

# KONDISI TOTAL LEUKOSIT DAN PROTEIN PLASMA IKAN KOI (*Cyprinus carpio* Koi) PASCA PERENDAMAN EKSTRAK *GRACILARIA VERRUCOSA* YANG TERINFEKSI BAKTERI *Aeromonas salmonicida*

## CONDITION TOTAL LEUKOCYTES AND PLASMA PROTEIN KOI FISH (*Cyprinus carpio* Koi) POST SOAKING EXTRACT *GRACILARIA VERRUCOSA* INFECTED BACTERIA *Aeromonas salmonicida*

Moh. Awaludin Adam<sup>1\*</sup> dan Maftuch<sup>2</sup>

<sup>1</sup>)Program Studi Budidaya Perikanan, Akademi Perikanan Ibrahimy, Situbondo.

<sup>2</sup>)Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang

\*Penulis Korespondensi: Email: [ar.adam87@yahoo.com](mailto:ar.adam87@yahoo.com)

(Diterima Oktober 2016 /Disetujui Januari 2017)

### ABSTRAK

Penelitian dilakukan untuk mengetahui kondisi total leukosit dan protein plasma ikan Koi (*Cyprinus carpio*) setelah perendaman ekstrak *Gracilaria verrucosa*. Rancangan penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap, 5 perlakuan dan 3 kali ulangan. Hasil penelitian berdasarkan uji ANOVA menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata pada total leukosit. Total protein plasma pada ikan perlakuan yang terinfeksi terlihat pita-pita protein yang semakin tipis. Perlakuan dosis perendaman 19 ppm memberikan pengaruh nyata pada sistem humoral dan seluler ikan koi pasca infeksi.

**Kata kunci:** protein plasma, ekstrak, daya tahan tubuh, humoral, seluler

### ABSTRACT

The study was conducted to determine total leucocyte and plasma protein of infected koi (*Cyprinus carpio*) after immersion in the extract of *Gracilaria verrucosa*. The experimental design of this research was Completely Randomized Design. Different doses of extract were used five treatments and three replicates. Data was analyzed by using ANOVA (one-way) there were significant different of total leucocyte. Total protein plasma at treatments of fish infected, showed protein of ben thinner. Doses immersion treatments at 19 ppm get significant effects of humoral and celluler system the infected of koi fish .

**Keywords:** plasma protein, extract, body endurance, humoral, seluler

### PENDAHULUAN

Penyakit ikan koi yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas salmonicida*, belakangan ini semakin meningkat. Infeksi bakteri ini dapat menyebabkan kematian masal pada budidaya ikan Koi (Adam dan Muqsith, 2015). Zonneveld *et al.*, (1991) dalam penelitiannya menyatakan bahwa kasus terbesar gagalnya panen pada budidaya intensif ikan Koi disebabkan adanya serangan penyakit infeksi. Penyakit infeksi dapat disebabkan oleh bakteri, parasit, jamur dan virus yang secara normal hidup dan berada di perairan serta meningkatnya stres, intoksikasi dan menurunnya kualitas lingkungan.

Penggunaan bahan-bahan kimia dan antibiotik tersebut akan menimbulkan masalah baru yaitu dapat meningkatkan pencemaran lingkungan (Rairakhwada *et al.*, 2007) dan penggunaan obat-obatan dan antibiotik sudah banyak diterapkan untuk penanggulangan penyakit ikan, seperti penggunaan *oxytetracycline* (Jun *et al.*, 2010) serta adanya akumulasi residu antibiotik dalam

jaringan ikan yang akan mempengaruhi pertumbuhannya dan resistensi terhadap obat-obatan serta adanya *imunopresi* (Maqsood *et al.*, 2009). Sehingga diperlukan suatu upaya dalam menghindari penggunaan antibiotik dan obat-obatan tersebut diatas beserta dampaknya dengan meningkatkan kekebalan ikan terhadap penyakit (Selvaraj *et al.*, 2006).

Salah satu alternatif penanggulangan penyakit melalui peningkatan kekebalan ikan terhadap penyakit adalah menggunakan bahan-bahan aktif dari rumput laut. Penggunaan *ekstrak Gracilaria verrucosa* untuk meningkatkan respon imun udang windu (Maftuch *et al.*, 2012). Belum banyak penelitian yang dilakukan khususnya mengenai pemanfaatan bioaktif rumput laut dari jenis *G. verrucosa* ini sebagai kandidat peningkat respon imun pada ikan koi (Adam, *et al.*, 2013).

Oleh karena itu, diperlukan suatu penelitian untuk mengetahui bagaimana kondisi *hematologi* dan total protein plasma ikan koi sebelum dan setelah perendaman ekstrak *G. verrucosa* sebagai kandidat dalam peningkatan respon imun ikan dengan melakukan ujiantang terhadap bakteri patogen *A. salmonicida*.

## METODE PENELITIAN

### Pembuatan ekstrak *G. verrucosa*

Ekstrak rumput laut *G. verrucosa* diperoleh dengan melakukan maserasi sampai proses difraksi menggunakan etil asetat dengan perbandingan 1 : 3 dan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Selanjutnya dilakukan uji kuantitatif dan identifikasi menggunakan spektrofotometri UV-Vis karena umumnya senyawa kimia yang merupakan senyawa aromatik, menunjukkan serapan kuat di daerah spektrum UV-Vis.

### Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan konsentrasi perendaman ekstrak *G. verrucosa* adalah 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm dan 50 ppm. Berikut dilanjutkan dengan uji LC<sub>50</sub> Bakteri *A. salmonicida* dengan kepadatan bakteri 10<sup>8</sup> dan 10<sup>7</sup> sel/mL.

### Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 5 (lima) perlakuan dan 3 (tiga) kali ulangan. Perlakuan penelitian dengan perbedaan dosis yang ditetapkan berdasarkan hasil uji dosis perendaman yang optimal yaitu 13 ppm, 19 ppm dan 25 ppm, kontrol positif dan kontrol negatif yang diulang sebanyak 3 kali. Perlakuan pemberian dosis perendaman ekstrak *G. verrucosa* sebagai berikut :

Perlakuan A = pemberian dosis ekstrak 13 ppm

Perlakuan B = pemberian dosis ekstrak 19 ppm

Perlakuan C = pemberian dosis ekstrak 25 ppm

Kontrol Positif = ikan tanpa perlakuan

Kontrol Negatif = pemberian bakteri kepadatan 10<sup>7</sup> sel/mL tanpa pemberian ekstrak *G. verrucosa*

### Perlakuan

Ikan uji menggunakan ikan koi yang berukuran 7-10 cm. Perendaman dilakukan dalam wadah akuarium dengan volume 2000 m dan masing-masing berisi 10 ekor. Penelitian dilakukan selama 20 hari terhitung dari persiapan hingga pengujian hematologi dan total protein plasma.

Setelah direndam ekstrak *G. verrucosa* selama 3x24 jam sesuai dengan hasil pada LC<sub>50</sub>, kemudian ikan Koi diinfeksi dengan bakteri *A. salmonicida* dengan kepadatan 10<sup>7</sup> sel/mL. selama rentang waktu perendaman sampai dengan penginfeksian bakteri, dilakukan pengambilan sampel darah untuk mengetahui respon imun non spesifik. Darah ikan diambil pada bagian depan sirip ekor, sirip punggung, menggunakan spuit suntik yang terlebih dahulu diberi anti koagulan dengan *Na Citrate* atau Na<sub>2</sub>EDTA sebanyak 0,1 ml, jarum suntik dibuat dengan kemiringan 45°. Darah yang diambil dimasukkan dalam tube dan langsung disimpan pada refrigator.

### Penghitungan Total Leukosit

Darah ikan yang telah dicampur antikoagulan diambil menggunakan pipet leukosit sebanyak 0,5 µL kemudian diencerkan dengan larutan truk dalam pipet leukosit sampai menunjukkan angka 11 µL. Darah yang telah tercampur dikocok hingga homogen dalam pipet, kemudian campuran diambil sedikit, dimasukkan dalam kamar hitung Improved Neubauer dan ditutup dengan cover glass, sebelum memasukkan ke dalam Improved Neubauer terlebih dahulu dibuang 2 tetes dimaksudkan agar larutan yang diambil benar-benar telah homogen. Dengan menggunakan mikroskop cahaya banyaknya dihitung jumlah leukosit pada semua kotak leukosit (Bijanti, 2005). Perhitungan jumlah leukosit menurut Svobodova (1991) :

$$SDP = (A/N) \times (1/V) \times Fp$$

Keterangan :

- SDP = Jumlah leukosit
- A = Jumlah sel *leukosit* terhitung
- N = Jumlah kotak *haemocytometer* yang diamati
- V = Volume kotak *haemocytometer* yang diamati
- Fp = Faktor pengenceran

### Total Protein Plasma

Darah sampel diambil menggunakan spuit steril volume 1 cc yang telah diisi antikoagulan *Na-Sitrat* 3,8%, pengambilan darah ikan dilakukan melalui arteri dorsalis, darah diambil sebanyak 0,2-0,3 cc. Tetes darah pertama dibuang dan tetes selanjutnya ditampung ke dalam tabung eppendorf sebanyak 1 mL. Tetesan darah pertama harus dibuang karena langsung bersinggungan dengan gunting maupun jaringan di bagian tepi pada saat pemotongan pertama kali yang dikhawatirkan mengandung kontaminan. Darah kemudian disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 40°C untuk memisahkan sel darah dengan plasmanya. Pengamatan protein plasma darah melalui metode elektroforesis (SDS-PAGE) (Fatchiyah *et al.*, 2006).

### Pengukuran Aktivitas Enzim Protease

Pengukuran aktivitas protease ini menggunakan metode Bergmeyer & Grassl 1983. Prinsip kerja dari metode ini yaitu kasein yang berfungsi sebagai substrat akandihidrolisis oleh protease dengan bantuan air menjadi peptida dan asam amino.



Laju pembentukan peptida dan asam amino tersebut dapat dijadikan tolak ukur aktivitas katalisis protease. Asam-asam amino yang terbentuk harus dipisahkan dari substrat yang tidak terhidrolisis. Umumnya pemisahan ini dilakukan dengan penambahan TCA. Penambahan TCA tersebut menyebabkan produk yang mengandung peptida dan asam amino akan larut dalam TCA, sedangkan protein yang tidak terhidrolisis akan mengendap. Penambahan TCA ini sekaligus menginaktifkan enzim protease. Asam-asam amino tirosin dan triptophan yang larut dalam TCA akan bereaksi dengan reagen folin menghasilkan warna biru. Penambahan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> bertujuan untuk mendapatkan pH sekitar 11,5 yang merupakan pH optimum untuk intensitas dan stabilitas warna (Novo, 1981). Warna yang terbentuk diukur absorbansinya pada daerah sinar tampak 578 nm dengan alat spektrofotometer Uv-Vis. Besarnya serapan berbanding lurus dengan konsentrasi protein yang terhidrolisis. Aktivitas protease dihitung berdasarkan persamaan :

$$UA = \frac{A_1 - A_0}{A_s - A_0} \times P \times \frac{1}{T}$$

Keterangan :

- UA : Unit aktivitas (U/ml/menit)
- A<sub>1</sub> : Absorbansi sampel
- A<sub>0</sub> : Absorbansi blanko
- A<sub>s</sub> : Absorbansi standar
- T : Lama inkubasi
- P : Faktor pengenceran

Secara kuantitatif kemurnian ditentukan berdasarkan aktivitas spesifik (U/mg) yaitu perbandingan antara Unit aktivitas (U/ml) dan kadar protein (mg/ml).

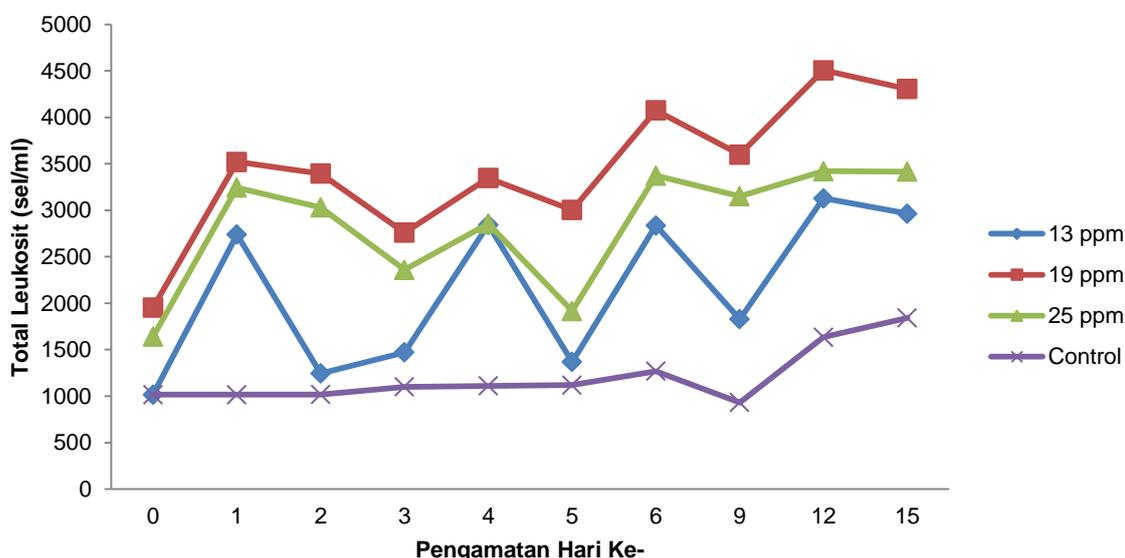
### Analisis Data

Data kondisi leukosit dan total protein plasma yang diperoleh setelah dilakukan analisa di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan Ibrahmy untuk kondisi hematologi dan Laboratorium Biomedik Kedokteran Universitas Brawijaya untuk total protein plasma. Data dianalisa secara statistic dengan analisis keragaman satu arah (*one way anova*) menggunakan SPSS Software versi 16. Bila ada perbedaan antar perlakuan dilakukan uji lanjut. Analisa regresi dilakukan untuk mengetahui hubungan pemberian dosis perlakuan terhadap parameter yang diamati.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kondisi Total Leukosit

Perhitungan statistik yang dilakukan pada perhitungan jumlah total leukosit ikan Koi (*Cyprinus carpio*) pada setiap perlakuan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Rata-rata jumlah total leukosit ikan koi (*Cyprinus carpio*) sebelum dan sesudah diinfeksi bakteri *Aeromonas* pada beberapa perlakuan disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Pengaruh pemberian imunostimulan ekstrak fenol *Gracilaria verrucosa* terhadap leukosit ikan Koi (*Cyprinus carpio*) sebelum dan sesudah diinfeksi bakteri *Aeromonas salmonicida*.

Hasil analisis data menggunakan analisis keragaman satu arah (*one way anova*) didapatkan bahwa jumlah sel leukosit sebelum infeksi bakteri berbeda nyata ( $P < 0,05$ ). Analisis data jumlah sel leukosit sesudah infeksi bakteri *A. salmonicida* berbeda nyata ( $P < 0,05$ ).

Dari data di atas dapat dilihat nilai rata-rata total leukosit pada ikan Koi sebelum infeksi berkisar antara  $26,83 \times 10^3$  sel/ml sampai  $35,12 \times 10^3$  sel/ml, sesudah dilakukan infeksi mengalami peningkatan menjadi  $45,10 \times 10^3$  sel/ml sampai  $49,85 \times 10^3$  sel/ml, dengan hasil optimum pada dosis 19 ppm, diikuti dosis 25 ppm dan 13 ppm. Dosis 25 ppm diasumsikan mengalami kelebihan dosis sehingga mengakibatkan penghambatan pada proses peningkatan imun.

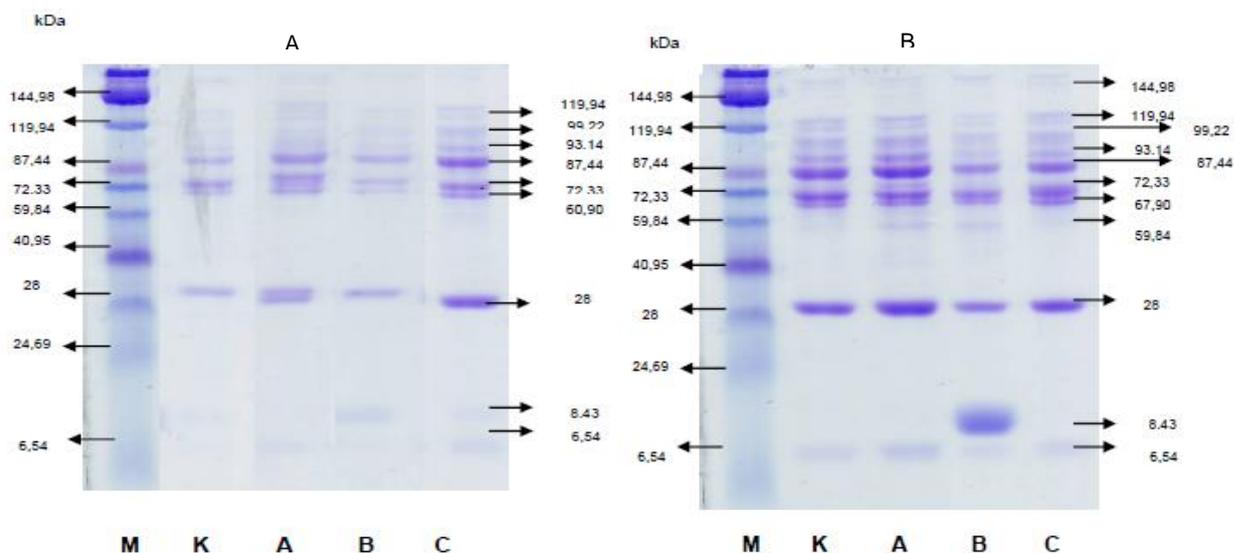
Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan jumlah total leukosit pada setiap perlakuan setelah infeksi bakteri. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Suhermanto, *et al.*, (2011), yang menyatakan bahwa pada pemberian total fenol teripang pasir (*Holothuria scabra*) dengan dosis 0,09 mg/kg dapat meningkatkan jumlah leukosit ikan Mas dari  $4,56 \times 10^3$  sel/ml menjadi  $6,08 \times 10^3$  sel/ml.

### Protein Plasma Darah

Hasil penelitian dengan menggunakan elektroforesis SDS PAGE menunjukkan gambaran profil pita-pita protein atau pemisahan protein berdasarkan berat molekulnya. Tebal tipisnya pita yang terbentuk dari pita protein menunjukkan kandungan atau banyaknya protein yang mempunyai berat

molekul yang sama yang berada pada posisi pita yang sama. Profil atau pola protein dan jumlah berat molekul sampel plasma darah sebelum infeksi dan setelah terinfeksi dapat dilihat Gambar 2.

Hasil yang terlihat pada Gambar 2 menunjukkan protein plasma darah ikan koi sebelum terinfeksi terdapat pita protein yang semuanya ada pada perlakuan yaitu dengan berat molekul 119,94 kDa; 99,23 kDa; 93,15 kDa; 87,44 kDa; 72,34 kDa; 67,90; 28 kDa; 8,43 kDa dan 6,55 kDa. Dan untuk perlakuan pemberian total rumput laut *Gracillaria verrucosa* yang diberikan ternyata muncul 1 pita protein baru yaitu pada perlakuan A (dosis 13 ppm) dengan berat molekul 6,54 kDa dan perlakuan B (dosis 19 ppm) dan Perlakuan C (dosis 25 ppm) terdapat 2 pita protein baru dengan berat molekul 8,43kDa dan 6,54kDa.



**Gambar 2. A) Hasil Elektroporesis Pra Infeksi, dan B) Hasil Elektroporesis Pasca Infeksi**

Keterangan : (M) Marker, (K) Perlakuan Kontrol (A) Perlakuan 13 ppm, (B) Perlakuan 19 ppm dan (C) Perlakuan 25 ppm

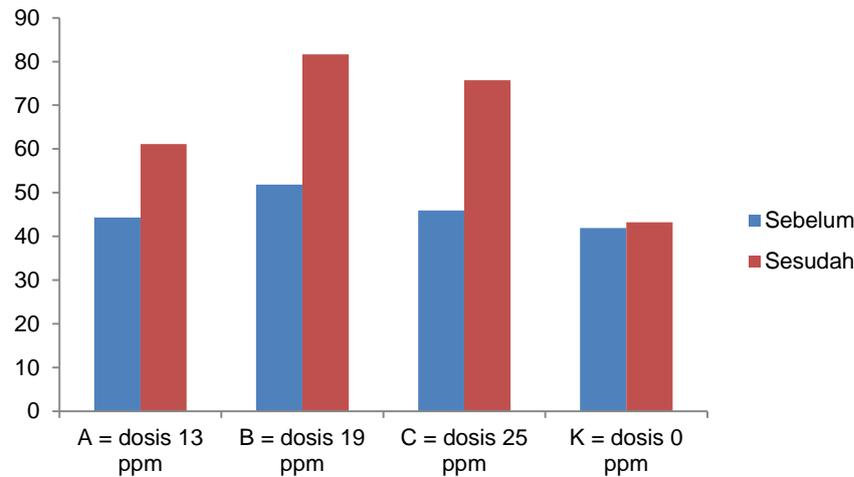
Setelah dilakukan infeksi, terdapat perubahan tingkat ketebalan pita-pita proteinnya dan jumlah protein pita protein menjadi berkurang dan terbentuk pita-pita protein baru. Setelah infeksi, muncul pita baru yaitu pada kontrol protein 144,98kDa dan 6,54kDa perlakuan A (dosis 13 ppm) protein 144,98kDa; 59,84kDa dan perlakuan B (dosis 19 ppm) protein 144,98kDa; 59,84kDa. Sedangkan pada perlakuan C (dosis 25 ppm) protein 144,98kDa saja. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak berpengaruh terhadap perubahan pita-pita protein, dimana terlihat pada dengan perlakuan pemberian total. Menurut Andayani (2008) bahwa hasil elektroforesis plasma protein menunjukkan ketebalan pita-pita protein terlihat lebih tipis pada ikan yang terinfeksi. Bakteri dapat menyebar pada jaringan sehingga terjadi proses infeksi dan peradangan.

Menurut Andayani (2007), menjelaskan bahwa perubahan protein tersebut dipengaruhi oleh adanya aktifitas bakteri pasca infeksi dalam tubuh ikan. Kemudian mempengaruhi adanya kerusakan pada protein – protein tertentu sehingga protein tersebut hilang. Tizard (1988) menyatakan bahwa semakin besar berat molekulnya, semakin imunogenik tetapi tidak menutup kemungkinan protein dengan berat molekul kecil dapat bertindak sebagai imunogen, walaupun molekul besar jauh lebih baik.

### Kadar Protein Plasma Ikan Koi

Kadar protein plasma pada sampel ikan Koi sebelum dan sesudah infeksi bakteri *A. salmonicida* diketahui dengan menggunakan spektrofotometer sebagaimana yang tertera pada Gambar 3, sedangkan perhitungan kadar protein dapat diketahui melalui kurva standar protein. Berdasarkan Gambar 3 menunjukkan bahwa kadar protein tertinggi pada perlakuan B (dosis 19 ppm) dengan nilai rata-rata 51,85 kDa, diikuti perlakuan A (dosis 13 ppm) 44,29 kDa dan perlakuan C (dosis 25 ppm) 45,90kDa. Semakin besar berat molekulnya, semakin imunogenik tetapi tidak menutup kemungkinan protein dengan berat molekul kecil dapat bertindak sebagai imunogen, walaupun molekul besar jauh lebih baik (Tizard, 1987). Kodyman (2000) menyatakan bahwa antigen yang mengandung protein dengan berat molekul 15 kDa dan 24 kDa merupakan antigen yang sangat

imunogenik. Baratawidjaja (2004) menjelaskan bahwa molekul protein dengan koisa molekul relatif lebih dari 10 KDa efektif sebagai imunogen.

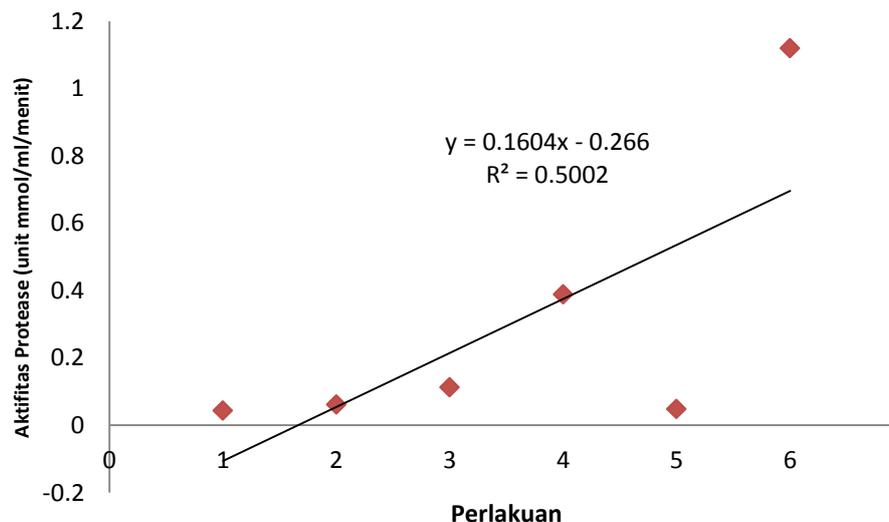


Gambar 3. Kadar protein ikan Koi sebelum dan sesudah diinfeksi bakteri *Aeromonas salmonicida*.

Imunogen merupakan kemampuan yang dimiliki oleh antigen untuk mengadakan reaksi spesifik dengan zat anti (Priyanto, 1991). Seperti yang diketahui bersama bahwasannya antigen adalah substansi dari bermacam-macam bentuk kimia yang mampu merangsang sistim imun untuk menimbulkan respon yang ditujukan terhadap substansi yang merangsangnya.

#### Aktivitas Protease

Hasil perhitungan pada aktivitas protease berdasarkan perhitungan konsentrasi *tirosin* sampel disajikan dalam Gambar 4. Pada ikan sehat konsentrasi *tirosin* yang dihasilkan paling rendah sehingga menyebabkan aktivistas protease pada ikan sehat juga rendah yaitu 9,402 ppm untuk konsentrasi *tirosin* sedangkan aktivitas protease yang dihasilkan adalah 0,0433 unit mmol/ml/menit. Pada ikan sampel dengan perendaman imunostimulan konsentrasi *tirosin* dan aktivitas protease mengalami peningkatan yang signifikan dengan peningkatan paling tinggi pada perendaman 19 ppm dengan nilai konsentrasi *tirosin* 24,524 ppm sedangkan aktivitas protease 0,1129 unit mmol/ml/menit. Pada ikan perendaman 25 ppm mengalami peningkatan paling rendah yaitu 10,378 ppm untuk konsentrasi *tirosin* dan 0,0478 unit mmol/ml.menit untuk aktivitas protease, sedangkan pada perendaman 13 ppm konsentrasi *tirosin* 13,305 ppm dan aktivitas protease 0,0613 unit mmol/ml/menit (Gambar 4).



Gambar 3. Aktifitas *protease* pada perlakuan ikan Koi.

Keterangan : perlakuan 1 (Kontrol +), 2 (13 ppm), 3 (19 ppm), 4 (19 ppm+infeksi perendaman), 5 (25 ppm), dan 6 (Kontrol -).

Demikian juga halnya dengan ikan infeksi, pada ikan infeksi perendaman konsentrasi tirosin dan aktivitas protease paling tinggi pada ikan infeksi dengan perendaman 19 ppm dengan nilai 84,280 ppm untuk konsentrasi tirosin dan 0,3880 unit mmol/ml/menit. Hal tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi tirosin maka semakin tinggi pula aktivitas proteasenya. Sedangkan konsentrasi tirosin dan aktivitas protease paling tinggi pada saat penelitian adalah pada sampel ikan infeksi tanpa perendaman yaitu 243,061 ppm untuk konsentrasi tirosin dan 1,1191 unit mmol/ml/menit untuk aktivitas protease. Konsentrasi yang dihasilkan sangat tinggi dengan tujuan untuk menghasilkan aktivitas yang lebih tinggi pula. Sedangkan pada ikan infeksi dengan perendaman serangan penyakit oleh bakteri *A. salmonicida* dapat ditanggulangi dengan peningkatan respon imun oleh perendaman ekstrak kasar *G. verrucosa*.

Semakin tinggi konsentrasi tirosin dan aktivitas protease pada ikan yang diinfeksi semakin besar pula pengaruh substansi ekstraseluler yang dikeluarkan oleh ikan tersebut dalam proses mempertahankan diri. Proses pertahanan diri pada ikan infeksi tanpa adanya tambahan peningkatan respon imun dari luar akan menyebabkan timbulnya hiperemi seperti yang terjadi pada ikan infeksi tanpa pemberian imunostimulan. Leukosit yang berfungsi sebagai pertahanan non-spesifik akan melokalisasi dan mengeliminasi patogen melalui proses fagositosis pada jaringan. Timbulnya nekrosis dan ulser pada gejala klinis terutama pada ikan infeksi tanpa pemberian imunostimulan karena adanya substansi ekstraseluler bakteri seperti aktivitas protease yang dapat menghidrolisa dan melisis jaringan inang.

## KESIMPULAN

Peranan pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebagai kandidat peningkat respon imun pada ikan koi memberikan data peningkatan yang signifikan yaitu antara 5%-10% pada kondisi hematologi dan total protein plasma ikan.

Hasil penelitian berdasarkan uji ANOVA menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata pada total protein plasma ( $p < 0,05$ ). Hal ini berarti adanya pengaruh perendaman ekstrak *G. verrucosa* terhadap kondisi humoral ikan Koi. Sedangkan pada kondisi hematologi tidak berbeda nyata yang berarti perendaman tidak berpengaruh terhadap kondisi seluler ikan koi dengan dosis optimal perendaman 19 ppm.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adam, M.A., Hardoko dan Maftuch. 2013. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Fenol *Gracilaria verrucosa* terhadap Bakteri *Aeromonas salmonicida* secara in vitro. Diterima 31 Januari 2013, direvisi 14 April 2013. *NATURAL B*, Vol. 2, No. 1, April 2013.
- Adam, M.A. dan Muqsith, A, 2015. Kondisi Hematologi Ikan Koi (*Cyprinus carpio* Koi) yang Terinfeksi Bakteri *Aeromonas salmonicida* Pasca Perendaman Ekstrak *Gracilaria Verrucosa*. Prosiding Seminar Nasional dan Call for Papers. "Pengembangan Sumber Daya Perdesaan dan Kearifan Lokal Berkelanjutan V" 19-20 November 2015. Purwokerto
- Andayani, S. 2008. Pengaruh Bioaktif Alkaloid Ubur-Ubur (*Bougainvillia* sp.) Sebagai Imunostimulan Terhadap Aktifitas Respon Imun Non Spesifik Serta Kelulusan Hidup (RPS) Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). [Disertasi]. Program Pasca Sarjana Fakultas Pertanian. Universitas Brawijaya. Hal 78-79.
- Andayani, S., Rustidja, Sukoso, Y. Risjani and M. Fajar. 2007. Pengaruh Senyawa Aktif Alkaloid Ubur-Ubur (*Bougainvillia* sp) Dalam Pakan Terhadap Makrofag Ginjal Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Jurnal Penelitian Perikanan* Vol. 10 no.1. Faperik Unibraw. Hal. 102- 106
- Baratawidjaja, K.G. 2004. *Imunologi dasar*. Edisi 6. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Hlm 171-190, 271-282..
- Bijanti, R., 2005. *Hematologi Ikan Teknik Pengambilan Darah dan Pemeriksaan Hematologi Ikan. Bagian Ilmu Kedokteran Dasar Veteriner*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.

- Fatchiyah., E.L. Arumingtyas., S. Widyarti., dan S. Rahayu. 2006. *Analisa Biologi Molekuler: Isolasi DNA, PCR, Immunobloting, dan Isoenzyme*. Universitas Brawijaya. Malang. Hal 59, 76, 78-80.
- Jun, WJ., Ji HK., Dennis KG., Casiano HC. Jr., Jee EH., Sang PS., and Se CP., 2010. *Occurrence of tetracycline-resistant Aeromonas salmonicida infection in Korean Cyprinid loach (Misgurnus anguillicaudatus)*. Page 849 – 855
- Kodyman, F. N., H. D. Scalling., M. A. Vanleuwen., S. McKellar and J. F. Huntley. 2000. Protection in Lambs Vaccinated with *H. contortus* Antigens is Age Related and Corellates with IgE Rather than IgG1 Antibody. *Parasite. Immunol. Jan*; 22 (1): 13-20.
- Maftuch, M.H. Toban, Y. Risjani, 2012. Administration of marine algae (*Gracilaria verrucosa*) immunostimulant enhances some innate immune parameters in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) against *Vibrio harveyi* infection. *Journal of Applied Sciences research*. 58JASR. p 1052-1058.
- Maqsood, S., M.H. Samoon, P. Singh, 2009. Immunomodulatory and Growth Promoting Effect of Dietary Levamisole in *Cyprinus carpio* Fingerlings Against the Challenge of *Aeromonas hydrophila*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 9: 111-120.
- Nazir, M., 2009. *Metode Penelitian*. Cetakan ketujuh, Penerbit Ghalia Indonesia. Hal. 54, 63, 122, 221
- Novo, 1981. *Novo's Handbook of Practical Biotechnology*, Denmark. : Novo.
- Prijanto, M. dkk. 1991. *Gambaran Zat Anti IgG Anti FHA dan Anti PT pada Bayi setelah Imunisasi dan pada Anak-anak Penderita Pertusis*. Cermin Dunia Kedokteran. Edisi 72 tahun 1991, hal 28.
- Rairakhwada., Dina, A.K. Pal, Z.P. Bhatena, N.P. Sahu, A. Jha, S.C. Mukherjee, 2007. Dietary microbial levan enhances cellular non-specific immunity and survival of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. *Fish & Shellfish Immunology* 22 : 477-486.
- Selvaraj, V., K. Sampath, V. Sekar, 2006. Adjuvant and immunostimulatory effects of b-glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 114. p : 15–24.
- Svobodova, Z. and Vykusova, 1991. *Diagnostic, Prevention and Therapy of Fish Disease and Intoxycation*. Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology. Vodnany, Czechoslovakia.  
<http://www.fao.org/docrep/field/003/AC160E/AC160E00.htm#TOC>
- Tizard, I.R., 1982. *An Introduction of Veterinary Immunology*. W. B. Saunders Company. 254-257.
- Tizard, I. R. 1987. *An Introduction of Veterinary Immunology*. W. B. Saunders Company. 254-257.
- Zonneveld, N., Huisman, E.A., dan Boon, J.H., 1991. *Prinsip-Prinsip Budidaya Ikan*. Alih bahasa, Penerbit PT. Gramedia Jakarta. Hal 159-160.