

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/jra>

PROFIL FARMAKOKINETIK OKSITETRASIKLIN PADA IKAN LELE, *Clarias gariepinus* DENGAN INFEKSI ARTIFISIAL *Aeromonas hydrophila*

Tatik Mufidah^{*)#}, Sukenda^{*)#}, Widanarni^{*)}, Huda Shalahudin Darusman^{*)}, dan Angela Mariana Lusiastuti^{**)}

^{*)} Departemen Akuakultur, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor
Jl. Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680

^{**)} Departemen Anatomi Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor
Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680

^{**)} Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan Bogor
Jl. Sempur No. 1, Bogor 16129

(Naskah diterima: 23 Mei 2022; Revisi final: 7 Juni 2022; Disetujui publikasi: 7 Juni 2022)

ABSTRAK

Oksitetrasiklin banyak digunakan dalam manajemen terapeutik maupun preventif infeksi penyakit bakterial pada akuakultur. Konsentrasi obat yang tepat dalam tubuh penting untuk kemanjuran terapi tidak hanya ditentukan oleh dosis obat tetapi juga farmakokinetik obat yang dapat diketahui dari parameter farmakokinetiknya. Parameter farmakokinetik meliputi waktu paruh, kadar puncak, waktu puncak, volume distribusi, area di bawah kurva (AUC), eliminasi, dan distribusi obat baik dalam keadaan fisiologi maupun patologi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui parameter farmakokinetik dan waktu henti obat (*withdrawal time*) oksitetrasiklin yang diberikan secara oral pada ikan lele yang diinfeksi dengan *Aeromonas hydrophila*. Kondisi patofisiologi yang memengaruhi mekanisme kerja obat akibat infeksi *A. hydrophila* diketahui dengan pengamatan histologi. Visualisasi keberadaan bakteri *A. hydrophila* pada organ ikan lele menggunakan imunohistokimia. Konsentrasi obat dalam plasma diukur dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Studi ini mengungkapkan farmakokinetik obat dan waktu henti obat yang berbeda pada ikan sehat/tidak diinfeksi dan sakit/diinfeksi *A. hydrophila*. Kadar oksitetrasiklin pada plasma ikan sehat 229,00 mg/L dan ikan terinfeksi *A. hydrophila* 99,16 mg/L yang dicapai pada 1,5 jam setelah pemberian. Area di bawah kurva yang menggambarkan jumlah obat dalam sirkulasi sistemik pada ikan sehat sebesar 943,6 mg.h/L; sedangkan pada ikan sakit sebesar 814,05 mg.h/L. Area di bawah kurva untuk waktu tak terhingga pada ikan sehat 1.586,42 mg.h/L dan 1.516,47 mg.h/L. Waktu paruh pada ikan sehat 9,36 jam dan ikan tidak terinfeksi 9,65 jam. Pengamatan histologi pada organ yang berperan dalam mekanisme obat yaitu hati, ginjal, dan usus mengalami kelainan patologi. Visualisasi *A. hydrophila* dengan imunohistokimia menunjukkan bakteri banyak terlokalisasi dalam lumen pembuluh darah. Waktu henti obat setelah 10 hari pemberian dengan dosis terapeutik yaitu 20 hari pada ikan sehat dan 30 hari pada ikan sakit. Sebagai kesimpulan kadar oksitetrasiklin pada plasma ikan sehat lebih besar daripada ikan sakit, dan diikuti dengan perbedaan pada parameter farmakokinetik lainnya dan waktu henti obat yang lebih lama pada ikan sakit.

KATA KUNCI: oksitetrasiklin; farmakokinetik; *Aeromonas hydrophila*; *Clarias gariepinus*; imunohistokimia

ABSTRACT: *Pharmacokinetic profile of oxytetracycline in catfish, Clarias gariepinus with Aeromonas hydrophila artificial infection. By: Tatik Mufidah, Sukenda, Widanarni, Huda Shalahudin Darusman, and Angela Mariana Lusiastuti*

Oxytetracycline is widely used in the therapeutic and preventive management of bacterial infections in aquaculture. The accurate concentration of drug in the body is important for therapeutic efficacy not only determined by the dose but also the pharmacokinetics of the drug which can be known from its pharmacokinetic parameters. Pharmacokinetic parameters include half-life, maximum concentration, time of maximum concentration, volume distribution, area under

Korespondensi: Departemen Akuakultur, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
Jl. Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor, Indonesia
E-mail: sukenda@apss.ipb.ac.id

the curve (AUC), elimination, and distribution of the drug in both physiological and pathological conditions. This study aimed to determine the pharmacokinetic parameters and withdrawal time of oxytetracycline administered orally to uninfected and infected catfish infected with *Aeromonas hydrophila*. Pathophysiological conditions that affect the drug's mechanism of action due to infection with *A. hydrophila* by histological observations. Visualization of *A. hydrophila* bacteria in catfish organs using immunohistochemical assay. The plasma drug concentration was measured by high performance liquid chromatography (HPLC). This study revealed different drug pharmacokinetics parameters and withdrawal time of uninfected and infected fish with *A. hydrophila*. Oxytetracycline levels in the plasma of the uninfected fish were 229.00 mg/L and 99.16 mg/L in infected fish which were reached 1.5 hours after administration. The area under the curve that describes the amount of drug in the systemic circulation of uninfected fish is 943.6 mg.h/L, while in infected fish is 814.05 mg.h/L. The area under the curve for infinitive depicting the amount of drug in the systemic circulation in uninfected fish was 943.6 mg.h/L, while in infected fish was 814.05 mg.h/L. Histological observations on the organs that play a role in the drug mechanism, to be specific on the liver, kidney, and intestine showed pathological abnormalities. Visualization of *A. hydrophila* by immunohistochemistry showed that bacteria were located in the lumen of blood vessels. The withdrawal time of oxytetracycline after 10 days of administration in uninfected and infected fish were 20 and 30 days, respectively. In conclusion, plasma levels of oxytetracycline in uninfected fish were greater than in infected fish and were followed by differences in other pharmacokinetic parameters and longer drug withdrawal times in infected fish.

KEYWORDS: oxytetracycline; pharmacokinetic; *Aeromonas hydrophila*; *Clarias gariepinus*; immunohistochemistry

PENDAHULUAN

Penyakit *motile aeromonas septicaemia* (MAS) disebabkan oleh infeksi *A. hydrophila* pada ikan lele menimbulkan kerugian ekonomi pada perikanan budidaya. *A. hydrophila* dikenal sebagai patogen sekunder yang terkait dengan wabah penyakit, akan tetapi dapat menjadi patogen utama yang menyebabkan wabah dengan tingkat kematian tinggi pada budidaya ikan lele di seluruh dunia (Marinho-Neto *et al.*, 2019; Xia *et al.*, 2021). Dewasa ini pengendalian infeksi *A. hydrophila* dilakukan dengan vaksinasi, penggunaan bahan-bahan herbal, imunostimulan, probiotik, dan obat-obatan misalnya antibiotik (Sughra, 2021; Mzula *et al.*, 2019).

Penggunaan bahan-bahan antibakteri untuk penanggulangan serangan penyakit bakterial biasanya menggunakan antibiotik baik yang bersifat bakterisidal maupun bakteriostatik. Penggunaan antibiotik diketahui mampu membunuh patogen dan menjanjikan kesembuhan pada ikan yang sedang terinfeksi (Alderman & Hastings, 1998; Cabello, 2006; Teuber, 2001). Sisi lain dari penggunaan antibiotik adalah dampaknya pada keamanan produk perikanan, resistensi mikroba dan cemaran lingkungan budidaya. Oleh karena itu, tata laksana penggunaan antibiotik yang tepat, hati-hati dan bertanggung jawab seperti yang tertuang dalam konsensus WHO mengenai *anti-microbial stewardship* (WHO, 2021) harus dilakukan untuk meminimalisir dampak yang tidak diharapkan. Pemerintah Indonesia melalui Kementerian Kelautan dan Perikanan mengatur penggunaan antibiotik dalam keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia Nomor 52/KEPMEN-KP/2014 tentang Klasifikasi Obat Ikan. Oksitetrasiklin merupakan salah satu antibiotik yang diperbolehkan penggunaannya

dalam surat keputusan tersebut. Oksitetrasiklin merupakan golongan antibiotik berspektrum luas yang aktif terhadap gram positif maupun gram negatif, aerobik dan anaerobik dengan mekanisme kerja bersifat bakteriostatik menghambat sintesis protein bakteri pada ribosomnya (Ganiswara, 2009; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2018). Dalam budidaya perikanan oksitetrasiklin banyak digunakan untuk menanggulangi infeksi penyakit bakterial salah satunya infeksi MAS pada ikan lele.

Tindakan terapi pengobatan pada ikan sakit akan aman dan mendapatkan hasil optimal apabila dilakukan sesuai aturan yang benar. Peningkatan akurasi pengobatan dapat dijelaskan melalui kajian pengukuran konsentrasi obat dalam plasma (*plasma level*) yang berkorelasi dengan banyaknya obat yang tersedia dalam tubuh, dan selanjutnya berkorelasi dengan kemampuan obat yang lebih poten. Mekanisme kerja obat pada umumnya terjadi melalui interaksi dengan reseptor pada sel organisme. Obat harus berinteraksi dengan target aksi obat untuk dapat menimbulkan efek (Shergel *et al.*, 2012). Kondisi patologis akibat infeksi penyakit tentu saja akan memengaruhi interaksi dan mengganggu mekanisme kerja obat tersebut. Dilaporkan oleh Al Yahya *et al.* (2017) bahwa pada ikan yang terserang MAS mempunyai lesi patologis pada beberapa organ terutama hati dan ginjal, hal ini tentu akan memengaruhi mekanisme, waktu paruh atau pembersihan obat melalui ginjal (Riviere & Sundlof, 2001) yang akan berbeda dengan ikan sehat dengan fungsi organ yang normal. Keberadaan bakteri *A. hydrophila* pada organ-organ yang berperan dalam proses absorpsi yaitu usus, metabolisme, dan ekskresi obat yaitu hati dan ginjal juga perlu diketahui.

Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui parameter farmakokinetik oksitetrasiklin dalam plasma ikan lele yang diinfeksi dengan *A. hydrophila*, sehingga dapat dikaji kadar obat yang ada dalam tubuh pada waktu tertentu, waktu yang dibutuhkan untuk mencapai kadar obat yang konstan dalam tubuh selama pemberian obat, maupun waktu yang dibutuhkan tubuh untuk membuang obat setelah asupan obat dihentikan. Informasi farmakokinetik obat pada ikan sehat maupun ikan sakit tersebut diharapkan dapat menentukan rekomendasi suatu obat maupun bahan kimia terapeutik untuk terapi penyakit ikan sehingga dapat menjadi model metode pengobatan yang poten, efisien, dan aman bagi produk perikanan dan pada akhirnya akan meningkatkan produksi budidaya.

BAHAN DAN METODE

Ikan Uji

Ikan uji yang digunakan adalah ikan lele (*Clarias gariepinus*) yang telah diaklimatisasi selama dua minggu dan telah memenuhi asumsi *spesifik pathogen free* (SPF). Ukuran ikan uji 14-18 cm dengan bobot 20-22 g yang diperoleh dari pembudidaya di daerah Bogor. Parameter kualitas air disesuaikan dengan SNI 01-7241-2006 yaitu pemeliharaan ikan pada suhu 25°C-30°C; pH 6,5-8,5; oksigen terlarut (*dissolved oxygen* DO) pada 2 mg/L. Setiap minggu dilakukan penggantian air 30% dan penyiponan untuk membuang sisa pakan dan kotoran.

Isolat Bakteri

Isolat bakteri yang digunakan adalah koleksi Instalasi Riset Pengendalian Penyakit Ikan Depok, Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan Bogor dengan kode MH3. Pembuatan isolat bakteri dilakukan dengan menumbuhkan bakteri selama 24 jam dalam media *tryptic soy agar* (TSA) dengan inkubasi 24 jam, selanjutnya diambil sebanyak satu koloni terpisah dan ditumbuhkan pada 10 mL media cair (*tryptic soy broth*/TSB). Biakan pada media cair bakteri *A. hydrophila* kemudian diinkubasi dalam *incubator shaker* selama 24 jam pada suhu ruang. Biakan bakteri kemudian dicuci tiga kali dengan salin melalui sentrifugasi pada kecepatan 4.000 rpm selama 10 menit.

Infeksi Buatan *A. hydrophila* dan Rute Pemberian Obat

Ikan uji *C. gariepinus* dibagi menjadi dua kelompok, pada kelompok pertama sebanyak 300 ekor ikan lele digunakan untuk analisis parameter farmakokinetik. Kelompok kedua merupakan kelompok untuk pengamatan pengukuran *withdrawal*

time dan *survival rate* (SR). Pada kelompok dua, penelitian dilakukan dengan tiga perlakuan dan tiga kali ulangan. Infeksi *A. hydrophila* pada kedua kelompok ikan uji dilakukan dengan injeksi isolat bakteri aktif secara intra muskular. Injeksi dilakukan dengan dosis 0,1 mL dan konsentrasi bakteri sebanyak 10^9 CFU/mL.

Oksitetrasiklin komersial (400 mg oksitetrasiklin dalam 1 g produk) diberikan sebagai dosis tunggal 50 mg oxytetrasiklin/kg BB (Hughes, 2003) pada kelompok satu. Pemberian obat oral dilakukan dengan mencampur sediaan obat dengan air kemudian diberikan melalui metode oral dengan *gavage*. Pemberian oksitetrasiklin pada ikan sakit dilakukan pada 24 jam setelah infeksi buatan dan terlihat gejala klinis dan kelainan patologis. Pada kelompok dua Oxy-San dosis 50 mg oxytetrasiklin/kg BB diberikan secara oral dengan dengan dicampur pakan dan diberikan selama 10 hari sesuai aturan pada etiket obat.

Koleksi Sampel

Analisis profil farmakokinetik dilakukan sesuai metode yang dikembangkan oleh Intorre *et al.* (2000) dan Hughes (2003) dengan modifikasi. Dari masing-masing perlakuan sebanyak 10 ekor ikan dianestesi kemudian diambil sampelnya. Koleksi sampel plasma ikan dilakukan pada 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 4; 6; 8; dan 12 jam untuk mengetahui profil farmakokinetik. Parameter farmakokinetik yang akan dianalisis yaitu area di bawah kurva (*area under curve*/AUC) baik AUC total (AUC_{tot}) dan AUC waktu tak terbatas (AUC *infinite*/AUC_{inf}) yang menunjukkan konsentrasi obat dalam plasma terhadap waktu pada fase absorpsi obat, waktu paruh (*half-life*/T_{1/2}), volume distribusi (Vd) (mL), klierens (*clearance*/Cl), konsentrasi maksimal (C_{max}), waktu maksimal (T_{max}), dan tetapan laju ekskresi (*ke*). Koleksi sampel plasma dilakukan dengan mengambil darah ikan sebanyak 0,3 mL dari arteri kaudal dengan jarum yang telah mengandung heparin. Sampel darah disentrifugasi pada 3.000 rpm selama 10 menit. Plasma kemudian dikoleksi dan disimpan pada suhu -20°C sampai diuji (Hughes, 2003). Koleksi sampel otot ikan lele untuk mengetahui *withdrawal time* dimulai pada hari terakhir pemberian OTC (hari ke-0) sampai hari ke-2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 17; 20; 25; 35 setelah penghentian pemberian OTC (Hughes, 2003). Untuk pemeriksaan histologi dan imuno-histokimia dilakukan koleksi jaringan ginjal, hati, dan usus yang disimpan pada buffer paraformaldehyde 4%.

Histologi

Sampel organ yang telah disimpan dalam *buffer neutral formalin* (BNF) 10% untuk kemudian dibuat preparat histopatologi. Prosedur pemeriksaan dengan histopatologi dilakukan dengan pemotongan jaringan

(trimming) dengan ketebalan jaringan 5 mm. Pembuatan preparat histopatologi selanjutnya dilakukan sesuai metode baku dengan pewarnaan (staining) Mayer-Haematoxylin-eosin (H&E). Pemeriksaan lesi jaringan ikan dilakukan dengan mikroskop.

Imunohistokimia Bakteri *A. hydrophila*

Pewarnaan imunohistokimia dilakukan untuk mendeteksi sel bakteri *A. hydrophila* menggunakan serum hiperimun kelinci yang telah diimunisasi bakteri *A. hydrophila* (serum koleksi Instalasi Riset Pengendalian Penyakit Ikan, Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan (BRPBATPP), Bogor. Metode yang digunakan mengacu pada metode standar pengujian imunohistokimia pada Pusat Studi Satwa Primata, Institut Pertanian Bogor (IPB); dengan modifikasi metode yang dikembangkan oleh Adams & de Mateo (1994) dan Mahrous *et al.* (2020).

Slide potongan jaringan dalam parafin terlebih dahulu dideparafinisasi, rehidrasi, dan direndam dalam akuades selama tiga menit. Selanjutnya selama 30 menit dilakukan *blocking endogenous peroksidase* dalam etanol. Inkubasi dengan *background sniper* selama 30 menit pada suhu 37°C dilakukan untuk mengikat protein non-spesifik. Selanjutnya slide diinkubasi dengan serum normal 10% selama 30 menit pada suhu 37°C. Slide kemudian diinkubasi dengan tripsin 0,2% dalam CaCl₂ selama 120 menit pada suhu ruang dan kemudian ditetesi dengan antibodi pertama yaitu serum hiperimun dari kelinci dengan pengenceran 1:500 dan diinkubasi semalaman pada suhu 4°C, selanjutnya antibodi kedua yaitu *anti rabbit biotinilated antibody* diaplikasikan selama 30 menit pada suhu 37°C dan dilanjutkan inkubasi dengan *Streptavidin horseradish peroksidase*. Pada setiap pergantian langkah dibilas dengan PBS 3x.

Prosedur Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)/High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Ekstraksi sampel plasma dilakukan menurut prosedur yang dikembangkan oleh Hughes (2003), plasma dicairkan kemudian difiltrasi dengan tabung *MPS micropartition* (Millipore, Bedford, MA) yang dilengkapi membran *disposable ultrafiltration YMT* dengan *cut off* 3000 MW (Amicon, Inc., Beverly, MA) dan disentrifugasi pada 14.000 x g selama 40 menit (Thermo Scientific, CL10 Centrifuge). Ultrafiltrat dari sampel (20 µL) kemudian disuntikkan langsung ke kolom HPLC.

Ekstraksi senyawa dari jaringan otot dilakukan dengan homogenisasi 1 g jaringan otot yang dicairkan di dalam 4 mL buffer HPLC kemudian disonikasi selama 10 detik pada 20 kHz. Larutan kemudian disentrifugasi

pada 2.000 x g selama 15 menit, supernatan dikumpulkan dan disaring dengan filter 0,45 µm kemudian disimpan pada -20°C untuk analisis HPLC. Kolom yang digunakan adalah Hypersil 3 mikron C-18, 150 mm x 4,6 mm ID (Phenomenex, Torrance, CA). Sistem HPLC terdiri atas unit kromatografi GBC *scientific instruments* yang dilengkapi dengan injektor sampel manual dan 126 *solvent delivery modul* (GBC). Efluent HPLC dianalisis dengan detektor panjang 355 nm, fase gerak (pH 3,3) adalah campuran 70:30 dari fase gerak *aqueous* (asam oksalat 0,01M dan garam natrium asam oktan sulfonat 0,03M) dan fase gerak organik (asetonitril) (Meinertz *et al.*, 1998). Campuran ini disimpan dalam wadah tertutup dan diaduk untuk mencegah pemisahan fase. Laju aliran adalah 1,5 mL/menit, dengan masing-masing sampel berjalan sekitar 10 menit.

Data diproses oleh perangkat lunak Winchrome. Konsentrasi standar oksitetrasiklin yang digunakan 0,05-50,0 g/mL untuk menetapkan garis regresi dan menghitung konsentrasi OTC yang tidak diketahui. Kurva regresi kalibrasi ditolak jika kurang dari 0,995. Untuk mengetahui waktu yang dibutuhkan untuk mengurangi konsentrasi obat dalam plasma atau jumlah total dalam tubuh sebesar 50% (waktu paruh/ $T_{1/2}$), dipergunakan rumus perhitungan:

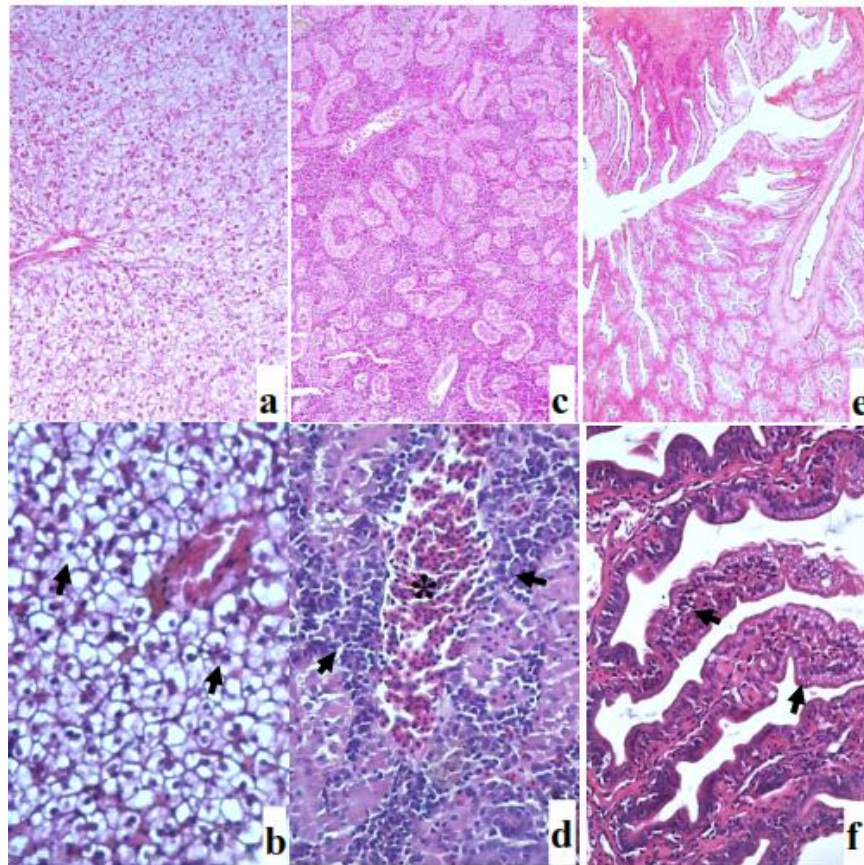
$$T_{1/2} = \frac{0.693}{K_e}$$

Analisis Data

Konsentrasi oksitetrasiklin pada plasma dan otot diperoleh dari kromatogram yang dijabarkan sebagai grafik konsentrasi versus waktu, parameter farmakokinetik dihitung dengan model satu kompartemen dan AUC oksitetrasiklin dalam plasma ditentukan menggunakan metode trapesium (Shargel *et al.*, 2012).

HASIL DAN BAHASAN

Hasil pengamatan histologi terlihat lesi patologi pada organ ginjal, hati, dan usus ikan sakit, sedangkan pada ikan sehat menunjukkan tampak normal dengan vena sentral dan morfologi sel yang utuh (Gambar 1). Pada ikan sakit kongesti pembuluh darah besar tampak pada organ ginjal dan hati, infiltrasi multifokal sel-sel radang mononuklear pada area parenkim terjadi pada ginjal sedangkan mayoritas sel hepatosit mengalami degenerasi. Pada pada multifokal area mukosa usus juga terdapat infiltrasi sel radang mononuklear dan agregasi sel darah di sekitar pembuluh darah. Gupta *et al.* (2018) dan Biswas *et al.* (2021) menyatakan bahwa jaringan ginjal dari ikan yang terinfeksi *A. hydrophila* menunjukkan degenerasi tubulus ginjal, sel nekrotik dalam jaringan hematopoietik, dan adanya ruang si-



Gambar 1. Pewarnaan HE pada beberapa organ ikan uji (pembesaran 40x). (a) hati ikan sehat tampak normal; (b) organ hati ikan sakit, panah menunjukkan sel-sel hepatosit mengalami degenerasi; (c) ginjal ikan sehat terlihat glomeruli dan tubulus ginjal utuh; (d) ginjal ikan sakit [tanda panah menunjukkan infiltrasi multifokal sel-sel radang mononuklear, tanda * menunjukkan kongesti pada pembuluh darah]; (e) usus ikan sehat; (f) usus ikan sakit, terlihat infiltrasi sel radang.

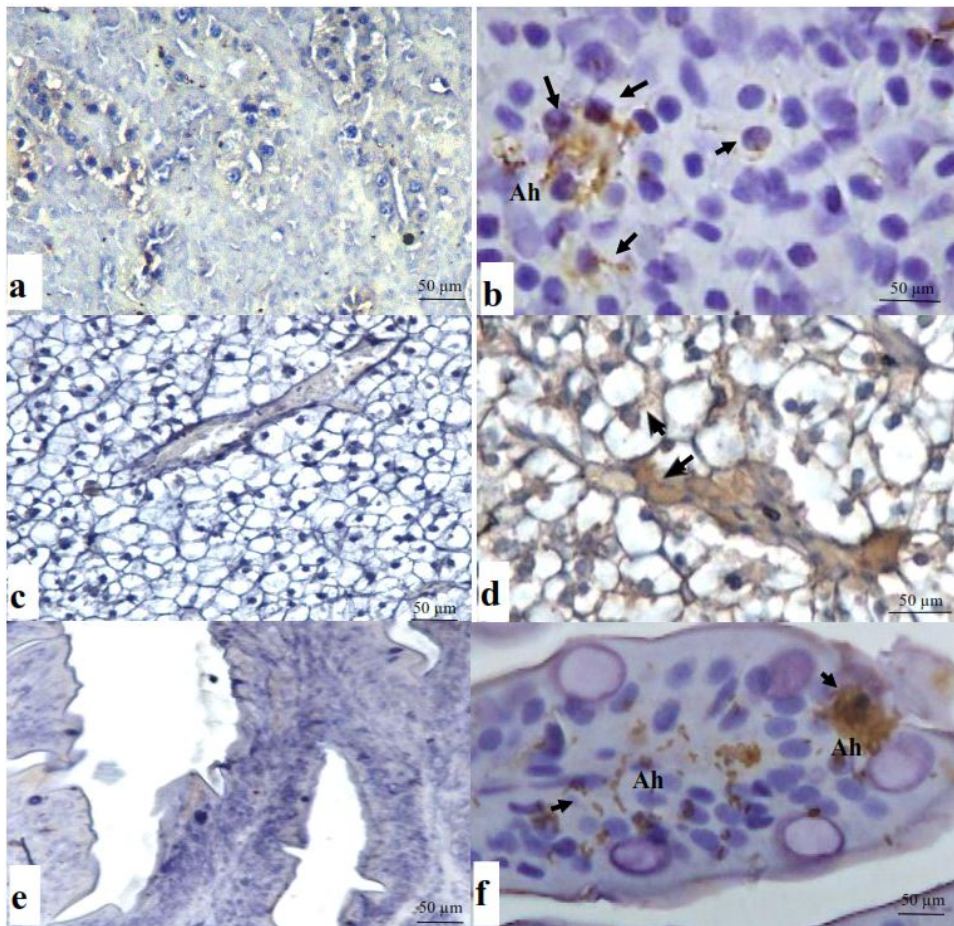
Figure 1. HE staining on several experimental fish organs (40x magnification). (a) liver of healthy fish looks normal, (b) liver of the infected fish, arrows show degeneration on hepatocyte cells; (c) the kidneys of healthy fish show glomeruli and intact renal tubule; (d) diseased fish kidney [arrows show multifocal infiltration of mononuclear inflammatory cells, * indicates congestion of blood vessels]; (e) healthy fish intestines; (f) intestine of infected fish, showed infiltration of inflammatory cells.

nusoid, lebih lanjut mengakibatkan nekrosis, hipertrofi, dan degenerasi glomerulus dan peningkatan ruang Bowman.

Salah satu tujuan pewarnaan imunohistokimia yang dilakukan adalah untuk mengetahui visualisasi *A. hydrophila* yang terdistribusi pada organ ginjal, hati, dan usus ikan uji. Hasil pewarnaan imunohistokimia dapat dilihat pada Gambar 2. Visualisasi imunohistokimia terlihat bahwa *A. hydrophila* menyebar ke organ hati, ginjal, dan usus.

Visualisasi *A. hydrophila* pada ikan terinfeksi terutama pada organ ginjal dan hati tampak berhubungan dengan pembuluh darah, area nekrotik dan rongga tubuh. Setelah injeksi IM pada awal infeksi

A. hydrophila berada dalam lumen pembuluh darah dan dengan cepat mengikuti aliran darah menyebar secara sistemik ke organ target. Hal tersebut menyebabkan kondisi bakteremia yang cepat, yang terdeteksi pada organ hati, usus, dan ginjal, kolonisasi jaringan dan hubungan langsung antara keberadaan *A. hydrophila* dan perkembangan lesi yang tampak dari hasil pengamatan histologi. Lebih lanjut Cosceli *et al.* (2014) menjelaskan bahwa kerusakan pembuluh darah kemungkinan disebabkan oleh nekrosis jaringan akibat hipoksia seluler, serta kerusakan langsung yang disebabkan oleh toksin dan enzim yang disekresikan oleh patogen. Penelitian pada ikan *rainbow trout* yang diinfeksi buatan oleh *A. salmonicida*, hasil pewarnaan dengan imunohistokimia menunjukkan pola yang



Keterangan: (a) ginjal ikan sehat; (b) ginjal ikan sakit, *A. hydrophila* pada jaringan ekstraseluler [tanda panah menunjukkan bakteri *A. hydrophila* (Ah) terlihat difagositosis]; (c) hati ikan sehat; (d) hati ikan terinfeksi *A. hydrophila*; (e) usus ikan sehat; (f) usus ikan terinfeksi *A. hydrophila*, terlihat koloni *A. hydrophila* pada villi usus dan terjadi fagositosis

Description: (a) kidney of healthy fish; (b) kidney of infected fish, **A. hydrophila** in extracellular tissue [arrows indicate phagocytosed **A. hydrophila** (Ah)]; (c) liver of healthy fish; (d) the liver of infected fish; (e) intestine of healthy fish; (f) intestine of infected fish, phagocytosis and colonies of **A. hydrophila** seen in intestinal villi

Gambar 2. Uji imunohistokimia *A. hydrophila* pada beberapa organ ikan lele.

Figure 2. Immunohistochemical assay of **A. hydrophila** in several organs of catfish.

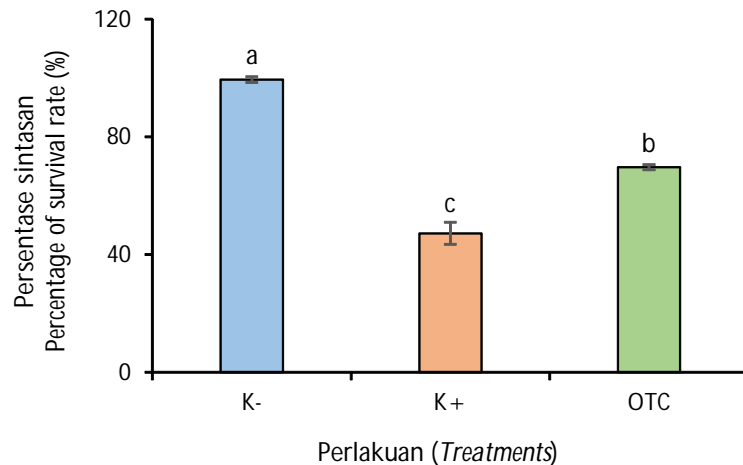
serupa, yaitu sebaran patogen cenderung berhubungan dengan pembuluh darah dan area nekrotik.

Nilai sintasan (SR) pada ikan uji menunjukkan adanya perbedaan nyata ($P < 0,05$) pada ikan sakit yang diobati dengan ikan sakit yang tidak diobati (Gambar 3). Nilai SR tertinggi didapatkan pada ikan sehat yang tidak diinfeksi sebesar $99,44 \pm 0,96$; sedangkan nilai SR untuk ikan sakit tidak diobati dan ikan sakit yang diobati masing-masing $40,67 \pm 0,839$ dan $69,41 \pm 0,89$.

Parameter Farmakokinetik

Hasil pengukuran konsentrasi oksitetrasiklin pada plasma ikan lele setelah pemberian oksitetrasiklin 50 mg/kg secara oral dapat dilihat pada Gambar 4.

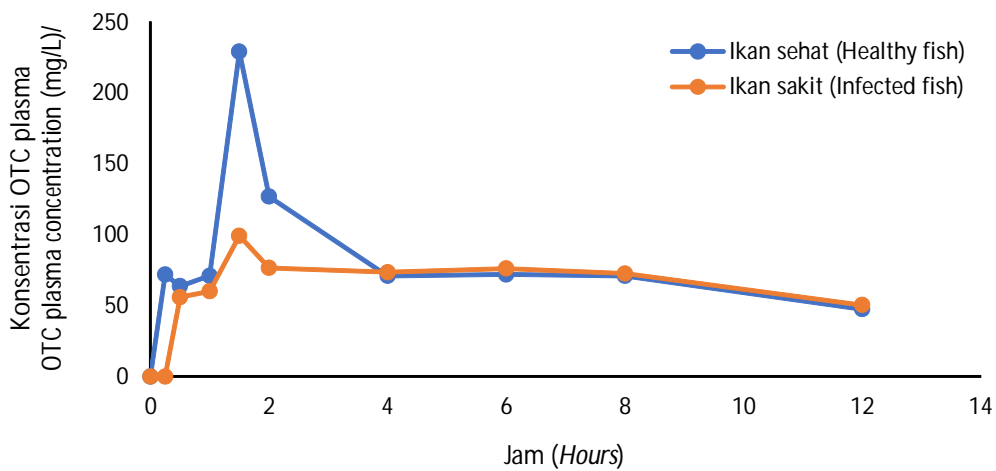
Parameter farmakokinetik yang menggambarkan laju absorpsi obat adalah konsentrasi maksimal ($C_{p_{max}}$), waktu mencapai konsentrasi maksimal (t_{max}), dan tetapan laju absorpsi (k_a). Waktu untuk mencapai konsentrasi maksimal (t_{max}) oksitetrasiklin adalah 1,5 jam setelah pemberian secara oral yang menunjukkan rata-rata laju absorpsi obat. $C_{p_{max}}$ untuk ikan sehat ($229,00$ mg/L) lebih tinggi daripada hewan sakit ($99,16$ mg/L). t_{max} tidak tergantung pada dosis tetapi pada tetapan absorpsi dan eliminasi, demikian pula $C_{p_{max}}$ dan AUC (Shergel *et al*, 2012). $C_{p_{max}}$ ikan sehat lebih tinggi diikuti nilai AUC_{tot} dan AUC_{∞} yang lebih tinggi hal ini berarti konsentrasi obat pada plasma lebih besar pada ikan yang sehat.



Keterangan: K-: kontrol negatif (ikan sehat dan tidak diberi oksitetrasiklin; K+: ikan diinfeksi *A. hydrophila* tanpa diobati oksitetrasiklin; OTC: ikan sakit dengan pengobatan oksitetrasiklin. (Superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata)

Notes: K-: negative control (healthy fish and no oxytetracycline administered; K+: infected fish without oxytetracycline administered; OTC: infected fish with oxytetracycline administered (different superscripts show significant differences)

Gambar 3. Sintasan ikan uji.
Figure 3. Survival rate of experimental fish.



Gambar 4. Konsentrasi oksitetrasiklin pada plasma ikan lele sehat dan sakit dengan pemberian per oral 50 mg/kg BB.

Figure 4. Concentration of oxytetracycline in plasma of healthy and infected fish with oral administration of 50 mg/kg BW.

AUC merupakan parameter farmakokinetik yang menggambarkan besarnya obat mencapai sirkulasi sistemik (Shergel *et al.*, 2012). Rigos & Smith (2015); Shergel *et al.* (2012); dan Hughes (2003) menyatakan ketika ikan sakit, dinamika aliran darah dan fungsi jaringan dapat berubah sehingga penyerapan dan distribusi obat berubah dibandingkan dengan ikan sehat. Uno (1996) mendapatkan hasil bahwa nilai AUC

pada *Plecoglossus altivelis* sehat lebih tinggi dibanding yang terinfeksi vibrio. Lebih lanjut Hughes (2003) melaporkan pemberian oksitetrasiklin secara intra muskular pada *Paralichthys dentatus* sehat memiliki nilai AUC yang lebih tinggi dibanding yang sakit, hal tersebut terjadi karena penurunan daya serap obat pada usus diakibatkan kerusakan oleh bakteri atau toksinnya.

Tabel 1. Profil parameter farmakokinetik oksitetrasiklin pada ikan lele, *C. gariepinus* sehat dan sakit pada pemberian per oral 50 mg/kg BB

Table 1. Pharmacokinetic parameters of oxytetracycline in healthy and infected *C. gariepinus* on oral administration of 50 mg/kg BW

Ikan Fish	Parameter (Parameters)								
	Cp _{max} (mg/L)	t _{max} (h)	AUC _{tot} (mg.h/L)	AUC _∞ (mg.h/L)	T _{1/2} (h)	Vd (mL)	Cl (mL/h)	ka (h ⁻¹)	ke (h ⁻¹)
Sehat (Healthy)	229.00	1.5	943.60	1,586.42	9.39	0.0786	0.0058	7.91	0.0738
Sakit (Infected)	99.16	1.5	814.05	1,516.47	9.65	0.0922	0.0066	1.91	0.0718

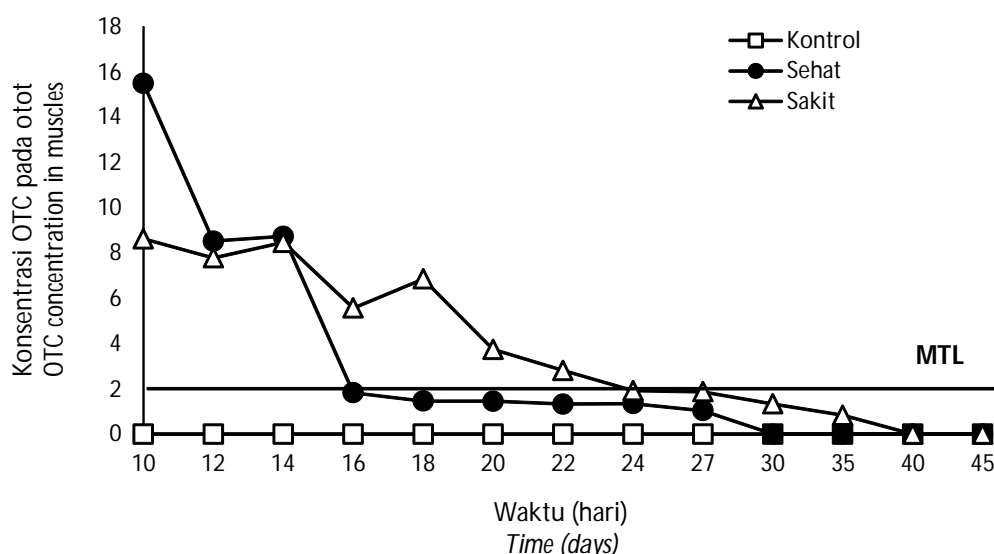
Keterangan: Cp_{max}: konsentrasi maksimal; t_{max}: waktu untuk mencapai konsentrasi maksimal; AUC_{tot}: total area di bawah kurva; AUC_∞: area di bawah kurva untuk waktu tak terhingga (*infinite*); T_{1/2}: waktu paruh; Vd: volume distribusi; Cl: klirens; ka: tetapan laju absorpsi; ke: tetapan laju eliminasi

Note: Cp_{max}: maximum concentration; t_{max}: time to reach maximum concentration; AUC_{tot}: total area under the curve; AUC_∞: area under the curve for infinite time; T_{1/2}: half-life; Vd: volume distribution; Cl: clearance; ka: absorption rate constant; ke: elimination rate constant

Cp_{max} pada ikan sehat lebih besar menunjukkan obat banyak terdistribusi pada jaringan intravaskular yang ditunjukkan dengan nilai V_d yang lebih kecil (0,0786 mL) dibanding V_d ikan sakit (0,0922 mL). Pada ikan sakit V_d lebih besar kemungkinan obat banyak terpusat pada jaringan ekstrasvaskuler misalnya pada perifer dan organ, dan sedikit dalam intravaskuler. Hal ini menunjukkan bahwa dosis obat yang lebih tinggi diperlukan untuk mencapai konsentrasi plasma tertentu. Obat dengan V_d rendah memiliki kecenderungan untuk tetap berada dalam plasma yang berarti dosis obat yang lebih rendah diperlukan untuk mencapai konsentrasi plasma tertentu. Tetapan laju ekskresi ikan sehat 0,0738 per jam dan ikan sakit sebesar 0,0718 per jam, nilai ke didapatkan dari kemiringan (*slope*) kurva plasma terhadap waktu. Waktu paruh oksitetrasiklin pada ikan sakit dibandingkan dengan ikan sehat hampir sama pada (masing-masing 9,39 jam dan 9,65 jam). Waktu paruh merupakan bilangan konstan, tidak tergantung dari besarnya dosis, interval pemberian maupun cara pemberian. Akan tetapi dipengaruhi oleh absorpsi, metabolisme dan ekskresi (Setiawati, 2012). Waktu paruh merupakan parameter farmakokinetik yang penting karena dapat memberikan dasar untuk perhitungan dosis pada pemberian berulang. Sedangkan klirens yang merupakan ukuran eliminasi obat pada tubuh, pada ikan sehat sebesar 0,0058 mL/h dan 0,0066 mL/h pada ikan sakit. Eliminasi obat pada tubuh merupakan proses yang disebabkan oleh metabolisme maupun ekskresi obat melalui ginjal dan rute lain (Shergel *et al.*, 2012). Retensi dan eliminasi obat tertunda pada ikan yang sakit terjadi sebagai akibat dari status fisiologis ikan yang sakit. Parameter ini menunjukkan bahwa OTC dapat bertahan lebih

lama pada ikan yang sakit daripada ikan yang sehat. Keseluruhan laju absorpsi sistemik obat dari suatu bentuk sediaan padat yang diberikan per oral mencakup sejumlah proses laju, termasuk pelarutan obat, motilitas saluran cerna, aliran darah, dan transpor obat melewati membran kapiler ke dalam sirkulasi sistemik. Absorpsi oksitetrasiklin akan menurun apabila bereaksi dengan kation seperti Ca²⁺ dan Mg²⁺ dalam air karena mengakibatkan ikatan yang *irreversibel*. Martinez-Álvarez (2002) menyatakan bahwa ikan air tawar memiliki kadar air dalam otot yang lebih tinggi daripada ikan air laut, yang dapat memengaruhi aliran darah otot, kelarutan obat, dan distribusi obat.

Pengujian waktu henti obat pada ikan uji dilakukan untuk mengetahui keamanan daging ikan lele untuk dikonsumsi setelah pemberian oksitetrasiklin. Penghitungan waktu henti obat dilakukan dengan menambahkan rentang waktu 25% ketika konsentrasi obat dalam jaringan turun di bawah batas toleransi minimal (*minimal tolerance limit* (MTL)) sesuai dengan standar *The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products* (EAEMP) (Gambar 5). Waktu henti obat pada pemberian dosis tunggal per oral OTC 50 mg/kg bobot badan dalam menunjukkan ikan sehat memiliki perkiraan waktu henti obat 20 hari dan ikan sakit memiliki waktu henti obat yang lebih lama yaitu 30 hari (Tabel 2). Standar waktu henti obat oksitetrasiklin pada ikan lele adalah 21 hari (EAEMP, 1996). Pada penelitian ini waktu henti obat pada ikan lele sakit lebih lama, hal ini bisa disebabkan karena kondisi patofisiologi organ akibat infeksi *A. hydrophila*. Di samping itu, oksitetrasiklin dikenal mudah larut lemak dan tidak polar sehingga meskipun diberikan dalam dosis rendah akan tetap diserap dan memerlukan waktu henti agar obat dapat hilang.



Gambar 5. Konsentrasi oksitetrasiklin pada otot setelah hari terakhir pengobatan (garis hitam tebal mewakili batas toleransi maksimal (*maximum tolerance limit* (MTL)) oksitetrasiklin 2 mg/L pada otot oleh FDA (FDA, 2022).

Figure 5. Oxytetracycline concentration after last day administration, the thick black line represents maximum tolerance limit (MTL) of oxytetracycline 2 ppm in the muscle by FDA (FDA, 2022).

Tabel 2. *Withdrawal time* oksitetrasiklin pada ikan lele dengan dosis 50 mg/kg per oral
 Table 2. *Withdrawal time* of oxytetracycline in catfish with a dose of 50 mg/kg orally

Perlakuan <i>Treatments</i>	Konsentrasi oksitetrasiklin 2 mg/L di otot (hari) <i>Concentration of 2 mg/L oxytetracycline in muscle (days)</i>	Perkiraan waktu henti obat (hari) <i>Withdrawal time estimation (days)</i>
Ikan sehat <i>Healthy fish</i>	16	20
Ikan sakit <i>Infected fish</i>	24	30
Kontrol (<i>Control</i>)	0	0

Infeksi *A. hydrophila* mengakibatkan kondisi patofisiologis yang membawa pengaruh pada absorpsi, biotransformasi, metabolisme maupun ekskresi obat. Absorpsi suatu obat bergantung pada sifat fisika kimia obat, sifat produk obat, anatomi, dan fisiologi *site* obat (Shergel *et al.*, 2012). Biotransformasi dan metabolisme obat merupakan proses di mana obat diubah secara kimia dalam tubuh menjadi suatu metabolit dengan menggunakan enzim-enzim yang berada dalam organ hati, ginjal maupun usus. Ginjal dan hati merupakan organ utama dalam eliminasi, dan ginjal juga berperan dalam ekskresi obat. Mekanisme absorpsi obat terjadi melalui difusi pasif yang dipengaruhi oleh pKa obat, pH tempat absorpsi, dan fraksi obat yang tidak terionkan. Hal-hal yang dapat memperlambat atau mempercepat perpindahan obat dari tempat absorpsi ke dalam sirkulasi sistemik akan memengaruhi laju absorpsi obat, misalnya kecepatan

penggosongan lambung (apabila tempat absorpsinya pada saluran cerna) dan peningkatan aliran darah. Sebaliknya penurunan aliran darah disebabkan oleh penyakit akan menghambat absorpsi.

Konsentrasi efektif minimum obat dalam tubuh penting untuk diketahui agar mendapatkan respons terapeutik yang diinginkan. Dalam penelitian ini konsentrasi oksitetrasiklin dalam plasma setelah pemberian secara oral 50 mg/kg BB pada ikan sehat lebih tinggi dibandingkan dengan ikan terinfeksi *A. hydrophila* dan masih dalam rentang nilai MIC yang efektif untuk pengobatan. Shergel *et al.* (2012); Binarjo *et al.* (2018) menyatakan bahwa avinitas obat lebih baik pada individu dengan fungsi organ yang normal daripada yang sakit, sehingga obat lebih terpusat pada jaringan intravaskuler yang berarti konsentrasi obat dalam plasma cukup banyak. Oksitetrasiklin merupakan antibiotik yang aktivitasnya bersifat *time-*

dependent killing (Craig & Gudmundsson, 1996; Craig, 2007), sehingga lamanya waktu kadar obat bertahan di atas MIC sangat penting untuk kemanjuran terapi (Shergel *et al.*, 2012). Manna *et al.* (2022); Ali Abadi & Lees (2000); dan Stamm (1989) menyatakan bahwa konsentrasi puncak obat pada plasma harus melebihi nilai MIC dengan faktor >2 agar diperoleh efek pengobatan yang efektif. Julinta *et al.* (2017); Neowajih *et al.* (2015); dan Prasad *et al.* (2013) menentukan bahwa nilai MIC oksitetrasiklin terhadap *A. hydrophila* dan *Aeromonas* sp. lainnya sebesar 12,5-500 mL/L. Hal berbeda dinyatakan oleh *British Society for Antimicrobial Chemoterapi* (BSAC, 1991) yang menyarankan bahwa untuk memprediksi hasil terapi akan bermanfaat jika C_{max} plasma empat kali lebih besar dari MIC yang ditentukan, meskipun Rigos & Smith (2015) menyatakan aturan 4:1 ini tidak memiliki validasi.

Terapi oksitetrasiklin pada ikan uji yang diinfeksi dengan *A. hydrophila* menunjukkan bahwa pemberian oksitetrasiklin meningkatkan *survival rate* dengan *withdrawal time* 30 hari. Hal tersebut menghindari kerugian ekonomi akibat kematian ikan dan setelah melewati *withdrawal time* ikan aman untuk dikonsumsi.

KESIMPULAN

Pengobatan oksitetrasiklin dengan dosis 50 mg/kg bobot badan mampu meningkatkan *survival rate* ikan sakit sebesar $69,41 \pm 0,89\%$. Pemberian oksitetrasiklin dengan dosis 50 mg/kg bobot badan pada ikan sehat dan ikan sakit menunjukkan bahwa kadar obat dalam plasma ikan sehat lebih besar daripada ikan sakit. Perbedaan konsentrasi oksitetrasiklin dalam plasma menunjukkan bahwa kondisi patofisiologis berkaitan dengan terganggunya fungsi organ akibat infeksi *A. hydrophila* memengaruhi absorpsi, metabolisme, maupun ekskresi oksitetrasiklin yang terlihat dari parameter farmakokinetik dan waktu henti obat yang lebih lama pada ikan sakit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini telah terlaksana dengan sumber dana dari Badan Riset dan Sumber Daya Manusia Kelautan dan Perikanan, Kementerian Kelautan dan Perikanan, Penulis mengucapkan terima kasih atas kerja sama dalam pelaksanaan kegiatan penelitian kepada Bapak Ahmad Wahyudi, Setiadi, Edy Farid Wadjdy, dan Johan Afandi.

DAFTAR ACUAN

Adams, A. & de Mateo, M.M. (1994). Immunohistochemical detection of fish pathogens. Chapter 14, *Techniques in Fish Immunology*. Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Rowley, A.F., Anderson, D.P.,

Kaattari, S.L., Zelikoff, J.T., & Smith, S.A. (Eds.). New Jersey: SOS Publications, Fair Haven, 07704-3303, 3, 133-144.

Alderman, D.J. & Hastings, T.S. (2003). Antibiotic use in aquaculture: Development of antibiotic resistance-potential for consumer health risks. *International Journal of Food Science & Technology*, 33, 139-155. DOI:10.1046/j.1365-2621.1998.3320139.x.

Ali Abadi, F.S. & Lees, P. (2000). Antibiotic treatment for animals: effect on bacterial population and dosage regimen optimisation. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 14(4), 307-313.

Al Yahya, S.A., Ameen, F., Al-Niaeem, K.S., Al-Sa'adi, B.A., & Mostafa, A.A. (2017). Histopathological studies of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in blue tilapia, *Oreochromis aureus*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.10.019>.

BSAC. (1991) A guide to sensitivity testing. Report of the Working Party on Antibiotic Sensitivity Testing of The British Society for Antimicrobial Chemotherapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 23(Suppl D), 1-47.

Cabello, F.C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8, 1137-1144. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x>.

Craig, W. (2007). Pharmacodynamics of antimicrobials: general concepts and applications. In: Nightingale, C., Ambrose, P., Drusano, G., & Murakawa, T. (Eds.). New York: Antimicrobial Pharmacodynamics in Theory and Clinical Practice, Informa Health Care, p. 1-20.

Craig, W. & Gudmundsson, S. (1996). Post-antibiotic effect. In: Lorian, V (Ed.). Baltimore, MD: Antibiotics in Laboratory Medicine, Williams and Wilkins, p. 296-329.

FDA. (2022). Food and drug administration Department of Health and Human Services. Subchapter E: Animal drugs, feeds, and related products, tolerances for residues of new animal drugs in food. part 556.

Ganiswara, S.G. (2009). Farmakologi dan Terapi. Edisi 5. Bagian Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

Hughes, K.P. (2003). *Pharmacokinetic studies and tissue residue analysis of oxytetracycline in summer flounder (Paralichthys dentatus) maintained at different production salinities and states of health*. Dissertation.

- Faculty of Veterinary Medicine Virginia Polytechnic Institute and State University. p. 98-142.
- Intorre, L., Cecchini, S., Bertini, S., Cognetti-Varriale, A.M., Soldani, G., & Mengozzi, G. (2000). Pharmacokinetics of enrofloxacin in the seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 182, 49-59.
- Julinta, R., Roy, A., Singha, J., Abraham, T., & Patil, P.K. (2017). Evaluation of efficacy of oxytetracycline oral and bath therapies in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* against *Aeromonas hydrophila* infection. *International Journal of Current Microbiology. Appl. Sci.*, 6, 62-76. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.607.008>.
- Mahrous, K.F., Mabrouk, D.M., Aboelenin, M.M., El-Kadir, H.A.M.A., Younes, A.M., Mahmoud, M.A., & Hassanane, W.S. (2020). Molecular characterization and immunohistochemical localization of tilapia piscidin 3 in response to *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia. *J. Pep. Sci.*, e3280. <https://doi.org/10.1002/psc.3280>.
- Manna, S.K., Das, N., Sarkar, D.J., Bera, A.K., Baitha, R., Nag, S.K., Das, B.K., Kumar, A., Ravindran, R., Krishna, N., & Patil, P.K. (2022). Pharmacokinetics, bioavailability and withdrawal period of antibiotic oxytetracycline in catfish *Pangasianodon hypophthalmus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 89, 103778. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2021.103778>.
- Marinho-Neto, F.A., Claudiano, G.S., Yunis-Aguinaga J., Cueva-Quiroz, V.A., Kobashigawa K.K., Cruz, N.R.N., Moraes, F.R., & Moraes, J.R.E. (2019). Morphological, microbiological and ultrastructural aspects of sepsis by *Aeromonas hydrophila* in *Piaractus mesopotamicus*. *PLOS ONE* | <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222626>.
- Mzula, A., Wambura, P.N., Mdegela, R.H., & Shirima, G.M. (2019). Current state of modern biotechnological-based *Aeromonas hydrophila* vaccines for aquaculture: A systematic review. *Bio. Med. Research International*, Article ID 3768948, 11 pp. <https://doi.org/10.1155/2019/3768948>.
- Neowajh, S., Hossain, M.M.M., Kholil, I., Mona, S.N., Islam, S., & Kabi, M., (2015). Potentiality of selected commercial antibiotics challenged with *Aeromonas* sp. (<https://doi.org/10.1155/2015/3768948>). *Immunol. Infect. Dis.*, 3(2), 11-15. <https://doi.org/10.13189/iid.2015.030201>.
- Prasad, V.G.N.V., Swamy, P.L., Rao, T.S., & Rao, G.S., (2013). Antibacterial synergy between oxytetracycline and selected polyphenols against bacterial fish pathogens. *Int. J. Vet. Sci.*, 2(2), 71-74.
- Rigos, G. & Smith, P. (2015). A critical approach on pharmacokinetics, pharmacodynamics, dose optimisation and withdrawal times of oxytetracycline in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 7, 77-106. doi: 10.1111/raq.12055.
- Riviere, J.E. & Sundlof, S.F. (2001). Chemical residues in tissues of food animals. In: Adams, H.R. (Ed.). *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 8th edition, Iowa State. University Press, Ames, IA, Ch. 58, p. 1166-1174.
- Pérez-Rodríguez, M., Pellerano, R.G., Pezza, L., & Pezza, H.R. (2018). An overview of the main food-stuff sample preparation technologies for tetracycline residue determination. *Talanta*, 182, 1-21.
- Setiawati, A. (2012). *Farmakokinetik klinik*. Jakarta: Balai Penerbit FKUI, hlm. 67-69.
- Shergel, L., Wu-Pong, S., & Yu, A.B.C. (2012). *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics* fifth ed. The McGraw-Hill Companies, Inc., p. 3-161.
- Stamm, J.M. (1989). In vitro resistance by fish pathogens to aquacultural antibacterials, including the quinolones difloxacin (A-56619) and sarafloxacin (A-56620). *J. Aquat. Anim. Health*, 1, 135-141.
- Sughra, F., Hafeez-ur-Rehman, M., Abbas, F., Altaf, I., Aslam, S., Ali, A.K., Mustafa, G., & Azam, S.M. (2021). Evaluation of oil-based inactivated vaccine against *Aeromonas hydrophila* administered to *Labeo rohita*, *Cirrhinus mrigala* and *Ctenopharyngodon idella* at different concentrations: Immune response, immersion challenge, growth performance and histopathology. *Aquaculture Reports*, 21, 100885. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100885>.
- Teuber, M. (2001). Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 4, 493-499. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00241-1](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00241-1).
- Uno, K. (1996). Pharmacokinetic study of oxytetracycline in healthy and vibriosis-infected ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Aquaculture*, 143, 33-42.
- WHO. (2021). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> diakses 17 November 2021.
- Xia, X., Liu G., Wu, X., Cui, S., Yang, C., Du, Q., & Zhang, X. (2021). Effects of *Macleaya cordata* extract on TLR20 and the proinflammatory cytokines in acute spleen injury of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) against *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture*, 544, 737105. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737105>.