

# RESPON IMUNOLOGI IKAN NILA GIFT (*Oreochromis sp*) TERHADAP PROBIOTIK STRAIN A3-51

Indrawati

Dinas Peternakan dan Perikanan Kabupaten Banyumas. Jl. Ahmad Yani No. 30 A Purwokerto. E-mail: indrawati\_bkm@yahoo.com

## ABSTRACT

One of the problem in Tilapia culture is bacterial diseases, such as that caused by *Aeromonas hydrophila*. Diseases management can be conducted by vaccine and antibiotic application. Probiotic, such as A3-51 offers a better alternative in diseases management since it has been proven to increase non specific immune respond in some fishes. The aims of this research were to find out the effect of duration of probiotic A3-51 application and challenging test on to immunological potency as indicated by blood profile, number of kidney macrophage and it protection level. This research was conducted experimentally applying a factorial design based on RCBD. The tested factors were the duration of probiotic A3-51 application consisted of five levels namely 0 (A), 7 days (B), 14 days (C), 21 days (D), and 28 days (E); and timing of *A. hydrophila* challenged test consisted of day 0 (a), 7 (b), 14 (c), 21 (d), and 28 (e). There were 25 combination of treatments with 2 replicates. Each experimental unit consisted of 5 fishes. Evaluation time points (the date of data collection) were served as Block. The results showed that duration of probiotic administration and challenged test were to increased the number of leucocytes, macrophage, erythrocyte and percentage of leucocytes. The number of leucocytes was ranged from 5,700 to 77,762.5 cells/ml with a maximum number was observed from the fish given probiotic A3-51 for 14 days the challenged with *A. hydrophila* on day 14 (C<sub>14</sub>C<sub>14</sub>).

Keyword : Immunology; *Oreochromis sp*, Probiotic, Strain A3-51

## PENDAHULUAN

Ikan Nila Gift memiliki keunggulan yaitu pertumbuhannya relatif lebih cepat dan ukuran tubuhnya lebih besar dibandingkan dengan ikan nila hitam atau nila lokal (Arie, 1998). Sebagai ikan budidaya, nila gift menjadi salah satu komoditas perikanan yang bernilai ekonomis tinggi, karena selain dapat dijual dengan harga cukup tinggi juga biaya produksinya rendah.

Kendala utama yang dihadapi pada bidang akuakultur yaitu munculnya penyakit (Austin dan Austin, 1999 dalam Irianto, 2002). Penyakit yang umum dijumpai pada budidaya nila "gift" antara lain penyakit infeksi bakteri, diantaranya *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida* dan *Pseudomonas fluorescent* (Djariah, 2002).

Penyakit bakterial merupakan salah satu masalah serius yang selalu dihadapi oleh petani ikan, karena masalah tersebut dapat mengakibatkan kematian hingga 100% (Supriyadi dan Taukhid, 2003), dan dapat menurunkan mutu daging ikan karena borok dan luka sehingga tidak disukai oleh konsumen. Menurut Austin dan Austin (1987) dan Bullock *et al.* (1971) dalam Taufik (2002), *A. hydrophila* merupakan penyebab utama penyakit bakterial pada ikan air tawar. Kamiso

2004) menyatakan *A. hydrophila* sulit dikendalikan karena hampir selalu ada di air dan dapat menjadi resisten terhadap obat-obatan. Selain itu penggunaan antibiotik dapat pula mengakibatkan pencemaran lingkungan dan terjadinya akumulasi residu antibiotik pada daging ikan (Ellis, 1998 dalam Hernayanti *et al.*, 2004). Selain dapat menimbulkan resistensi, penggunaan antibiotik juga dapat menekan daya tahan dan pertumbuhan ikan (Kamiso, 2004). Penggunaan antibiotik juga dapat mengakibatkan beberapa mikroorganisme patogenik mampu memproteksi diri (Gismondo *et al.*, 1999). Hinton *et al.* (1986) dalam Byu *et al.* (1997) mengemukakan bahwa antibiotik dapat meninggalkan residu pada jaringan dan mengakibatkan ketidakseimbangan flora normal intestinal.

Berdasarkan adanya kekurangan dalam penggunaan antibiotik sebagaimana telah dikemukakan, maka dikembangkan teknik lain untuk pencegahan penyakit ikan yaitu menggunakan vaksin. Selain vaksin maka pengendalian penyakit dapat pula dilakukan dengan pemberian immunostimulan. Sel mikroba dapat berperan sebagai immunostimulan untuk menstimulasi sistem imun melawan patogen.

Peran immunostimulan antara lain dapat meningkatkan respon imun non spesifik (Sakai, 1998 *dalam* Irianto dan Austin, 2002). Anderson (1992) *dalam* Sakai *et al.* (1995) mengemukakan bahwa selain dapat meningkatkan respon imun non spesifik, immunostimulan juga meningkatkan respon imun spesifik pada ikan. Salah satu bentuk immunostimulan yang berperan meningkatkan kesehatan ikan adalah probiotik (Fuller, 1986 dan Uma, 1999 *dalam* Hernayanti *et al.*, 2004).

Pemberian probiotik dalam waktu lama dan terus menerus dapat memperpanjang keberadaannya dalam intestinum; dengan demikian probiotik dapat bekerja dengan baik menyeimbangkan mikroflora dan mampu meningkatkan kesehatan inang (Ringo *et al.*, 1996 *dalam* Irianto, 2003). Penggunaan probiotik *P. fluorescens* AH2 yang memiliki kemampuan menekan kematian akibat vibriosis pada ikan *rainbow trout* dan secara *in vitro* bersifat antagonistik terhadap *A. salmonicida* (Gram *et al.*, 2001 *dalam* Irianto, 2003).

Mengingat belum adanya informasi mengenai potensi imunologik dan histopatologik pada ikan nila "gift" yang diberi probiotik, maka diperlukan suatu penelitian untuk mengetahui pengaruh lama waktu pemberian probiotik strain A3-51 terhadap potensi imunologi didasarkan pada gambaran darah, jumlah makrofag ginjal dan gambaran histopatologi ginjal ikan serta perhitungan tingkat mortalitas ikan nila "gift" yang diinfeksi dengan *A. hydrophila*.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh lama waktu pemberian probiotik strain A3-51 dan ujiantang terhadap potensi imunologik ikan nila "gift" berdasarkan gambaran darah, makrofag ginjal dan tingkat proteksinya.

## MATERI DAN METODA

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto.

### 1. Metode dan Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan dengan metode eksperimental, menggunakan pola percobaan faktorial dengan rancangan dasar Rancangan

Acak Kelompok (Faktorial-RAK). Faktor yang dicobakan terdiri dari dua variabel yaitu (I) Lama waktu pemberian probiotik dan (II) Ujiantang bakteri patogen *A. hydrophila*. Kedua faktor tersebut masing-masing mempunyai taraf yang sama yaitu lama waktu pemberian probiotik pada hari ke 0 (A), 7 (B), 14 (C), 21 (D) dan 28 (E). Setiap kombinasi perlakuan diulang sebanyak 2 kali.

## 2. Prosedur Penelitian

### 2.1. Persiapan

#### 2.1.1. Persiapan Tempat Penelitian

Tempat penelitian menggunakan bak plastik ukuran 60cmx40cmx40cm, sebanyak 50 buah, bak dicuci hamakan dengan kalium permanganat ( $\text{KMnO}_4$ ) 0,5 % selama 1x24 jam dan selanjutnya dibilas air bersih, serta diisi dengan air bersih sebanyak 72 liter, air berasal dari sumur dan di dalam bak dilengkapi dengan aerator.

#### 2.1.2. Persiapan Suspensi probiotik

Isolat probiotik A3-51 yang telah ditanam di media TSA dipanen, kemudian disuspensikan pada larutan fisiologis 0,85 % (campuran NaCl dan akuades) (Irianto dan Austin, 2002). Kepadatan sel dihitung menggunakan haemositometer hingga diperoleh kepadatan  $10^{10}$  sel/ml.

#### 2.1.3. Persiapan Pakan

Pakan pelet komersial ditimbang dengan menggunakan timbangan sebanyak 1000 gram, kemudian kedalamnya disemprotkan A3-51 sebanyak 10 ml dari hasil suspensi probiotik, sehingga mencapai dosis yang setara dengan  $10^8$  sel bakteri per gram pakan. Pakan yang sudah diberi probiotik dikocok dan dikeringanginkan dalam suhu ruangan, kemudian ditempatkan dalam plastik yang tertutup rapat dan disimpan dalam kulkas. Penyediaan pakan dilakukan untuk setiap satu minggu. Pemberian pakan dilakukan 2 kali sehari, selama 28 hari dengan dosis 3 % dari total berat badan.

#### 2.1.4. Penebaran Hewan Uji

Dua minggu sebelum penelitian dimulai, dilakukan aklimasi terhadap hewan uji di dalam bak plastik. Ikan nila "gift" yang ditebar berjumlah 5 ekor dalam 0,072 m<sup>3</sup>.

#### 2.1.5. Penyiapan bakteri untuk uji Tantang

*A. hydrophila* dikultur dalam media TSA dan diinkubasi selama 24 jam dalam suhu ruangan. Bakteri dipanen dengan cara sebagai berikut : Larutan fisiologis steril disedot dengan mikropipet dan dimasukkan ke dalam cawan petri tempat bakteri dikultur. Selanjutnya, menggunakan *drugalsky stick* untuk melepaskan koloni bakteri dari medium, diambil sebanyak 1 ml dan dihitung dalam haemositometer, serta dihitung kepadatan selnya hingga diperoleh kepadatan 10<sup>8</sup> sel /ml.

### 3. Pengumpulan Data

#### 3.1. Penentuan jumlah sel darah putih (leukosit)

Ikan nila "gift" diambil dari bak pemeliharaan untuk setiap perlakuan kemudian dilumpuhkan dengan cara menusukan alat penusuk ke bagian otak. Sampel darah diambil dengan menggunakan spuit (alat suntik volume 1 ml), jarum dimasukkan sedalam ±1 cm dari pangkal ekor ikan ke arah perut yang dipotong. Sebelum digunakan, spuit dicuci dengan EDTA yang berfungsi juga sebagai anti koagulan. Darah ikan nila gift yang akan diamati, ditempatkan di dalam botol kecil yang sebelumnya telah dicuci dengan EDTA, lalu dihisap dengan mikropipet sampai menunjukkan angka 1, kemudian ujungnya dibersihkan dengan kertas hisap, larutan turk dihisap dengan pengenceran 10 kali sampai angka 11, pipet karet diambil kemudian pipet dipegang pada kedua ujungnya dengan ibu jari telunjuk dan dikocok selama dua menit, bilik hitung disiapkan kemudian cairan dalam pipet diteteskan pada bilik hitung sehingga cairan dapat masuk dengan sendirinya kedalam bilik hitung. Kemudian dilihat di bawah mikroskop mula-mula dengan perbesaran lemah atau dengan perbesaran lensa obyektif 40 kali dan lensa okuler 10 kali (400x) (Yuwono *et al.*, 2003). Semua leukosit yang dihitung terdapat di dalam bujur sangkar pojok. Jadi jumlah bujur sangkar yang dihitung menjadi  $4 \times 16 = 64$  bujur sangkar dengan

sisi masing-masing =  $\frac{1}{4}$  mm. Perhitungan sebagai berikut :

$$\text{Jumlah leukosit per mm}^3 = \frac{1}{64} \times 160 \times 10 = 25 \text{ L}$$

Keterangan :

1/160 : Volume bujur sangkar

10 kali : Pengenceran darah

L : Jumlah leukosit terhitung

64 : Jumlah bujur sangkar

#### 3.2. Perhitungan persentase Leukosit

Pada ujung *object glass* yang bersih dan bebas lemak, diteteskan satu tetes darah ikan (pengambilan darah dilakukan secara aseptik). Darah dihapus kearah depan sekaligus dengan *object glass* yang lain (dipilih tepi yang paling rata) dengan membentuk sudut 45°C. Setelah preparat apus kering, preparat ditetes pewarna Wright 2 – 3 tetes didiamkan selama 2 - 3 menit selanjutnya dicuci dengan air mengalir kemudian dikeringkan dan diamati di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000 kali (Gambar 4.3). Jenis-jenis leukosit yang ada dihitung dari tiap 100 sel leukosi dan hasil dinyatakan dalam persen (%). Perhitungan persentase leukosit dilakukan pada hari ke 0, 7, 14, 21 dan 28.

#### 3.3. Penentuan Jumlah Makrofag

Badan ikan diletakkan di meja dengan bagian ventral di atas. Bagian anus digunting ke arah kranial hingga mencapai operkulum. Organ dalam disisihkan dahulu dan ginjal diambil dengan spatula secara aseptik. Ginjal ditimbang dengan menggunakan timbangan mikro, lalu ditempatkan dalam tabung *eppendorf*. Penyimpanan sampel ginjal dilakukan dalam suhu ruangan. Ginjal digerus menggunakan *tissue grinder* dan ditempatkan dalam gelas benda, kemudian diberi larutan garam fisiologis dengan pengenceran 1 : 10 dan ditempatkan dalam tabung *eppendorf* kemudian dikocok. Sebelum dilakukan perhitungan total makrofag, bagian bergaris dari haemositometer dan glas penutup harus dibersihkan dengan teliti. Selanjutnya, gelas penutup ditempatkan di atas bilik hitung. Suspensi makrofag kemudian diteteskan melalui lekukan atau *groove* hingga membentuk bilik hitung (Irianto dan Austin, 2002). Perhitungan dilakukan dengan mikroskop perbesaran sedang (400x) dan

makrofag yang dihitung berada dalam kotak kecil. Perhitungan total makrofag dilakukan pada hari ke 0, 7, 14, 21 dan 28, dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Total makrofag} = \text{rata-rata makrofag} \times 4 \times 10^6 \times \frac{1}{Fp}$$

Keterangan: Fp = Faktor pengenceran

### 3.4. Perhitungan Mortalitas Ikan Nila Gift setelah ujiantang dengan bakteri *A. hydrophila*.

Ujiantang dilakukan dengan metode suntik. Bakteri *A. hydrophila* yang telah dipanen kemudian dihitung dengan haemositometer hingga kepadatan  $10^6$  sel/ml. Suspensi bakteri tersebut disuntikkan ke ikan nila gift dengan dosis 0,1 ml/ikan. Ikan yang telah diinfeksi dengan *A. hydrophila* diinkubasi selama 7 hari kemudian dihitung jumlah ikan yang mati. Persentase mortalitas (M) dihitung berdasarkan selisih dari persentase kelangsungan hidup ikan nila gift (S). Sedangkan kelangsungan hidup dihitung berdasarkan persentase perbandingan antara jumlah ikan nila gift yang hidup pada akhir pengamatan atau hari ke-7 (*Nt*) dengan jumlah ikan nila gift awal pengamatan (*No*) atau dihitung dengan persamaan berikut:

$$S = \frac{Nt}{No} \times 100\%$$

$$M = 100\% - S$$

### 4. Analisis Data

Data penelitian berupa jumlah leukosit, jumlah makrofag, persentase leukosit, jumlah eritrosit dan persentase mortalitas yang diperoleh

dianalisa menggunakan analisis ragam (uji F) pada tingkat signifikansi 5% dan 1% menggunakan program SPSS 12 untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh perlakuan yang dicobakan. Hasil yang berbeda nyata dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk mengetahui perlakuan yang paling berpengaruh pada tingkat kesalahan yang sama (Sugiyono, 2000). Gambaran histopatologis organ ginjal dianalisis secara deskriptif.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Jumlah Leukosit

Hasil analisis variansi terhadap jumlah leukosit ikan nila "gift" (Gambar 1) yang diberi probiotik menunjukkan pengaruh yang sangat nyata ( $P < 0,01$ ). Demikian pula, pemberian ujiantang dengan *A. hydrophila* pada hari yang telah ditetapkan menunjukkan pengaruh yang nyata ( $P < 0,05$ ). Hasil analisis variansi juga menunjukkan pengaruh yang sangat nyata ( $P < 0,01$ ) pada interaksi antara pemberian probiotik dengan ujiantang. Untuk mengetahui perlakuan interaksi yang mana yang memberikan pengaruh sangat nyata terhadap jumlah leukosit, maka dilakukan uji beda nyata terkecil.

Hasil uji beda nyata terkecil terhadap jumlah leukosit yang diberi perlakuan interaksi menunjukkan bahwa pemberian perlakuan interaksi probiotik selama 14 hari dengan ujiantang hari ke 14 mempunyai jumlah leukosit tertinggi dibandingkan dengan perlakuan interaksi probiotik selama 7 hari tanpa ujiantang serta perlakuan interaksi probiotik selama 14 hari yang diujiantang pada hari ke 28 (tabel 1).

Tabel 1. Jumlah leukosit ikan nila "gift" yang diberi perlakuan interaksi antara probiotik dengan ujiantang

Perlakuan	Jumlah leukosit rata-rata±Standar Deviasi
C <sub>14</sub> c <sub>14</sub>	268,25±107,78 a
C <sub>14</sub> a <sub>0</sub>	266,41±12,212 ab
D <sub>21</sub> b <sub>7</sub>	254,92±6,102 abc
A <sub>0</sub> e <sub>28</sub>	247,84±24,148 abcd
A <sub>0</sub> e <sub>14</sub>	242,10±1,202 abcde
A <sub>0</sub> a <sub>0</sub>	235,77±16,575 abcdef
C <sub>14</sub> b <sub>7</sub>	233,14±28,885 abcdef
B <sub>7</sub> c <sub>14</sub>	230,93±44,633 abcdef
D <sub>21</sub> d <sub>21</sub>	196,34±19,990 abcdefg
C <sub>14</sub> d <sub>21</sub>	186,59±34,104 bedefgh
D <sub>21</sub> c <sub>14</sub>	183,69±51,343 cdefghi
E <sub>28</sub> c <sub>28</sub>	176,61±4,002 cdefghi
E <sub>28</sub> b <sub>7</sub>	171,08±34,097 defghi
E <sub>28</sub> d <sub>21</sub>	165,63±11,526 efghi

E <sub>28 c14</sub>	159,26±8,436 fghi
D <sub>21 a0</sub>	158,98±48,762 fghi
D <sub>21 e28</sub>	155,39±14,333 fghij
B <sub>7 e28</sub>	155,66±37,929 fghij
B <sub>7 d21</sub>	141,50±21,234 ghij
E <sub>28 a0</sub>	132,85±1,329 ghij
A <sub>0 d21</sub>	121,73±89,385 ghij
C <sub>14 e28</sub>	114,36±21,022 hij
B <sub>7 b7</sub>	104,85±26,637 hij
A <sub>0 b7</sub>	104,69±68,052 ij
B <sub>7 a0</sub>	75,425±4,688 j

Keterangan :

Huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyata pada taraf 5%.

Ao	= Tanpa pemberian probiotik; ao	= Tanpa ujiantang;
B7	= Pemberian probiotik selama 7 hari; b7	= Ujiantang hari ke 7;
C14	= Pemberian probiotik selama 14 hari; c14	= Ujiantang hari ke 14;
D21	= Pemberian probiotik selama 21 hari; d21	= Ujiantang hari ke 21;
E28	= Pemberian probiotik selama 28 hari; e28	= Ujiantang hari ke 28.

Berdasarkan hasil pengamatan dapat diketahui bahwa respon imun ikan nila "gift" berupa kenaikan jumlah leukosit yang tertinggi ( $7,77 \times 10^4$  sel/ml) terjadi pada pemberian probiotik selama 14 hari yang diuji tantang pada hari ke 14. Namun, apabila uji tantang dilakukan pada hari ke 28, maka ternyata jumlah leukosit telah mengalami penurunan yang besar pula. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian probiotik yang berakibat pada meningkatnya respon imun nila "gift" hanya berlangsung dalam lama waktu 14 hari. Hasil pengamatan juga menunjukkan bahwa pemberian probiotik selama 7 hari tanpa uji tantang dengan *A. hydrophila* memberikan respon imun ikan nila gift yang minimal. Hal ini disebabkan pada hari ke 7 pemberian probiotik tersebut respon kekebalan ikan baru mulai terbentuk. Sesuai dengan pendapat Walczak (1985) dalam Setyowati *et al.* (2004) bahwa perubahan jumlah leukosit dapat diamati 7 hari setelah pemberian immunostimulan.

Leukosit bertanggung jawab dalam sistem pertahanan tubuh sebagian besar leukosit ditransfer ke daerah-daerah infeksi untuk memberikan respon pertahanan yang cepat dan tanggap terhadap setiap agen infeksi. Menurut Johnny *et al.* (2005) meningkatnya jumlah leukosit yang berfungsi sebagai sel fagosit mempunyai kemampuan intrinsik untuk mengikat mikroorganisma secara langsung dan dalam kerjanya sel fagosit berinteraksi dengan komplemen dan sistem kekebalan spesifik. Leukosit yang termasuk fagosit memegang peran

yang sangat penting untuk mempertahankan diri terhadap masuknya antigen seperti antigen bakteri dengan cara menghancurkan bakteri secara non spesifik dengan proses fagositosis (Irianto, 2005). Peningkatan jumlah leukosit menunjukkan indikator peningkatan sistem imun ikan nila "gift", hal ini sesuai dengan yang diungkapkan oleh Lagler *et al.* (1977) dalam Affandi dan Tang (2002) bahwa fungsi dari sel darah putih adalah sebagai komponen yang memelihara kekebalan tubuh.

Irianto (2002) menyatakan aktivitas fagositosis merupakan bentuk respon sel-sel imunokompeten terhadap antigen atau imunostimulan sehingga dapat terjadi pada beberapa peristiwa seperti pemberian probiotik.

Selain interaksi antara pemberian probiotik dengan uji tantang, hasil analisis variansi pemberian probiotik sendiri memberikan pengaruh yang sangat nyata terhadap jumlah leukosit. Hasil uji beda nyata terkecil menunjukkan bahwa pemberian probiotik selama 2 minggu memberikan jumlah leukosit tertinggi dibandingkan dengan pemberian probiotik selama 7 hari ( $P < 0,05$ ; Tabel 2).

Tabel 2. Jumlah leukosit ikan nila "gift" yang diberi probiotik pada lama waktu yang berbeda

Lama waktu pemberian probiotik (hari)	Jumlah leukosit rata-rata±Standar Deviasi
0	189,80 ± 77,250 a
7	141,20 ± 59,985 b
14	213,30 ± 72,758 a
21	189,50 ± 45,444 a
28	160, 50 ± 20, 468 ab

Tabel 3. Jumlah leukosit ikan nila "gift" yang diuji tantang pada lama waktu yang berbeda

Lama waktu pemberian uji tantang (hari)	Jumlah leukosit rata-rata ± Standar Deviasi
0	173,40 ± 75,223 b
7	173,20 ± 72,001 b
14	216,50 ± 59,638 a
21	161,80 ± 44,453 b
28	169,40 ± 49,219 b

Hasil pemberian probiotik selama 2 minggu (14 hari) meningkatkan jumlah leukosit ikan nila "gift" yang tertinggi dibandingkan lama waktu yang lebih pendek ataupun lebih panjang dari lama waktu 14 hari. Hasil penelitian ini sama dengan hasil penelitian Irianto dan Austin (2002) serta Istiqomah (2004) yang mengemukakan bahwa pemberian probiotik selama dua minggu dapat menstimulasi kenaikan leukosit tertinggi. Pemberian probiotik selama 21 hari dan 28 hari mengalami penurunan, hal ini dikarenakan pemberian probiotik yang terus menerus akan menurunkan efektifitasnya dan probiotik sudah tidak dianggap lagi sebagai antigen seperti yang diungkapkan oleh Affandi dan Tang (2002) bahwa benda asing yang masuk yang berasal dari luar tubuh bila sudah dikenal maka tidak lagi dianggap sebagai antigen.

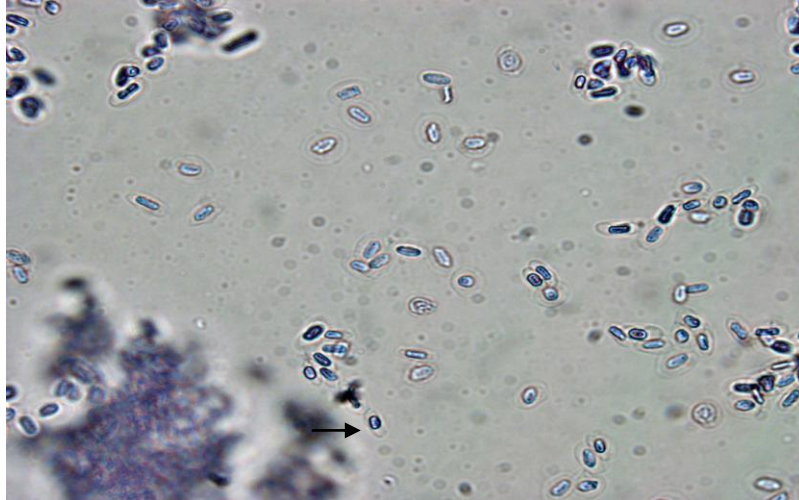
Hasil analisis variansi terhadap uji tantang sendiri pada ikan nila "gift" yang tidak diberi probiotik menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap jumlah leukosit (Lampiran 6). Hasil uji beda nyata terkecil menunjukkan bahwa pemberian uji tantang hari ke 14 memberikan jumlah leukosit tertinggi dibandingkan dengan pemberian uji tantang hari ke 0, 7, 21 maupun 28. Hal ini karena 21 hari adalah jumlah optimal untuk respon spesifik (antibodi) sedangkan untuk respon seluler (leukosit) pada 14 hari (Kresno, 1996).

Pada penelitian ini hasil uji tantang menunjukkan bahwa pemberian *A. hydrophila* pada hari ke 14 merupakan waktu yang memberikan respon imun ikan nila "gift" paling maksimal (Tabel 3). Dengan demikian, maka baik faktor tunggal pemberian probiotik maupun uji. tantang memperkuat hasil analisis variansi terhadap kombinasi keduanya. Menurut Irianto dan Austin (2004) pada saat uji tantang dengan

patogen bahwa probiotik cenderung berperan menguntungkan dalam menstimulasi respon imun. Bukti ketahanan ikan yang tinggi terhadap infeksi didukung jumlah leukosit pada dosis infeksi yang tinggi. Dengan kata lain tingginya jumlah leukosit membuktikan respon fisiologi terhadap serangan bakteri berlangsung (Putri *et al.*, 2004).

Penghambatan pertumbuhan *A. hydrophila* oleh probiotik karena terjadi adanya interaksi yang bersifat negatif atau merugikan terhadap *A. hydrophila* dan dengan semakin menurunnya jumlah sel *A. hydrophila* akan mengakibatkan semakin menurunnya patogenitas *A. hydrophila*. Pada uji tantang *in vitro* dengan patogen tampak bahwa probiotik A3-51 cenderung berperan menguntungkan dalam menstimulasi respon imun (Irianto dan Austin, 2004). Hasil penelitian Irianto (2002) menyatakan bahwa jumlah ikan mas yang mengalami mortalitas setelah 10 hari pemberian probiotik A3-51 dengan uji tantang *A. salmonicida* ORN 6 setelah disuntik intramuscular menunjukkan A3-51 memberikan hasil mortalitas terendah dibanding dengan pemberian probion A1-6, A3-47S dan BA211.

Hasil penelitian Irianto dan Austin (2002) menunjukkan bahwa invasi probiotik akan menimbulkan rangsang saluran cerna yang lebih lanjut mengakibatkan aktivasi makrofag. Menurut Kresno (1996) makrofag teraktivasi akan mengeluarkan sitokin yaitu IL-18 dan IL-18 kemudian meningkatkan sensitivitas limfosit (sel T dan sel B) sehingga jumlahnya meningkat, sedangkan IL-1 akan merangsang sekresi IL-4 yang selanjutnya bersama *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF) meningkatkan pertumbuhan koloni granulosit. Peningkatan jumlah limfosit dan granulosit mengakibatkan meningkatnya jumlah leukosit .



Gambar 1. Leukosit ikan nila "gift" (perbesaran 1000x).

#### 4.2 Jumlah makrofag

Hasil analisis variansi jumlah makrofag ikan nila "gift" (Gambar 2) yang diberi probiotik menunjukkan pengaruh yang sangat nyata ( $P < 0,01$ ). Pemberian uji tantang dengan *A. hydrophila* pada hari yang telah ditetapkan, setelah pemberian probiotik menunjukkan tidak berpengaruh yang nyata ( $P > 0,05$ ). Hasil analisis variansi juga menunjukkan pengaruh yang nyata ( $P < 0,05$ ; Lampiran 8) pada interaksi antara pemberian probiotik dengan uji tantang. Untuk mengetahui pada interaksi mana yang memberikan pengaruh yang sangat nyata terhadap jumlah makrofag maka dilakukan uji beda nyata terkecil.

Hasil uji beda nyata terkecil terhadap jumlah makrofag pada ikan yang diberi perlakuan

interaksi menunjukkan bahwa pemberian perlakuan interaksi probiotik selama 14 hari tanpa uji tantang mempunyai jumlah makrofag tertinggi dibandingkan dengan perlakuan interaksi probiotik selama 28 hari dan diuji tantang pada hari ke 7 (Tabel 4).

Berdasarkan tabel 4 dapat diketahui bahwa respon imun ikan nila "gift" berupa kenaikan jumlah makrofag yang tertinggi ( $3,65 \times 10^8$  sel/ml) terjadi pada pemberian probiotik selama 14 hari tanpa uji tantang. Namun, apabila dilakukan uji tantang pada hari ke 28, maka ternyata jumlah makrofag telah mengalami penurunan yang besar pula  $1,45 \times 10^8$  sel/ml. Pemberian probiotik selama 28 hari dengan uji tantang *A. hydrophila* pada hari ke 7 memberikan respon ikan nila gift yang minimal yaitu  $0,85 \times 10^8$  sel/ml.

Tabel 4. Jumlah makrofag ikan nila "gift" yang diberi perlakuan interaksi antara probiotik dengan uji tantang

Interaksi pemberian probiotik dengan uji tantang	Jumlah makrofag rata-rata $\pm$ standar deviasi
C <sub>14</sub> a <sub>0</sub>	$3,65.10^8 \pm 3,536.10^7$ a
E <sub>28</sub> d <sub>21</sub>	$3,55.10^8 \pm 4,95.10^7$ a
C <sub>14</sub> b <sub>7</sub>	$3,45.10^8 \pm 2,121.10^7$ a
C <sub>14</sub> d <sub>21</sub>	$3,15.10^8 \pm 1,909.10^8$ ab
A <sub>0</sub> c <sub>14</sub>	$3,05.10^8 \pm 1,626.10^8$ abc
C <sub>14</sub> c <sub>14</sub>	$2,55.10^8 \pm 7,071.10^6$ abcd
E <sub>28</sub> c <sub>14</sub>	$2,45.10^8 \pm 7,071.10^6$ abcde
B <sub>7</sub> b <sub>7</sub>	$2,40.10^8 \pm 4,243.10^7$ abcde
E <sub>28</sub> e <sub>28</sub>	$2,35.10^8 \pm 9,192.10^7$ abcde
B <sub>7</sub> c <sub>14</sub>	$2,30.10^8 \pm 4,243.10^7$ bcdef
B <sub>7</sub> a <sub>0</sub>	$1,95.10^8 \pm 3,536.10^7$ bcdef
D <sub>21</sub> c <sub>14</sub>	$1,90.10^8 \pm 1,414.10^7$ bcdef

A <sub>0</sub> d <sub>21</sub>	$1,80.10^8 \pm 1,414.10^7$ bcdef
D <sub>21</sub> b <sub>7</sub>	$1,75.10^8 \pm 6,364.10^7$ cdef
A <sub>0</sub> e <sub>28</sub>	$1,75.10^8 \pm 6,364.10^7$ cdef
D <sub>21</sub> a <sub>0</sub>	$1,70.10^8 \pm 1,414.10^7$ cdef
E <sub>28</sub> a <sub>0</sub>	$1,65.10^8 \pm 2,121.10^7$ def
A <sub>0</sub> b <sub>7</sub>	$1,50.10^8 \pm 2,828.10^7$ def
C <sub>14</sub> e <sub>28</sub>	$1,45.10^8 \pm 2,121.10^7$ def
D <sub>21</sub> e <sub>28</sub>	$1,40.10^8 \pm 1,414.10^7$ def
B <sub>7</sub> d <sub>21</sub>	$1,40.10^8 \pm 2,828.10^7$ def
A <sub>0</sub> a <sub>0</sub>	$1,35.10^8 \pm 3,536.10^7$ def
D <sub>21</sub> d <sub>21</sub>	$1,25.10^8 \pm 7,071.10^6$ def
B <sub>7</sub> e <sub>28</sub>	$1,05.10^8 \pm 7,071.10^6$ ef
E <sub>28</sub> b <sub>7</sub>	$0,85.10^8 \pm 7,071.10^6$ f

Keterangan :

Huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyata pada taraf 5%.

- A<sub>0</sub> = Tanpa pemberian probiotik; a<sub>0</sub>= Tanpa uji tantang;  
 B<sub>7</sub> = Pemberian probiotik selama 7 hari; b<sub>7</sub>= Uji tantang hari ke 7;  
 C<sub>14</sub> = Pemberian probiotik selama 14 hari; c<sub>14</sub>= Uji tantang hari ke 14;  
 D<sub>21</sub> = Pemberian probiotik selama 21 hari; d<sub>21</sub>= Uji tantang hari ke 21;  
 E<sub>28</sub> = Pemberian probiotik selama 28 hari; e<sub>28</sub>= Uji tantang hari ke 28.

Tabel 5. Jumlah makrofag ikan nila "gift" pada lama waktu pemberian probiotik yang berbeda

Lama waktu pemberian probiotik (hari)	Jumlah makrofag rata-rata $\pm$ standar deviasi
0	$1,890.10^8 \pm 8,762.10^7$ b
7	$1,820.10^8 \pm 6,033.10^7$ b
14	$2,850.10^8 \pm 1,165.10^8$ a
21	$1,600.10^8 \pm 3,399.10^7$ b
28	$2,170.10^8 \pm 1,011.10^8$ b

Hasil uji beda nyata terkecil tersebut memberikan indikasi bahwa respon imun berupa peningkatan jumlah makrofag dapat berlangsung selama 28 hari pemberian probiotik. Angka 28 hari dapat dianalisis dari perubahan monosit menjadi makrofag disaluran darah, hal ini menunjukkan respon menunjukkan respon imun non spesifik ikan nila "gift" terhadap infeksi bakteri *A. hydrophila* yang menyerang. Peningkatan jumlah makrofag pada pemberian probiotik menunjukkan telah terjadi stimulasi imun non spesifik terhadap sel makrofag. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Irianto dan Austin (2002) bahwa penggunaan probiotik dapat meningkatkan jumlah sel fagosit makrofag. Respon imun ini sesuai

dengan jumlah leukosit yang mencapai maksimum pada pemberian probiotik selama 14 hari dan uji tantang pada hari ke 14 (Tabel 4). Dengan demikian, diperlukan rentang waktu 14 hari bagi leukosit untuk bermigrasi menembus dinding endotel dan berdiferensiasi di jaringan.

Telah diuraikan sebelumnya bahwa jumlah makrofag ikan nila "gift" dapat meningkat pada pemberian perlakuan interaksi probiotik selama 28 hari dengan uji tantang hari ke 28. Meskipun demikian, hasil uji beda nyata terkecil terhadap faktor tunggal, pemberian probiotik saja menunjukkan jumlah makrofag yang tertinggi dicapai pada pemberian probiotik selama 14 hari (Tabel 5).

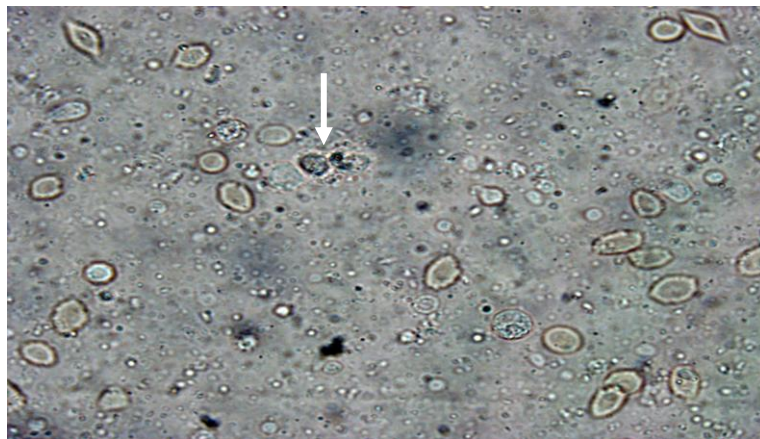
Hasil penelitian ini sama dengan yang diperoleh Sinarsa (2004) yang menunjukkan rerata jumlah makrofag ginjal ikan gurami (*Osphronemus gourami* Lac.) tertinggi dicapai pada lama pemberian probiotik selama 2 minggu. Hal ini sesuai dengan penelitian Irianto dan Austin (2002) bahwa penggunaan probiotik dapat meningkatkan jumlah sel fagosit makrofag. Peningkatan makrofag merupakan salah satu bentuk respon imunologik pada ikan.

Peningkatan jumlah makrofag ginjal pada ikan nila gift tersebut terjadi karena sel-sel monosit telah distimulasi oleh probiotik yang ditambahkan kedalam pakannya. Seperti yang dinyatakan Irianto dan Austin (2002) bahwa probiotik yang ditambahkan kedalam pakan berfungsi sebagai imunostimulan karena dapat menyebabkan proliferasi dan diferensiasi sel-sel yang distimulasinya. Menurut Rukyani *et al.* (1999) bahwa imunostimulan terbukti memacu sistem pertahanan non spesifik ikan lele dengan meningkatkan jumlah sel fagosit mononuklear (monosit) dan polimorfonuklear (neutrofil). Menurut Irianto dan Austin (2002), selain meningkatkan jumlah sel makrofag ginjal, pemberian probiotik juga meningkatkan aktivitas fagositosis dan sel makrofag yang berperan untuk membunuh bakteri atau benda asing.

Pengaruh probiotik selain meningkatkan jumlah leukosit ternyata dapat meningkatkan aktivitas makrofag dan aktivitas lisozim serum (Irianto, 2002). Hasil analisis variansi pengaruh kombinasi probiotik dengan uji tantang terhadap jumlah makrofag ternyata juga menunjukkan pengaruh yang nyata ( $P < 0,05$ ). Hasil uji beda nyata terkecil menunjukkan bahwa jumlah

makrofag tertinggi terdapat pada ikan nila "gift" yang diberi probiotik selama 14 hari tanpa uji tantang dibandingkan dengan ikan nila "gift" yang diberi probiotik lebih lama yaitu sampai hari ke 28 dan kemudian diuji tantang pada hari yang sama ( $P < 0,05$ ).

Hasil penelitian ini memperkuat hasil sebelumnya pada jumlah leukosit ikan nila "gift" yang diberi probiotik selama 14 hari sama dengan jumlah makrofag pada hari yang sama. Dengan demikian, maka dapat dikatakan bahwa meningkatnya jumlah leukosit bermakna pula pada peningkatan jumlah makrofag yang berarti pula respon imun ikan nila "gift" mencapai maksimal apabila diberi probiotik selama 14 hari. Telah diuraikan sebelumnya bahwa pemberian faktor tunggal berupa probiotik selama 14 hari menaikkan jumlah makrofag ikan nila "gift", namun hasil analisis variansi terhadap jumlah makrofag dengan uji tantang *A. hydrophila* berpengaruh tidak nyata terhadap jumlah makrofag ( $P > 0,05$ ). Hasil ini menunjukkan bahwa uji tantang tidak lagi meningkatkan jumlah makrofag karena pemberian probiotik itu sendiri sudah cukup menaikkan jumlah makrofag. Dengan demikian, makrofag yang terbentuk akibat pemberian probiotik telah mampu menghambat *A. hydrophila* yang diinfeksi. Baratawidjaja (2002) mengemukakan bahwa makrofag dapat bertahan hidup sampai beberapa bulan apabila diberi uji tantang *A. hydrophila* sehingga senantiasa siap membunuh bakteri atau antigen yang masuk ke dalam tubuh ikan. Menurut Affandi dan Tang (2002), makrofag mampu memfagosit bakteri dengan menghancurkan patogen melalui proses penelanan dalam rangkaian proses fagositosis.



Gambar 2. Sel makrofag ikan nila "gift" (perbesaran 1000x).

#### 4.5. Persentase kematian

Hasil analisis variansi persentase kematian ikan nila "gift" yang diberi probiotik menunjukkan pengaruh sangat nyata ( $P < 0,01$ ). Demikian pula, pemberian ujiantang dengan *A. hydrophila* pada hari yang telah ditetapkan, setelah pemberian probiotik menunjukkan pengaruh yang sangat nyata pula ( $P < 0,01$ ). Hasil analisis variansi juga menunjukkan pengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) pada interaksi antara pemberian probiotik dengan ujiantang. Untuk mengetahui

interaksi mana yang memberikan pengaruh sangat nyata terhadap persentase kematian, maka dilakukan uji beda nyata terkecil.

Hasil uji beda nyata terkecil terhadap persentase kematian yang diberi perlakuan interaksi menunjukkan bahwa mortalitas ikan nila "gift" paling besar dijumpai pada perlakuan tanpa pemberian probiotik baik tanpa ujiantang maupun dengan ujiantang dibandingkan dengan mortalitas yang terjadi pada ikan nila "gift" yang diberi probiotik baik tanpa ujiantang maupun diberi ujiantang ( $P < 0,05$ ; Tabel 6).

Tabel 6. Persentase kematian ikan nila "gift" yang diberi perlakuan interaksi antara probiotik dengan ujiantang

Perlakuan	Rata-rata persentase kematian $\pm$ standar deviasi
A <sub>0</sub> a <sub>0</sub>	10,020 $\pm$ 0,000 a
A <sub>0</sub> b <sub>7</sub>	10,020 $\pm$ 0,000 a
A <sub>0</sub> d <sub>21</sub>	10,020 $\pm$ 0,000 a
D <sub>21</sub> e <sub>28</sub>	10,020 $\pm$ 0,000 a
D <sub>21</sub> b <sub>7</sub>	9,355 $\pm$ 0,940 ab
E <sub>28</sub> b <sub>7</sub>	9,355 $\pm$ 0,940 ab
B <sub>7</sub> b <sub>7</sub>	8,690 $\pm$ 0,000 abc
C <sub>14</sub> b <sub>7</sub>	8,565 $\pm$ 2,058 abc
A <sub>0</sub> e <sub>28</sub>	8,565 $\pm$ 2,508 abc
A <sub>0</sub> c <sub>14</sub>	8,565 $\pm$ 2,508 abc
B <sub>7</sub> c <sub>14</sub>	7,275 $\pm$ 3,882 abcd
C <sub>14</sub> d <sub>21</sub>	7,110 $\pm$ 0,000 abcd
D <sub>21</sub> a <sub>0</sub>	7,110 $\pm$ 0,000 abcd
E <sub>28</sub> a <sub>0</sub>	7,110 $\pm$ 0,000 abcd
E <sub>28</sub> c <sub>14</sub>	7,110 $\pm$ 0,000 abcd
E <sub>28</sub> d <sub>21</sub>	7,110 $\pm$ 0,000 abcd
B <sub>7</sub> e <sub>28</sub>	6,080 $\pm$ 1,457 bcde
C <sub>14</sub> a <sub>0</sub>	6,080 $\pm$ 1,457 bcde
C <sub>14</sub> e <sub>28</sub>	6,080 $\pm$ 1,457 bcde
C <sub>14</sub> c <sub>14</sub>	6,080 $\pm$ 1,457 bcde
E <sub>28</sub> e <sub>28</sub>	5,810 $\pm$ 0,000 cde
D <sub>21</sub> c <sub>14</sub>	5,050 $\pm$ 0,000 de
D <sub>21</sub> d <sub>21</sub>	3,535 $\pm$ 3,995 ef
B <sub>7</sub> d <sub>21</sub>	2,880 $\pm$ 3,069 ef
B <sub>7</sub> a <sub>0</sub>	0,710 $\pm$ 0,000 f

Keterangan :

Huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyata pada taraf 5%.

A<sub>0</sub> = Tanpa pemberian probiotik; a<sub>0</sub>= Tanpa ujiantang;

B<sub>7</sub> = Pemberian probiotik selama 7 hari; b<sub>7</sub>= Ujiantang hari ke 7;

C<sub>14</sub>= Pemberian probiotik selama 14 hari; c<sub>14</sub>= Ujiantang hari ke 14;

D<sub>21</sub>= Pemberian probiotik selama 21 hari; d<sub>21</sub>= Ujiantang hari ke 21;

E<sub>28</sub>= Pemberian probiotik selama 28 hari; e<sub>28</sub>= Ujiantang hari ke 28.

Berdasarkan tabel 6, dapat diketahui bahwa pemberian probiotik memberikan tingkat perlindungan yang lebih tinggi terhadap infeksi *A. hydrophila*. Hasil ini menunjukkan potensi probiotik yang menjanjikan mengingat sifat virulensi *A. hydrophila* yang tinggi terutama pada ikan air tawar. Lamers dan Muiswinkell (1986) melaporkan bahwa bakteri *A. hydrophila* merupakan bakteri patogen yang dapat menyebabkan kematian yang tinggi pada ikan budidaya dan penularan dalam air sangat cepat.

Selain interaksi antara pemberian probiotik dengan ujiantang, hasil analisis variansi pemberian probiotik memberikan pengaruh sangat nyata terhadap persentase kematian. Hasil uji beda nyata terkecil menunjukkan bahwa pemberian probiotik selama 7 hari memberikan persentase kematian yang rendah ( $P < 0,01$ ; Tabel 7).

Berdasarkan tabel 7 diketahui bahwa persentase kematian tertinggi terjadi pada perlakuan tanpa pemberian probiotik, sedangkan persentase kematian terendah ditunjukkan pada pemberian probiotik selama 7 hari.

Pemberian probiotik A3-51 berpengaruh terhadap kelangsungan hidup ikan nila gift setelah ujiantang dengan bakteri *A. hydrophila*. Probiotik yang masuk kedalam tubuh ikan akan dianggap sebagai antigen yang menguntungkan bagi ikan karena memacu pembentukan respon imun, normalnya sampai 21 hari terlihat pada perlakuan pemberian probiotik sampai hari ke 21 hari dan ujiantang pada hari ke 21 ditingkat mortalitas terendah.

Hasil analisis variansi terhadap ujiantang juga menunjukkan pengaruh nyata terhadap persentase kematian ikan nila "gift". Hasil uji beda nyata terkecil menunjukkan ujiantang pada hari ke 7 menghasilkan persentase tertinggi jika dibandingkan dengan ujiantang yang dilakukan hari ke 0, 14, 21, dan 28 hari (Tabel 8).

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa lama waktu pemberian ujiantang berpengaruh

terhadap persentase kematian ikan nila "gift". Persentase kematian tertinggi yaitu pada pemberian ujiantang hari ke 7. Sedangkan persentase kematian untuk pemberian ujiantang pada hari ke 0, 14, 21, dan 28 menunjukkan persentase yang tidak berbeda.

Gejala-gejala klinis yang ditimbulkan oleh ikan nila gift yang diujiantang dengan bakteri *A. hydrophila* antara lain nafsu makan berkurang, gerakan ikan yang lambat, cenderung berenang di atas permukaan, insang menjadi pucat. Gejala klinis dari serangan *A. hydrophila* tidak selalu muncul pada setiap hewan uji, terutama benih. Menurut Ellis (1998) dalam Hernayanti *et al.* (2004) MAS merupakan penyakit sistemik yang terkadang menyebabkan kematian.

Ikan yang diinjeksi dengan bakteri patogen *A. hydrophila* selalu berenang dipermukaan perairan, tidak mau makan ada yang berenang dengan tubuh tegak lurus dengan kepala keatas, ada pula yang diam di dasar perairan seperti ikan mati. Beberapa lama setelah penyuntikkan daerah sekitar luka akan berwarna merah bahkan sirip punggung dan daerah sekitar tutup insang juga turut berwarna merah dan terjadi pembengkakan disekitar perut. Pada beberapa ekor ikan terlihat kerusakan jaringan terjadi sampai menembus kesisi lain dan akhirnya akan mati (Simanjuntak *et al.*, 2003).

Kondisi air dalam akuarium pemeliharaan masih dalam kisaran normal untuk mendukung kehidupan ikan nila "gift", pengukuran suhu air berkisar antara 26-27°C dan pH berkisar 6-7. Kondisi tersebut masih dalam batas layak untuk pemeliharaan ikan nila "gift". Hal ini sesuai dengan pendapat Djarijah (2002) bahwa suhu air untuk pemeliharaan ikan nila "gift" berkisar antara 25-28°C sedangkan pH berkisar antara 6,5-8,5. Oksigen terlarut tidak diukur karena air akuarium diaerasi secara kontinyu sehingga suplai oksigen dapat terpenuhi.

Tabel 7. Persentase kematian ikan nila "gift" yang diberi probiotik pada lama waktu yang berbeda

Lama waktu pemberian probiotik (hari)	Persentase kematian rata-rata±Standar Deviasi
0	9,4380±1,2270 a
7	5,1270±3,5302 c
14	6,7830±1,4955 b
21	7,0140±2,9405 b
28	7,2990±1,2467 b

Tabel 8. Persentase kematian ikan nila "gift" yang diberi ujiantang pada lama waktu yang berbeda

Lama waktu pemberian ujiantang (hari)	Persentase kematian rata-rata±Standar Deviasi
0	6,2060±3,2477 b
7	9,1970±0,9872 a
14	6,8160±1,9849 b
21	6,1310±3,2331 b
28	7,3110±2,0240 b

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Lama waktu pemberian probiotik dan ujiantang dapat meningkatkan jumlah leukosit, makrofag, persentase leukosit dan jumlah eritrosit.
2. Pemberian probiotik selama 7 hari tanpa diujiantang dapat meningkatkan respon imun dan menurunkan persentase kematian ikan nila "gift".

## DAFTAR PUSTAKA

- Affandi, R. dan Tang, M.U. 2002. *Fisiologi Hewan Air*. Institut pertanian Bogor. Bogor. 217 hal.
- Arie U. 1998. *Pembenihan dan Pembesaran Nila Gift*. Sukabumi. 128 hal.
- Baratawidjaja. 2002. *Imunologi Dasar Edisi Kelima*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 457 hal.
- Byu J. W, Y. Benno and T. K. on. 1997. Short Communication Effect of Lactobacillus sp DS-12 in Flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Applied Microbiology* 43 : 305 – 308.
- Djariah, A.S. 2002. *Budidaya Nila Gift Secara Intensif*. Kanisius, Yogyakarta. 87 hal.
- Gismondo M. R. L. Drago., and A. Lombardi. 1999. Riview of Probiotics Available to Modify Gastrointestinal Flora. *International Journal of Antimicrobial Agents* 12 : 287 – 292.
- Hernayanti, A. Irianto dan E. Herlina. 2004. Respon Imun Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) Terhadap Vaksin "Whole Cell" *Aeromonas hydrophila* yang diberikan Secara Rendaman dengan dosis yang berbeda. *Prosiding Pengendalian Penyakit Ikan dan Udang Berbasis Imunisasi dan Biosecurity*. Seminar Nasional Penyakit Ikan dan Udang IV. Purwokerto. Hal 67-72.
- Irianto A. 2002. Use of Probiotics against *Aeromonas salmonicida* Orn 6 in Goldfish, *Carassius auratus*. *Biosfera* 19 (2) : 55 – 58.
- Irianto A and B. Austin. 2002. Probiotics in Aquaculture. *Journal of Fish Diseases* 25 : 633 – 642.
- Irianto A. 2003. *Probiotik Akuakultur*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. 125 hal.
- Irianto A. 2005. Efektivitas Protein Berbagai Isolat Bakteri yang Diberikan Melalui Pakan terhadap Infeksi Atifisial *Aeromonas salmonicida* secara Injeksi Intramuscular. *Prosiding Pengendalian Penyakit Ikan dan Udang Berbasis Imunisasi dan Biosecurity*. Seminar Nasional Penyakit Ikan dan Udang IV. Purwokerto. Hal 3180–321.
- Istiqomah N. 2004. Pengaruh Pemberian probiotik A3-51 Melalui Pakan dengan Lama Waktu yang Berbeda Terhadap Respon Imun

- Nonspesifik Seluler Ikan Patin (*Pangasius pangasius* Ham. Buck). *Skripsi*. Fakultas Biologi. Universitas Jenderal Soedirman. Purwokerto, 38 Hal (Tidak dipublikasikan).
- Johnny F, Giri N.A, Suwiryaa K, dan Reza D. 2005. Pengaruh Vitamin B dalam Pakan terhadap Sistem Kekebalan Benih Ikan Kerapu Bebek, *Cromileptes altivelis*. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia* 2 (1): 73 – 79.
- Kamiso H.N. 2004. Status Penyakit Ikan dan Pengendaliannya di Indonesia. *Prosiding Pengendalian Penyakit Ikan dan Udang Berbasis Imunisasi dan Biosecurity*. Seminar Nasional Penyakit Ikan dan Udang IV. Purwokerto. Hal 13 -21.
- Kresno S.B. 1996. *Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium Edisi Ketiga*. Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia. Jakarta. 347.
- Lamers C. H. J. and Muiswinkell, W. B. 1986. Natural and Aquired Agglutinin to *Aeromonas hydrophila* in Carp (*Cyprinus carpio*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 43: 619 – 624.
- Putri A.B, Suryaningsih S, Sukanto dan Sutisna Y. 2004. Vitamin C Dosis 500 mg/kg Pakan Meningkatkan Kelulusan Hidup Katak Lembu (*Catesbeiana strain*) yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Prosiding Pengendalian Penyakit Ikan dan Udang Berbasis Imunisasi dan Biosecurity*. Seminar Nasional Penyakit Ikan dan Udang IV. Purwokerto. Hal 73 - 79.
- Rukyani A, Sunarto A dan Taukhid. 1999. Pengaruh Pemberian Immunostimulan dan Penambahan Vitamin C pada Ransum Pakan Terhadap Peningkatan Daya Tahan Tubuh Ikan Lele Dumbo, *Clarias* sp. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia* 4 : 30–6.
- Sakai M, terutoyo, Yoshida and M. Kobayashi. 1995. Influence of the Immunostimulant, EF 203, on the Immune Responses of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, to *Renibacterium salmoninarium*. *Aquaculture* 138 : 61–67.
- Setyowati E.A, Dana D dan Pasaribu F.H. 2004. Potensi Spirulina platensis Sebagai Immunostimulan Pada Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy* Lac.). *Prosiding Pengendalian Penyakit Ikan dan Udang Berbasis Imunisasi dan Biosecurity*. Seminar Nasional Penyakit Ikan dan Udang IV. Purwokerto. Hal 157 - 167.
- Simanjuntak B.I.S, Wirawidjaja M.A, Dana D dan Supriyadi H. 2003. Histopatologis Organ Limpa dan Ginjal Ikan Patin Jambal (*Pangasius djambal* Bleeker) Akibat Pemberian Spirulina dalam Pakan Secara Diskontinyu. *Biosfera* 20 (20 : 61 – 66.
- Sugiyono. 2000. *Statistik untuk Penelitian*. CV Alfabeta, Bandung. 305 hal.
- Supriyadi H dan Taukhid. 2003. Potensi Immunogenik Patogen dan Alginat dalam Menimbulkan Kekebalan pada Ikan Patin Jambal. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia* 9 (2) : 433 – 46.
- Taufik P. 2002 Ketahanan Beberapa strain Ikan Gurame *Osphronemus gouramy* Lac. Terhadap Patogen *Aeromonas hydrophila*. *Sain Akuatik* 5 : 16 – 19.
- Yuwono E. 2003. *Buku Petunjuk Praktikum Fisiologi Hewan Air*. Fakultas Biologi. UNSOED. Purwokerto. 20 hal.