



**PENINGKATAN IMUNOGENISITAS VAKSIN INAKTIF  
*Aeromonas salmonicida* DENGAN PENAMBAHAN ADJUVANT PADA  
IKAN MAS (*Cyprinus carpio*)<sup>©</sup>**

Ria Hindra Sari<sup>\*</sup>, Agus Setyawan<sup>†,‡</sup> dan Suparmono<sup>†</sup>

**ABSTRAK**

Bakteri *Aeromonas salmonicida* dapat menyebabkan penyakit *carp erythrodermatitis* pada ikan mas (*Cyprinus carpio*). Salah satu cara untuk mencegah penyakit ini adalah dengan vaksinasi. *Adjuvant* diketahui dapat meningkatkan imunogenisitas vaksin. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui tingkat imunogenisitas vaksin inaktif *A. salmonicida* dengan penambahan beberapa jenis *adjuvant* yang berbeda. Vaksin diinaktifasi dengan formalin 1% dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu ruang. Penelitian ini terdiri dari 5 perlakuan yaitu tanpa vaksinasi, vaksinasi tanpa *adjuvant*, dan vaksinasi dengan penambahan 3 jenis *adjuvant* yang berbeda (6 ppm Aluminium hidroksida (Al(OH)<sub>3</sub>), 6 ppm Alumunium Potasium Sulfat (KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), dan *Freud's Incomplete adjuvant (FIA)* (1:1 v/v)). Vaksin diujikan pada 10 ekor ikan mas/perlakuan (berat ±30 gr) dengan cara suntik melalui *intra peritoneal* (10<sup>7</sup> sel/ikan). *Booster* dilakukan dengan metode dan dosis yang sama dengan vaksinasi pertama pada 7 hari setelah vaksinasi (hsv). Pengamatan titer antibodi setiap perlakuan diukur dengan metode mikroaglutinasi pada saat sebelum vaksinasi, 7 (hsv), 14 (hsv) (7 hari setelah booster), dan 30 (hsv). Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan *adjuvant* mampu meningkatkan imunogenisitas vaksin inaktif *A. salmonicida* yang ditunjukkan dengan nilai rata-rata titer antibodi yaitu 2<sup>5</sup> untuk FIA dan KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 2<sup>4</sup> untuk Al(OH)<sub>3</sub> dan vaksin tanpa *adjuvant*, sedangkan hasil titer antibodi terendah pada perlakuan tanpa pemberian vaksin maupun *adjuvant* sebesar 2<sup>3</sup>.

Kata kunci : *Aeromonas salmonicida*, *adjuvant*, ikan mas, titer antibodi, vaksin inaktif

© e-JRTBP 2013

\* Mahasiswa Jurusan Budidaya Perairan

† Staf Pengajar Jurusan Budidaya Perairan Fakultas Pertanian Unila

‡ Alamat Korespondensi : agus.san @ gmail.com

## Pendahuluan

Budidaya ikan mas (*Cyprinus carpio*) tidak terlepas dari adanya kemungkinan terserang penyakit. Penyakit yang disebabkan oleh bakteri *A. salmonicida* yang menyerang ikan mas disebut penyakit *carp erythrodermatitis*. Upaya penanggulangan penyakit ini salah satunya dengan menggunakan antibiotik. Namun, pemakaian antibiotik yang terus-menerus dapat menyebabkan resistensi dan residu bagi ikan (Astuti dkk., 2003). Untuk mengurangi dampak penggunaan antibiotik tersebut, diperlukan pencegahan penyakit yang aman bagi ikan dan lingkungan.

Soeripto (2002) menyatakan bahwa vaksin *Aeromonas* yang digunakan untuk mencegah penyakit berhasil menurunkan penggunaan antibakteria secara drastis. Vaksin yang baik adalah vaksin yang stabil dan imunogenisitasnya tidak mudah berkurang (Radji, 2010). Salah satu cara untuk memperkuat sistem imunogenisitas vaksin adalah dengan penambahan *adjuvant*.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Nur dan Dana (2004) menunjukkan bahwa penyuntikan vaksin *Streptococcus iniae* dengan penambahan *Freuds complete adjuvant* (FCA) pada induk betina ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dapat meningkatkan titer antibodi hingga 7,00 (titer antibodi dalam  $^2\log_2$ ) dibandingkan dengan kontrol yang kurang dari 2. Sedangkan menurut penelitian yang dilakukan oleh Retmonoaji (2007) menunjukkan bahwa penambahan  $KAl(SO_4)_2$  dan  $Al(OH)_3$  pada vaksin *polivalen vibrio* memberikan pengaruh terhadap hasil titer antibodi yang cukup tinggi yaitu sekitar  $2^9$  dibandingkan dengan kontrol

sebesar 3,33. Pada penelitian yang dilakukan oleh Ibrahim dkk. (2008) menunjukkan bahwa pemberian vaksin *A. septicemia* dengan penambahan FIA pada ikan nila (*O. niloticus*) dapat meningkatkan titer antibodi hingga pengenceran 16-32 kali dibandingkan dengan kontrol yang hanya mencapai 10 kali pengenceran. Pada penelitian yang dilakukan oleh Hadie, dkk (2010) tentang pemberian vaksin Hydrovac<sup>®</sup> dengan penambahan jenis *adjuvant* FCA pada ikan patin siam (*Pangasinodon hypophthalmus*) menunjukkan hasil rata-rata titer antibodi hingga 128 kali pengenceran dibandingkan dengan kontrol yang rata-rata titer antibodinya negatif atau nol.

Vaksin dengan penambahan *adjuvant* dapat meningkatkan potensi sistem imun serta menambah lamanya perlindungan terhadap suatu infeksi penyakit pada hewan dan manusia (Rajput, 2007) sehingga akan terjadi kontak lebih lama dengan *makrofag* dan *limfosit* (Hadie dkk., 2010) Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui tingkat imunogenisitas vaksin inaktif *A. salmonicida* dengan penambahan jenis *adjuvant* yang berbeda.

## Bahan dan Metode

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret - Mei 2012 di Laboratorium Budidaya Perikanan Fakultas Pertanian Universitas Lampung. Rancangan yang dipakai dalam penelitian ini yaitu rancangan acak lengkap (RAL). Data yang didapatkan dianalisis dengan analisis sidik ragam (ANOVA). Jika terdapat beda nyata antar perlakuan maka dilakukan uji Dunnett pada selang kepercayaan 95%.

Penelitian menggunakan *adjuvant* yang ditambahkan ke dalam vaksin inaktif *A. salmonicida* dengan 5 perlakuan dan 3 kali pengulangan.

Dosis pemberian  $\text{Al}(\text{OH})_3$  dan  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$  sebanyak 6 ppm mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Retmonoajati (2007), dan dosis Penambahan FIA dengan perbandingan vaksin dan FIA sebesar 1:1 mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Fikri dkk. (2002).

Ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang dipakai dengan berat total  $\pm 30$  g sebanyak 200 ekor.

Metode pembuatan vaksin *A. salmonicida* dengan penambahan *adjuvant* adalah Isolat bakteri *A. salmonicida* dikultur pada media cair TSB, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Dilakukan pengkayaan dengan memindahkan inokulum *A. salmonicida* dari media TSB ke media TSA lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Kemudian dilakukan pemanenan bakteri *A. salmonicida* dengan cara dikumpulkan dengan batang *spreader* dan dimasukkan ke dalam *erlenmeyer* menggunakan corong. Vaksin diinaktifasi dengan penambahan formalin 1% kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Uji viabilitas bakteri pada medium spesifik GSP 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. *Sentriifuse* dilakukan sebanyak 3 kali, setiap kali *sentriifuse*, *supernatant* dibuang. Dihitung kepadatan vaksin inaktif dengan *spektrofotometer* ( $\lambda=625$  nm) mengacu pada standar McFarland. Ditambahkan *adjuvant* masing-masing

sebanyak 6 ppm ( $\text{Al}(\text{OH})_3$  dan  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ ) ke dalam vaksin, dan perbandingan 1:1 untuk FIA.

Vaksin diberikan pada setiap ikan uji dengan metode penyuntikan secara intra peritoneal (i.p) dengan dosis pemberian vaksin 0,1 ml/ikan dengan kepadatan bakteri  $10^7$  sel/ikan (Kamiso dkk., 2005). Vaksin diberikan 2 kali yaitu vaksinasi I pada awal pemeliharaan dan vaksinasi II (booster) diberikan seminggu setelah vaksinasi I. Pengambilan sampel darah untuk uji titer antibodi dilakukan sebelum vaksinasi, seminggu setelah vaksinasi I, seminggu setelah vaksinasi II (booster), dan 30 hari setelah pemeliharaan. Pengambilan darah ikan dilakukan dengan menggunakan spuit 1ml,  $\frac{1}{2}$  in 26 G (Therumo<sup>TM</sup>) dari vena caudalis kemudian dimasukkan ke dalam tabung *eppendorf* 1,5 ml. Darah ikan yang telah diambil kemudian disentrifuse dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit untuk mendapatkan serumnya. Serum disimpan di dalam *refrigerator* selama 24 jam untuk digunakan dalam uji titer antibodi.

Serum darah ikan yang telah disimpan dalam *refrigerator* kemudian dilakukan pengujian titer antibodi menggunakan *mikrodilutium plate* dengan metode mikroaglutinasi mengacu pada prosedur standar mikroaglutinasi (Roberson, 1990) dengan sedikit modifikasi secara lengkap yaitu serum @ 25  $\mu$ l dimasukkan ke dalam sumuran 1 dan 2. Kemudian PBS @ 25  $\mu$ l dimasukkan ke dalam sumuran 2–12. Lalu sumuran kedua direpipeting untuk mengencerkan serum, kemudian dilanjutkan ke sumuran 3 sampai 11. Selanjutnya antigen @ 25  $\mu$ l dimasukkan ke dalam sumuran 1–12. Setelah itu, *mikrodilution plate*

digoyang – goyangkan selama 3 menit dengan pola membentuk angka 8. Hasil titer diinkubasi dalam *refrigerator* selama 24 jam. Keesokan harinya dilakukan pengamatan reaksi aglutinasi pada masing–masing sumuran yang ditandai dengan adanya kabut berwarna putih yang menyebar ke seluruh sumuran yang berarti antibodi telah terbentuk.

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah pengaruh penambahan *adjuvant* yang dilihat dari titer antibodi dan kualitas air (suhu, DO, dan pH). Pengukuran parameter kualitas air dilakukan secara harian dengan harapan parameter kualitas air selama penelitian terukur dan masih berada dalam kisaran standar kehidupan ikan mas.

### Hasil dan Pembahasan

Dari Tabel 1 dan Gambar 1 dapat dilihat bahwa hasil rata-rata titer antibodi tertinggi didapatkan pada perlakuan vaksin dengan penambahan FIA dan  $KAl(SO_4)_2$  yaitu  $2^5$ , kemudian hasil rata-rata titer antibodi perlakuan vaksin dengan penambahan  $Al(OH)_3$  dan pemberian vaksin tanpa penambahan *adjuvant* yaitu  $2^4$  dan yang terendah yaitu perlakuan tanpa pemberian vaksin maupun *adjuvant* yaitu  $2^3$  (Tabel 1; Gambar 1).

Penambahan *adjuvant* ternyata dapat meningkatkan imunogenisitas vaksin. Hasil menunjukkan rata-rata titer antibodi dengan penambahan *adjuvant* lebih tinggi dibandingkan kontrol (Gambar 1), meskipun secara statistik tidak berbeda nyata (Tabel 1). Hal ini kemungkinan dikarenakan *adjuvant* merupakan suspensi yang ditambahkan ke dalam vaksin dan dapat memperlambat proses penghancuran antigen dalam tubuh sehingga akan

terjadi kontak lebih lama dengan *makrofag* dan *limposit* serta merangsang pembentukan sistem imun yang tinggi (Hadie dkk., 2010). *Adjuvant* yang menghasilkan tingkat titer antibodi tertinggi adalah FIA dan  $KAl(SO_4)_2$  dengan tingkat imunogenisitas tertinggi hingga  $2^5$  dibandingkan jenis *adjuvant* yang lainnya.

Vaksin dengan penambahan *adjuvant* yang disuntikkan ke tubuh ikan akan masuk ke ginjal bagian depan dan dapat meningkatkan respon imun adaptif terhadap vaksin (Anderson, 1997). Dalam ginjal bagian depan, *makrofag* dan *neutrofil* akan memakan antigen atau vaksin yang masuk ke dalam tubuh ikan melalui proses *fagositosis* lalu dibawa menuju timus untuk memicu aktivasi sel T (Firdaus, 2004). *Adjuvant* yang ditambahkan ke dalam vaksin akan membantu pemindahan antigen ke sel T di mana mereka dapat dikenali oleh sel T. Hal ini pada akhirnya akan menyebabkan aktivitas sel T meningkat. Sel T mengekspresikan antigen tersebut ke reseptor khusus yang dikenali sebagai kompleks histokompatibilitas utama *Major histocompatibility complex* (MHC). Lalu antigen tersebut dibawa menuju limpa, di limpa akan terjadi pelepasan *sitokin* membentuk sel B. Dalam proses ini *adjuvant* juga menginduksi pelepasan *sitokin inflamasi* yang tidak hanya merekrut sel B dan T pada situs infeksi tetapi juga meningkatkan aktivitas transkripsi yang menyebabkan peningkatan dari sel-sel kekebalan tubuh secara keseluruhan. *Sitokin* juga akan memperluas populasi sel darah seperti *limposit*, *monosit*, *neutrofil*, dan *makrofag* (Anderson, 1997). Sel B sebagian melakukan proliferasi atau

memperbanyak diri dan sebagian lagi berdiferensiasi menjadi sel plasma dan sel B memori sebagai sistem kekebalan humoral (Firdaus, 2004). *Adjuvant* dapat memberikan perlindungan fisik terhadap antigen yang akan memperlambat proses penghancuran dalam tubuh. Sehingga pada akhirnya *adjuvant* diyakini dapat meningkatkan kualitas respon dari kekebalan antibodi yang dihasilkan (Hadie dkk., 2010).

FIA merupakan *adjuvant* yang berbentuk cairan minyak mineral kental berwarna putih yang homogen dan tidak dapat menyebar apabila diteteskan pada permukaan air. FIA tidak mengandung sel bakteri yang telah mati, inokulumnya disusun hanya oleh air dalam emulsi minyak sehingga menghasilkan minyak mineral (Stills, 2005). FIA yang berbentuk minyak mineral akan menyelimuti dan melepaskan antigen secara perlahan-lahan sehingga antigen sulit dihancurkan oleh *makrofag*, mentransportasi antigen ke seluruh sistem *limfatik*, serta berinteraksi dengan antigen termasuk *fagosit*, *makrofag*, dan *sel dendrite* membuat sistem kekebalan tubuh lebih kuat karena diperlukan waktu tambahan dalam memproduksi sel B dan T untuk memori imunologis yang lebih besar dalam respon imun adaptif (Hadie dkk., 2010).

$\text{Al}(\text{OH})_3$  dan  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$  merupakan *adjuvant* dari jenis garam-garaman.  $\text{Al}(\text{OH})_3$  tidak dapat bereaksi secara sederhana dengan air dan tidak dapat larut dalam air walaupun masih mengandung ion oksida, tetapi terlalu kuat berada dalam kisi padatan untuk bereaksi dengan air. Sedangkan  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$  sangat mudah larut dalam air (Hem dan Harm, 2007).  $\text{Al}(\text{OH})_3$  dan  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$  menyebabkan terjadinya ikatan antigen melalui gaya elektrostatik dengan interaksi ikatan hydrogen yang saling tarik menarik sehingga memperlambat pengancuran antigen oleh *makrofag* (Stills, 2005).

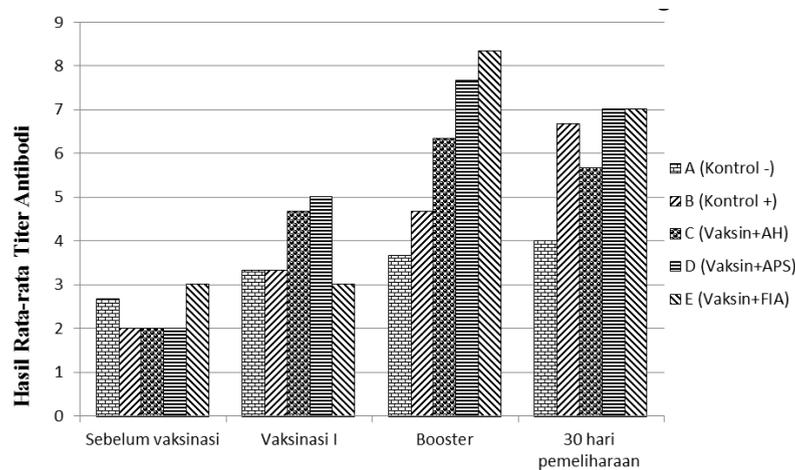
Dari hasil penelitian,  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$  memiliki tingkat imunogenisitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan  $\text{Al}(\text{OH})_3$  dikarenakan  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$  memiliki sifat garam-garaman yang larut di dalam air dibandingkan  $\text{Al}(\text{OH})_3$  yang bersifat hidropobik. Hal ini menyebabkan  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$  mudah diikat dan diangkut dalam limpa ke darah, kemudian diekskresikan menuju ginjal.  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$  lebih cepat didistribusikan ke jaringan-jaringan, dan memiliki tingkat penyebaran dan penyerapan yang lebih cepat dibandingkan  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (Hem dan Harm, 2007).

Tabel 1. Hasil Titer Antibodi Pada Ikan Mas

No	Perlakuan	Sebelum vaksinasi	Vaksinasi I	Booster	30 hari pemeliharaan	Rata-rata
1	A (Kontrol -)	2.667	3.33	3.667	4	3.416 <sup>a</sup>
2	B (Kontrol +)	2	3.33	4.667	6.667	4.166 <sup>a</sup>
3	C (Vaksin+ $\text{Al}(\text{OH})_3$ )	2	4.667	6.33	5.667	4.666 <sup>a</sup>
4	D (Vaksin+ $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ )	2	5	7.667	7	5.41675 <sup>a</sup>
5	E (Vaksin+FIA)	3	3	8.33	7	5.3325 <sup>a</sup>

Keterangan : 1. Huruf yang sama ke arah kolom menunjukkan tidak berbeda nyata ( $p > 0.05$ )

2. Nilai hasil rata-rata titer dalam  $^2\log_2$



Gambar 1. Hasil Rata-rata Titer Antibodi dalam  $^2\log_2$

Efektifitas vaksinasi dipengaruhi oleh beberapa faktor yang salah satunya adalah kualitas air. Kualitas air dapat mempengaruhi fisiologi ikan dalam hubungannya dengan pembentukan antibodi (Isnansetyo, 1996). Berdasarkan Tabel 2 dapat dilihat hasil pengukuran kualitas air selama pemeliharaan, kisaran oksigen terlarut (DO) 3-7,29, suhu berkisar 28-30<sup>0</sup> C, dan pH air berkisar 6-7. Menurut Cholik dkk. (1986), parameter kualitas air yang baik untuk pemeliharaan ikan mas adalah DO >3, suhu berkisar antara 25-32<sup>0</sup> C, dan pH air berkisar

6,88-6,79. Secara umum hasil pengukuran suhu dan DO selama penelitian masih berada dalam kisaran optimum untuk kelangsungan hidup ikan mas, walaupun hasil pengukuran pH sedikit dibawah kisaran optimum namun tidak menimbulkan efek negatif bagi ikan selama masa pemeliharaan. Menurut Firdaus (2004) bahwa pada ikan, suhu lingkungan yang tinggi tetapi masih dalam batas toleransi umumnya akan mempercepat produksi antibodi dan meningkatkan reaksi antibodi yang dihasilkan.

Tabel 2. Data Kisaran Kualitas Air Selama Penelitian

No	Perlakuan	Parameter		
		DO (ppm)	Suhu ( <sup>0</sup> C)	pH
1	A	3,13-7,29	28-30	6-7
2	B	3-7,69	28-30	6-7
3	C	3-6,24	28-30	6-7
4	D	3,18-6,87	28-30	6-7
5	E	3,21-6,59	28-30	6-7
<b>Baku Mutu *)</b>		>3	25-32	6,88-6,97

\*) Menurut Cholik, 1986

## Kesimpulan

Pemberian vaksin inaktif *A. salmonicida* dengan penambahan *Adjuvant* jenis FIA dan  $KAl(SO_4)_2$  menghasilkan tingkat titer antibodi tertinggi hingga  $2^5$  dibandingkan jenis *adjuvant* yang lainnya.

## Daftar Pustaka

- Alifuddin, M. 2002. Immunostimulasi Pada Hewan Akuatik. *J. Akuakultur Indonesia*, 1(2): 87–92.
- Anderson, D.P. 1997. Adjuvant and Immunostimulants For Enhancing Vaccine Potency In Fish. Hal 257-256 In: *Fish Vaccinology*. Gudding, R., Lillehaug, A., Midtlyng, P.J., and Brown, F.Leds. Der Bid Stand. Basel. Kager. 484 (90): 257-265.
- Astuti, P., Alam, G., Pratiwi, S., Hertiani, T., dan Wahyuono, S. 2003. Skrining Senyawa Anti Infeksi Dari Spons Yang Dikoleksi dari Bunaken, Manado. *Biota* 127 (8): 47-52.
- Cholik, F., Artati dan R. Arifudin. 1986. *Pengelolaan Kualitas Air Kolam*. INFIS Manual seri nomor 36. Dirjen Perikanan. Jakarta. 52 Hal.
- Fikri A, Sigit E.P., Afifah, N.H., Hendry T.S., Rafiqah H. dan Siti I.O.S. 2002. Pengembangan KIT Diagnostik Untuk Deteksi Daging Babi Dengan Antibodi Poliklonal. *Buletin Penalaran Mahasiswa UGM* 02 (10): 2-5.
- Firdaus, A. 2004. *Pengaruh Pemberian Vitamin C Dalam Percobaan Immunoprolifaksis Terhadap Infeksi Bakteri *Streptococcus iniae* Pada Ikan Nila (*Oreocromis niloticus Linne*)*. Program Studi Teknologi Dan Managemen Akuakultur. Departemen Budidaya Perikanan. Fakultas Perikanan dan Kelautan. Institut Pertanian Bogor. 47 hal.
- Hadie, W., Angela, M. L., Sularto, dan Evi, T. 2010. Imunitas Maternak Terhadap *Aeromonas hydrophila*: Pengaruhnya Terhadap Fekunditas dan Daya Tetas Ikan Patin Siam (*Pangasionodon hypophthalmus*). Pusat Riset Perikanan Budidaya: Jakarta Selatan. *J. Ris. Akuakultur* (8): 229-235.
- Hem, S.L dan Harm, H. 2007. Aluminium-Containing Adjuvants: Properties, Formulation, and Use. Hal 81-114 In: *Vaccine adjuvant s And Delivery Systems*. Monmohan Singh (ed). Novartis Vaccines Emeryville, California. 470 hal.
- Ibrahem, M.D., Arab,R. Mostafa, M dan Rezk, M. A. 2008. Evaluation Of Different Vaccination Strategies For Control Of (Mas) In Nile Tilapia (*O. Niloticus*) In Egypt. 8th International Symposium On Tilapia In Aquaculture 1157-1175 pp
- Isnansetyo, A. 1996. Penambahan Vitamin C Pada Pakan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) Untuk Meningkatkan Tanggap Kebal Terhadap Vaksin *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Perikanan UGM (GMU J. Fish. Sci.* (1):35-41
- Kamiso, H. N., Alim, I., Triyanto, Muhammad, M dan Lili, S. 2005. Efektifitas Vaksin Polivalen Untuk Pengendalian Vibriosis Pada Kerapu Tikus (*Cromileptes*

- altivelis*). Jurnal Perikanan (J.Fish Sci) 8 (2): 95-100.
- Nur. Sukenda dan D, Dana. 2004. Ketahanan Benih Ikan Nila Gift (*Oreochromis niloticus* Linn.) dari Hasil Induk Yang Diberi Vaksin Terhadap Infeksi Buatan *Streptococcus iniae*. Jurnal Akuakultur Indonesia, 3(1): 37-43.
- Radji, M. 2010. *Imunologi dan Virologi*. PT. Isfi Penerbitan: Jakarta Barat. 323 Hal.
- Rajput, Z. Iqbal., HU,S., Xiao,C., dan Arijo, A.G. 2007. Adjuvant Effects Of Saponins On Animal Immune Responses. *Journal of Zhejiang University Science B*. 8(3):153-161
- Retmonojati, K. 2007. *Penyimpanan Vaksin Polivalen *Vibrio* dengan Penambahan Adjuvant dan Gliserol*. (Skripsi). Jurusan Perikanan. Fakultas Pertanian. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta. 29 Hal.
- Roberson, B.S. 1990. Bacterial Agglutination. In: *Techniques In Fish Immunology* J. S. Stolen, T. C. Fletcher, D. P. Anderson, B. S. Roberson, and W. B. Van Muiswinkel (eds). SOS Publication, Fair Haven, New Jersey. Hal 81-86
- Soeripto.2002. Pendekatan Konsep Kesehatan Hewan Melalui Vaksinasi. *Jurnal Litbang Pertanian*, 21(2): 48-55.
- Stills, H. F. 2005. *Adjuvant s and Antibodi Production: Dispelling The Myths Associated With Freund's Complete and Other adjuvant 's*. *ILAR Journal*. 293 (46): 280-293.