel hybrid chitosan 112 µl dan diuji tantang VNN).

bahwa peningkatan persentase sel limfosit di dalam tubuh dapat dipengaruhi oleh faktor pemberian vaksin dan adanya peningkatan intensitas infeksi oleh agen patogen. Kondisi ini akan memengaruhi peningkatan respons imunitas *adaptive* melalui aktivasi sel limfosit T untuk menghasilkan berbagai sitokin dan eliminasi sel yang telah terinfeksi oleh agen patogen dan aktivasi sel limfosit B untuk menghasilkan antibodi.

Hasil pengamatan persentase sel *neutrophil* pada ikan kerapu cantang pada masing-masing perlakuan

adalah K+ (11%), K- (7%), T1 (19%), T2 (16,2%), dan T3 (13,6%). Rata-rata persentase sel *neutrophil* tertinggi pada penelitian ini didapatkan pada perlakuan pemberian nanovaksin dengan dosis 33 µl (perlakuan T1) dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Menurut Santika *et al.* (2019), persentase normal sel *neutrophil* pada ikan sebesar 6–8%. Peningkatan persentase sel *neutrophil* digunakan untuk memfagositosis agen patogen (Wahjuningrum *et al.* 2022).

Persentase rerata sel monosit pada penelitian ini mendapatkan hasil pada perlakuan K+ (17%), K- (10%), T1 (23%), T2, (19%), dan T3 (17,2%). Rata-rata sel monosit tertinggi didapatkan pada perlakuan T1 ikan kerapu cantang yang diberi nanovaksin dosis 33 µl yang kemudian diuji tantang VNN. Menurut Agung dan Prayitno (2013), persentase normal pada ikan adalah 9–15%. Peningkatan persentase sel monosit di dalam tubuh dapat dipengaruhi oleh pemberian vaksin pada tubuh ikan dan infeksi *Betanodavirus*. Hal ini sesuai dengan pernyataan Lu and Chen (2019) bahwa monosit ketika meninggalkan pembuluh darah akan berdiferensiasi menjadi makrofag yang berperan untuk memfagositosis agen patogen dan menghasilkan sitokin untuk memodulasi respons inflamasi dan makrofag dapat berperan sebagai *Antigen presenting cells* untuk mengaktifasi respons imunitas *adaptive* ikan (Kordon *et al.* 2018).

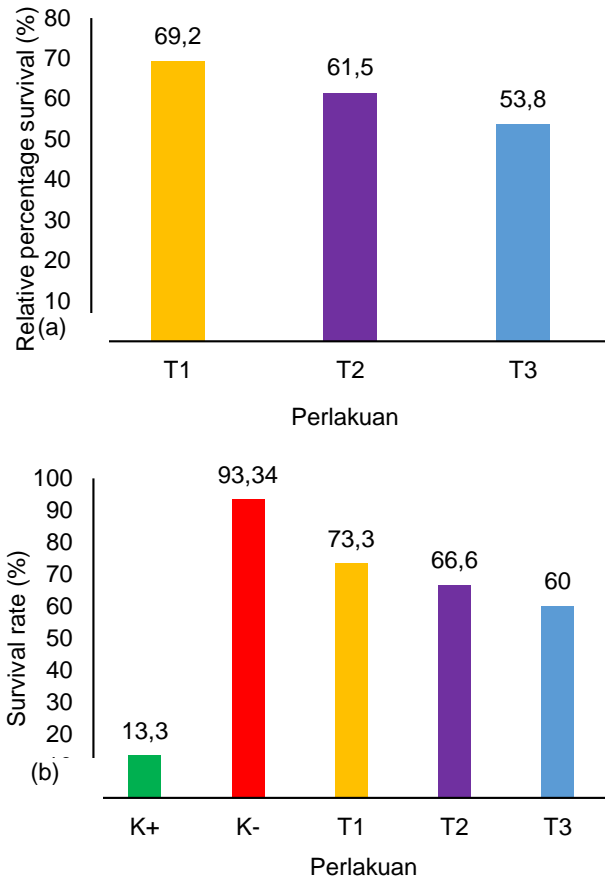
Tingkat *Relative Percentage Survival* (RPS) dan *Survival rate* (SR)

Hasil pengukuran RPS dan SR pada ikan kerapu cantang yang dipelihara selama 28 hari disajikan pada Gambar 2. Berdasarkan hasil penelitian didapatkan tingkat RPS dan SR tertinggi terdapat pada perlakuan T1 yang diberikan nanovaksin dosis 33 µl dengan tingkat RPS 69,3% dan SR 73,3%. Tingkat RPS yang tinggi menunjukkan bahwa vaksin yang diberikan memiliki keefektifan yang baik dalam mencegah infeksi penyakit (Zafran 2016).

Tingkat RPS vaksin yang baik akan meningkatkan nilai SR pada penelitian ini yang ditunjukkan pada perlakuan pemberian nanovaksin dibandingkan kontrol positif. Menurut Pane *et al.* (2021), pemberian vaksin mampu meningkatkan respons imunitas tubuh ikan dan meningkatkan produksi antibodi di dalam serum sebagai respons sistem kekebalan tubuh terhadap penyakit. Perlakuan T3 memiliki nilai RPS dan SR yang tidak terlalu tinggi yang dapat dipengaruhi oleh kondisi immunosupresi yang terjadi pada ikan. Kondisi ini dapat terjadi akibat ikan tidak mampu merespons rangsangan antigenik vaksin yang memengaruhi respons imunitas yang terbentuk tidak maksimal (Agustin *et al.* 2019).

Mekanisme Nanovaksin Rekombinan *C. vulgaris* Berbasis Nanopartikel *Hybrid Chitosan*

Hasil pemanfaatan nanovaksin rekombinan *C. vulgaris* berbasis nanopartikel *hybrid chitosan* yang diberikan pada ikan kerapu cantang dalam penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian nanovaksin mampu



Gambar 2 a) Tingkat *Relative Percentage Survival* (RPS) dan b) *Survival Rate* (SR) ikan Kerapu Cantang. K+ (Ikan terinfeksi VNN), K- (Ikan Sehat), T1 (Dosis nanovaksin rekombinan protein *C. vulgaris* berbasis nanopartikel hybrid chitosan 33 μ l dan diuji tantang VNN), T2 (Dosis nanovaksin rekombinan protein *C. vulgaris* berbasis nanopartikel hybrid chitosan 66 μ l dan diuji tantang VNN), dan T3 (Dosis nanovaksin rekombinan protein *C. vulgaris* berbasis nanopartikel hybrid chitosan 112 μ l dan diuji tantang VNN).

memengaruhi parameter total eritrosit, total leukosit, kadar hemoglobin, diferensial leukosit, RPS, dan SR. Hal ini dipengaruhi oleh nanovaksin yang dimanfaatkan mengandung protein peridinin klorofil yang berasal dari *Chlorella vulgaris* yang memiliki kemampuan dalam meningkatkan respons imunitas. Menurut Yanuhar *et al.* (2020), protein peridinin klorofil *C. vulgaris* memiliki kemampuan untuk meningkatkan respons imunitas yang dimiliki oleh ikan kerapu melalui peningkatan aktivasi protein β -actin dalam pengaturan respons imunitas, meningkatkan kinerja reseptor imunitas *adaptive*, dan bersifat adhesin terhadap reseptor antigen virus VNN.

Nanopartikel dalam pengembangan vaksin pada saat ini telah banyak dimanfaatkan sebagai *adjuvant* dipengaruhi kemampuan nanopartikel dalam meningkatkan imunogenitas bahan vaksin, mengantarkan bahan vaksin secara spesifik menuju organ target, dan kemampuan melindungi bahan vaksin (Vinay *et al.*

2018). *Chitosan* menjadi salah satu nanopartikel yang telah dimanfaatkan dalam pengembangan vaksin yang dipengaruhi oleh kemampuan nanopartikel untuk dapat berikatan dengan bahan vaksin melalui ikatan *electrostatic interaction*. Ikatan ini berperan dalam mengatur ikatan antigen dengan epitel mukosa agar dapat dikenali oleh *Antigen presenting cell* (APC) untuk menginduksi respons imunitas tubuh. Kemampuan *Chitosan* lainnya, yaitu melindungi bahan vaksin dari proses pelarutan bahan organik, proses enzimatis, agregasi peptida yang terjadi di dalam tubuh melalui proses enkapsulasi agar bahan vaksin lebih optimal untuk dikenali dan diproses oleh organ target (Dmour & Islam 2022).

Mekanisme *chitosan* dalam menginduksi respons imunitas melalui aktivasi kinerja sel-sel leukosit, seperti sel makrofag, sel *natural killer*, dan reseptor imunitas *adaptive* (sel dendritik dan MHC). Reseptor imunitas *adaptive* yang telah mengenal bahan vaksin mampu meningkatkan aktivasi limfosit T untuk berdiferensiasi menjadi sel T CD4 dan CD8 dan limfosit B untuk menghasilkan antibodi sehingga mampu mempercepat dan meningkatkan aktivasi respons imunitas tubuh dalam melawan infeksi virus (Rathore *et al.* 2022). Pemanfaatan nanopartikel *hybrid chitosan* sebagai bahan *adjuvant* nanovaksin dalam penelitian ini mampu berperan baik yang ditunjukkan dengan kemampuan untuk melindungi bahan nanovaksin dan meningkatkan imunogenitas bahan nanovaksin rekombinan *C. vulgaris*.

Pengukuran Kualitas Air

Pengukuran kualitas air pada setiap bak perlakuan ikan kerapu cantang menunjukkan hasil rata-rata suhu 28,1°C–30,5°C, pH 7,1–7,8, salinitas 29–31 ppt, dan DO 4,12–6,00 mg/L. Nilai kualitas air ini berada pada batas yang baik untuk perkembangan dan pertumbuhan ikan kerapu cantang. Menurut Thalib *et al.* (2021), suhu optimal untuk ikan kerapu cantang berkisar antara 28–32°C dan pH optimal bagi ikan kerapu berkisar antara 7,0–7,8. Nilai salinitas optimal bagi ikan kerapu cantang berkisar antara 28–32 ppt dan kadar DO optimal ikan kerapu berkisar 4–6 mg/L (Harahap *et al.* 2019; Khalil *et al.* 2021).

KESIMPULAN

Nanovaksin dengan dosis 33 μ l memiliki tingkat imunogenitas yang baik untuk meningkatkan respons imunitas ikan kerapu cantang yang diinfeksi *Viral nervous necrosis* (VNN).

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima Kasih kepada Direktorat Riset Teknologi dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Kementerian Pendidikan Kebudayaan Riset dan Teknologi Republik Indonesia yang telah membiayai Penelitian Tesis

Magister (PTM) dengan nomor kontrak 1144.2/UN10.C10/TU/2023.

DAFTAR PUSTAKA

- Agung LA, Prayitno SB, Sarjito. 2013. The Effect of Jeruju Leaf Extract (*Acanthus ilicifolius*) Administration on The Blood Profile Of Tiger Grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 2(1): 87–101.
- Agustin LP, Kusdarwati R, Mahasri G. 2019. Pengaruh Pemberian Vaksin Whole Cell *Aeromonas hydrophilla* Dengan Dosis Yang Berbeda Terhadap Kelulushidupan Dan Total Leukosit Ikan Gurami (*Osporonemus gouramy*). *Journal of Aquaculture and Fish Health*. 6(1): 16–23. <https://doi.org/10.20473/jafh.v6i1.11270>
- Alipin K, Sari TA. 2020. Indikator Kesehatan Ikan Kerapu Cantik (*Epinephelus* sp.) Yang Terdapat Pada Budidaya Keramba Pantai Timur Pangandaran. *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences*. 7(2): 141–148. <https://doi.org/10.24843/metamorfosa.2020.v07.i02.p18>
- Ashfaq H, Soliman H, Saleh M, El-Matbouli M. 2019. CD4: A vital player in the teleost fish immune system. *Veterinary Research*. 50(1): 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0620-0>
- Celis-Giraldo CT, Lopez-Aban J, Muro A, Patarroyo MA, Manzano-Roman R. 2021. Nanovaccines against animal pathogens: The latest findings. *Vaccines*. 9(9): 1–27. <https://doi.org/10.3390/vaccines9090988>
- Dangeubun JL, Metungun J. 2017. Hematology of *Vibrio alginolyticus*-infected humpback grouper *Cromileptes altivelis*, under treatment of *Alstonia acuminata* shoot extract. *AAFL Bioflux*. 10(2): 274–284.
- Dmour I, Islam N. 2022. Recent advances on chitosan as an adjuvant for vaccine delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*. 200: 498–519. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.129>
- Gong X, Gao Y, Shu J, Zhang C, Zhao K. 2022. Chitosan-Based Nanomaterial as Immune Adjuvant and Delivery Carrier for Vaccines. *Vaccines*. 10(11): 1906. <https://doi.org/10.3390/vaccines10111906>
- Harahap AF, Rostika R, Agung MUK, Haetami K. 2019. Pemanfaatan simplisia pepaya pada ikan rucah untuk pakan kerapu cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) di keramba jaring apung pesisir Pangandaran. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. 10(2): 56–64.
- Hazreen-Nita M, Azila A, Mukai Y, Firdaus-Nawi M, Nur-Nazifah M. 2019. A review of betanodavirus vaccination as preventive strategy to viral nervous necrosis (VNN) disease in grouper. *Aquaculture International*. 27(4): 1–13.
- Izaguirre-Hernández IY, Mellado-Sánchez G, Mondragón-Vásquez K, Thomas-Dupont P, Sánchez-Vargas L A, Hernández-Flores KG, Mendoza-Barrera C, Altuzar V, Cedillo-Barrón L, Vivanco-Cid H. 2017. Non-conjugated Chitosan-Based Nanoparticles to Proteic Antigens Elicit Similar Humoral Immune Responses to Those Obtained with Alum. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 17(1): 846–852. <https://doi.org/10.1166/jnn.2017.13067>
- Junirahma NS, Yanuhar U. 2020. Immune Response of VNN (*Viral Nervous Necrosis*) Infected Grouper Utilizing *Chlorella vulgaris* Extract as an Anti-Virus Candidate. *Journal of Physics: Conference Series*. 1665(2020): 012008. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1665/1/012008>
- Khalil M, Salamah, Zumairi, Muliani. 2021. Kajian Kinerja Pertumbuhan Dan Kelangsungan Hidup Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) Menggunakan Pakan Hewani Yang Berbeda. *Acta Aquatica: Aquatic Sciences Journal*. 8(2): 118–123. <https://doi.org/10.29103/aa.v8i2.4785>
- Khumaidi A, Fadjar M, Iranawati F, Kilawati Y, Yanuhar U. 2019. Mass mortality associated with viral nervous necrosis of hybrid grouper (*Epinephelus* sp.) cultured in city of grouper. *AIP Conference Proceedings*. 2120(1): 1–8. <https://doi.org/10.1063/1.5115724>
- Kordon AO, Karsi A, Pinchuk LM. 2018. Innate Immune Responses in Fish: Antigen Presenting Cells and Professional Phagocytes. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 18: 1123–1139.
- Lu XJ, Chen J. 2019. Specific function and modulation of teleost monocytes/macrophages: polarization and phagocytosis. *Zoological Research*. 40(3): 146–150. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2019.035>
- Ma K, Bao Q, Wu Y, Chen S, Zhao S, Wu H, Fan J. 2019. A review of fish vaccine development strategies: Conventional Ma, K., Bao, Q., Wu, Y., Chen, S. Zhao, S., Wu, H., and Fan, J. 2020. Evaluation of Microalgae as Immunostimulants and Recombinant Vaccines for Diseases Prevention and Control in Aquaculture. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 8(590431): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.590431>
- Mahardika K, Mastuti I, Sudewi, Asih YN, Muzaki A, Giri INA. 2019. Aplikasi Vaksin Bivalen (VNN dan GSDIV) Pada Pemeliharaan Larva Ikan Kerapu Sunu, *Plectropomus leopardus*. *Jurnal Riset Akuakultur*. 13(4): 337–346. <https://doi.org/10.15578/jra.13.4.2018.337-346>
- Maina TW, Grego EA, Boggiatto PM, Sacco RE,

- Narasimhan B, McGill JL. 2020. Applications of Nanovaccines for Disease Prevention in Cattle. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 8(608050): 1–20. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.608050>
- Ollin NS, Salosso Y, Jasmanindar Y. 2021. Pengobatan Ikan Kerapu Cantang Yang Terinfeksi Bakteri *Vibrio alginolyticus* Menggunakan Madu Dengan Frekuensi Yang Berbeda. *Jurnal Akuatik*. 4(2): 38–45.
- Pane N, Riauaty M, Lukistyowati I. 2021. Pengaruh Pemberian Pakan yang Mengandung Vaksin HydroVac terhadap Jumlah Eritrosit Ikan Jambal Siam (*Pangasius hipophthalmus*) yang Dipelihara dalam Keramba. *Jurnal Akuakultur Sebatin*. 2(1): 32–43.
- Rathore A, Yadav HKS, Singh SK. 2022. Chitosan as an Adjuvant in Viral Vaccine. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*. 45(1): 36085–36092
- Rochmad AN. 2020. Teknik Pembesaran Ikan Kerapu Hibrida Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus* × *Epinephelus lanceolatus*) Pada Karamba Jaring Apung. *Jurnal Biosains Pascasarjana*. 22(1): 29–36. <https://doi.org/10.20473/jbp.v22i1.2020.29-36>
- Santika N, Wardiyanto W, Harpeni E. 2019. Utilization Of Sambung Nyawa Leaf Extracts *Gynura procumbens* (Lour) Merr. For Treatment Of *Vibrio alginolyticus* In Tiger Grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* Forsskal, 1775). *Berkala Perikanan Terubuk*. 47(2): 134–150. <https://doi.org/10.31258/terubuk.47.2.134-150>
- Saparuddin S. 2018. Pengaruh Ekstrak Etanol Terhadap Peningkatan Konsentrasi Hemoglobin dan Nilai Hematokrit Ikan Kerapu Tikus. *Jurnal Saintifik*. 4(1): 39–46. <https://doi.org/10.31605/saintifik.v4i1.142>
- Sudirman I, Syawal H, Lukistyowati I. 2021. Profil Eritrosit Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L) yang Diberi Pakan Mengandung Vaksin *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Ilmu Perairan (Aquatic Science)*. 9(2): 144–151. <https://doi.org/10.31258/jipas.9.2.p.144-151>
- Sukenda, Febriansyah TR, Nuryati S. 2015. Whole-cell vaccine of *Streptococcus agalactiae* in *Oreochromis* sp. with immersion method. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. 13(1): 83–93. <https://doi.org/10.19027/jai.13.83-93>
- Sukkarun P, Kitiyodom S, Yoistawornkul J, Chaiin P, Yata T, Rodkhum C, Boonrunsiman S, Pirarat N. 2022. Chitosan-polymer based nanovaccine as promising immersion vaccine against *Aeromonas veronii* challenge in red tilapia (*Oreochromis* sp.). *Fish and Shellfish Immunology*. 129: 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.08.035>
- Sulistiyono A, Kurniasih K, Untari T. 2020. Detection of nervous necrosis virus of grouper fish in Lombok island, Indonesia based on serological and molecular studies. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*. 24(1): 329–335. <https://doi.org/10.21608/ejabf.2020.70593>
- Thalib YA, Razali RS, Mohamad S, Zainuddin RA, Rahmah S, Ghaffar MA, Nhan HT, Liew HJ. 2021. Environmental changes affecting physiological responses and growth of hybrid grouper—The interactive impact of low pH and temperature. *Environmental Pollution*. 271(2021): 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116375>
- Vimal S, Madan N, Farook MA, Nambi KSN, Majeed SA, Rajkumar T, Venu S, Thirunavuskarasu AR, Hameed ASS. 2014. Production of recombinant vaccine using capsid gene of nodavirus to protect Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch, 1790). *Aquaculture*. 418–419. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.10.017>
- Vinay TN, Bhat S, Choudhury TG, Paria A, Jung M-W, Kallappa GS, Jung S-J. 2018. Recent Advances in Application of Nanoparticles in Fish Vaccine Delivery', *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*. 26(1): 29–41. <https://doi.org/10.1080/23308249.2017.1334625>
- Wahjuningrum D, Lestari DA, Mulyadin A, Effendi I. 2022. The use of ambon banana (*Musa paradisiaca* var. *sapientum*) stems flour in grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *Epinephelus fuscoguttatus* ♀) floating net cage nursery. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. 21(1): 22–31. <https://doi.org/10.19027/jai.21.1.22-31>
- Widyaningrum H, Simanjutak SBI, Susatyo P. 2017. Diferensial Leukosit Ikan Gurami (*Osphronemus Gouramy* Lac.) Dengan Perbedaan Level Suplementasi *Spirulina platensis* DALAM PAKAN. *Scripta Biologica*. 4(1): 37–40. <https://doi.org/10.20884/1.sb.2017.4.1.383>
- Yanuhar U, Musa M, Arfiati D, Caesar NR, Junirahma NS. 2020. In-vivo Test of *Chlorella* Protein Fragments as Nucleotide Vaccine Candidates in Grouper Viral Nervous Necrosis (VNN) Infection against Haematological Response. *Conference: 6th ICAMBBE (International Conference on Advance Molecular Bioscience & Biomedical Engineering) 2019*. <https://doi.org/10.5220/0009588100790083>
- Yanuhar U, Musa M, Arfiati D, Sholihah Q, Khumaidi Ach, Caesar NR. 2020. Influence of a pigment protein fraction from *Chlorella vulgaris* isolated in Indonesia on β -actin and MHC-1 response to viral infected humpback grouper. *Systematic Reviews in Pharmacy*. 11(7): 352–362. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/860/1/012027>
- Yanuhar U, Arfiati D, Musa M, Junirahma NS, Caesar

- NR. 2021. The association between Hsp70 and TNF- α as immune Response in Groupers Infected with *Viral Nervous Necrosis*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 860 (012027).
- Yuhana S, Suprpto H, Soegianto A, Dalahi F, Mahardika K, Zafran, Mastuti I. 2019. The hematological response of cantang hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus lanceolatus*) injected with extracellular product, intracellular component and whole cell vaccine of *Vibrio alginolyticus*. *AAFL Bioflux*, 12(6): 2273–2285.
- Yusuf R, Riauaty M, Syawal H. 2021. Efek Perendaman Ikan Patin Siam (*Pangasionodon hypophthalmus*) dalam Larutan Vaksin HydroVac terhadap Diferensiasi Leukosit. *Jurnal Ilmu Perairan (Aquatic Science)*. 9(2): 134–143. <https://doi.org/10.31258/jipas.9.2.p.134-143>
- Zafran. 2016. Efektifitas kombinasi vaksin Bakteri Polivalen dengan Vaksin Anti Grouper Sleepy Disiase Iridovirus (GSDIV) pada Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Berita Biologi*, 15(1): 95–100.
- Zhang Z, Yu A, Lan j, Zhang H, Hu M, Cheng J, Zhao L, Lin L, Wei S. 2017. GapA, a potential vaccine candidate antigen against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology*. 63(2017): 255–260. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.02.019>