

Full Paper**PENINGKATAN IMUNITAS BENIH IKAN KERAPU LUMPUR, *Epinephelus coioides* TERHADAP INFEKSI VIRUS IRIDO DENGAN APLIKASI VITAMIN C DAN BAKTERIN****IMPROVEMENT TO IMMUNITY OF MANGROVE GROUPEL, *Epinephelus coioides* JUVENILES ON IRRIDOVIRUS INFECTION WITH APPLICATION VITAMIN C AND BACTERINE**Fris Johnny^{*)}, Des Roza^{*)} dan Agus Priyono^{*)}**Abstract**

An experiment to increase of immune system of mangrove grouper, *Epinephelus coioides* seed with application of vitamin C and immunostimulant have been done. The experiment was carried out in completely randomized design with three treatments in twoplicates. The mangrove grouper seed (5 cm total length) were treated with 1000 mg vitamin C/kg diet (A), 1000 mg vitamin C + 1 ml bacterin/kg diet (B), and control (C). Vitamin C and bacterin were given every 10 day during 60 days rearing. After 30 and 60 days fishes were challenged with irridovirus. At the end of experiment, the non-specific immune responses were examined. The result showed that at challenge test I, the highest survival rate was at treatment B (56.6%), followed by A (55.0%) and control (41.7%). On challenge test II, the highest survival rate was at treatment B (76.7%) followed by treatment A (68.4%) and control (48.3%). The highest phagocytic activity (PA) was obtained at treatment B (21.0%), followed by treatment A (18.5%) and control (9.5%). The highest of lysozyme activity (LA) value was obtained on treatment B (2.0 cm), followed by treatment A (1.9 cm) and control (1.3 cm). Combination of addition of ascorbic acid and immunostimulant gave higher survival rate compared to addition of immunostimulant only and control. Non-spesific immune response of mangrove grouper fry was significant different among treatment ($P < 0,05$).

Key words: irridovirus, immunity, immunostimulant, mangrove grouper, vitamin C, bacterine

Pengantar

Budidaya ikan kerapu dalam keramba jaring apung (KJA) di berbagai wilayah Indonesia semakin berkembang. Namun untuk ikan kerapu lumpur, *Epinephelus coioides* belum banyak dibudidayakan, meskipun produksi benih telah berhasil ditingkatkan. Dalam produksi benih masih ditemukan beberapa kendala dengan masih tingginya tingkat kematian pada stadia larva dan benih. Diduga salah satu

penyebab kematian adalah adanya infeksi penyakit, terutama infeksi virus irido. Infeksi virus terhadap ikan kerapu di Indonesia telah ditemukan dan akibat serangan penyakit tersebut menimbulkan mortalitas yang tinggi pada semua stadia. (Mahardika *et al.*, 2004). Selain viral nervous necrosis (VNN), infeksi virus irido juga merupakan kendala lain pada budidaya ikan kerapu. Pada ikan kerapu lumpur mulai dari stadia larva sampai ukuran benih, virus irido lebih patogen pada

^{*)} Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol. PO BOX 140, Singaraja 81101 Bali

^{*)} Penulis untuk korespondensi: E-mail : frisjravael@yahoo.com

kerapu lumpur dibandingkan dengan jenis ikan kerapu lainnya (Johnny *et al.*, 2005; Mahardika *et al.*, 2004).

Kasus kematian masal pada kerapu lumpur yang disebabkan oleh penyakit virus irido dikenal sebagai penyakit Sleepy Grouper Disease. Ikan yang terinfeksi menunjukkan gejala klinis berenang lemah atau diam di dasar bak. Setelah dilakukan pembedahan terlihat limpa membesar dua sampai tiga kali ukuran normal (Splénomegaly), insang pucat, pembesaran pada ginjal depan dan hati berwarna pucat atau membesar (Danayadol *et al.*, 1997; Chou *et al.*, 1998). Secara histopatologi ditemukan sel-sel yang membesar yang merupakan ciri khas dari infeksi iridovirus pada jaringan haematopoetik dan saluran pencernaan. Selanjutnya Kurita *et al.* (1998) melaporkan bahwa keberadaan virus ini di dalam tubuh ikan dapat dideteksi dengan polymerase chain reaction (PCR).

Salah satu upaya untuk meningkatkan ketahanan tubuh ikan adalah dengan penggunaan imunostimulan. Imunostimulan merupakan sekelompok senyawa biologi sintesis yang dapat meningkatkan respon imun non-spesifik. Imunostimulan yang dikenal antara lain β -glukan, peptidoglikan, lipopolisakarida, bakterin dan sebagainya. Aplikasi imunostimulan sudah banyak diterapkan pada beberapa jenis ikan baik melalui pakan, perendaman maupun melalui suntikan. Percobaan penggunaan imunostimulan pada ikan kerapu bebek telah dilakukan di Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol, Bali diantaranya penggunaan imunostimulan peptidoglikan dengan dosis 1% dalam pakan segar ikan lemuru yang dicacah halus dan ditambahkan vitamin campuran (Zafran *et al.*, 1998), pemberian imunostimulan peptidoglikan dalam pakan pelet dengan konsentrasi 0,2 g/kg pakan pada ikan kerapu bebek (Johnny *et al.*, 2001), dan penyuntikan peptidoglikan secara intraperitoneal dengan dosis 50 g pada benih ikan

kerapu Lumpur (Johnny & Roza, 2004). Tujuan penelitian ini adalah untuk meningkatkan imunitas benih ikan kerapu lumpur terhadap infeksi virus irido, sehingga diperoleh benih ikan kerapu lumpur yang tahan penyakit infeksi yang siap tebar di KJA untuk budidaya.

Bahan dan Metode

Bahan

Vitamin C yang digunakan adalah L-Ascorbyl-2-Phosphate-Magnesium (APM) dengan rumus kimia $(C_6H_6O_9P)_2Mg_3 \cdot 10H_2O$ berbentuk bubuk (Showa Denko). Bakterin yang digunakan berasal dari bakteri *Vibrio harveyi* yang dimatikan dengan 0,5% formalin selama 24 jam pada suhu 25°C. Setelah itu bakteri disentrifugasi pada 1.200 rpm selama 20 menit, kemudian dicuci sebanyak 3 kali dengan larutan garam fisiologis (0,85% NaCl). Kepadatan suspensi bakterin adalah 10^{10} cfu/ml dan diestimasi sebelum bakterin dimatikan dengan metode taburan (pour plate). Sebelum bakterin diberikan ke ikan uji dilakukan uji viabilitas pada medium *Tryptic Soy Agar* (Difco) selama 48 jam pada suhu 26°C. Apabila terjadi pertumbuhan, inaktivasi diulang kembali.

Penyiapan inokulum virus irido

Inokulum virus irido diekstrak dari benih kerapu lumpur yang terinfeksi virus irido dan dideteksi positif dengan Polymerase Chain Reaction (PCR). Organ limpa dan ginjal ikan tersebut diambil sebanyak 200 mg kemudian digerus dan tambahkan 200 ml 10 mM phosphate buffer saline (PBS), pH 7,2. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 2.000 rpm selama 20 menit pada 4°C, supernatan disaring dengan membran filter ukuran pori sebesar 0,45 μ m (Arimoto *et al.*, 1993).

Pemberian perlakuan

Benih ikan kerapu lumpur, *Epinephelus coioides* ukuran 5 cm berasal dari hatchery sekitar Gondol, Bali. Sebelum digunakan untuk penelitian benih

tersebut diaklimatisasi selama 7 hari dengan diberi pakan pelet yang sama dengan yang diberikan di hatchery. Selanjutnya 500 benih dipelihara dalam bak beton volume 2 m³ dan diberikan perlakuan. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 perlakuan dan 2 ulangan. Perlakuan yang dicobakan adalah pemberian vitamin C dan bakterin dalam pakan yaitu:

- (A).1000 mg vitamin C/kg pakan
- (B).1000 mg vitamin C + 1 mL /kg pakan
- (C).Tanpa perlakuan vitamin C dan bakterin

Pakan yang mengandung vitamin C dan bakterin diberikan setiap 10 hari selama 60 hari pemeliharaan. Setelah 30 dan 60 hari perlakuan dilakukan ujiantang dengan virus irido, dan pada akhir percobaan dilakukan pengambilan darah untuk pengujian respon imun non-spesifik dari masing-masing perlakuan. Parameter yang diamati adalah aktivitas fagositik (PA), indeks fagositik (IP), aktivitas lisosim (LA), dan sintasan.

Uji tantang

Uji tantang dengan virus irido dilakukan setelah 30 dan 60 hari perlakuan. Inokulum virus irido disuntikkan secara intramuskular, selanjutnya ikan dipelihara dalam bak polikarbonat volume 100 L yang diisi 80 L air laut dengan kepadatan 30 ekor/bak dengan pergantian air setiap hari. Pengamatan terhadap gejala klinis dan sintasan dilakukan selama 15 hari. Keberadaan virus irido dideteksi dengan PCR.

Deteksi virus irido dengan metoda PCR

Sebanyak 50-100 mg organ limpa atau ginjal ditempatkan dalam mikrotube dan ditambahkan bahan lisis trizol. Primer yang digunakan adalah hasil sekuensing dari genom DNA Red Seabream Irido virus (RSIV), dengan susunan forward primer 1F: '5-CTCAAACACTCTGGCTCATC-'3 dan reverse primer 1R:'5-GCACCAACACATCTCCTATC-'3. Amplifikasi dilakukan dengan reagen dari DNA-kit (promega) dan templet

DNA virus irido sampel. Amplifikasi dilakukan pada alat Progene (Techne) pada denaturasi 94°C selama 30 detik, suhu annealing 57°C selama 60 detik dan suhu extension/polimerisasi 72°C selama 60 detik sebanyak 30 siklus, kemudian ditambahkan suhu extension 72°C selama 5 menit. Hasil amplifikasi dielektrophoresis pada 1,5% agarose dalam 1 x TAE dan distaining menggunakan Ethidium Bromide. Gel agarose dibaca dengan Ultraviolet Transluminator dan didokumentasikan menggunakan kamera polaroid.

Koleksi leukosit dan pemisahan plasma

Setelah 60 hari pemeliharaan, ikan uji sampel dipingsankan dengan menggunakan bahan pembius FA-100 (Tanabe Seiyaku, Jepang) dengan kandungan minyak cengkeh pada dosis 0,2 ml/l. Sampel darah sebanyak 0,2-0,5 cc disedot dengan spuit plastik steril volume 1 cc yang didalamnya berisikan Heparin (Sigma) dan dimasukkan dalam tabung mikro (microtube). Koleksi darah disedot dengan tabung kapiler plastik, ditutup dengan lilin lebah dan disentrifusi pada kecepatan 1.200 rpm selama 5 menit. Tabung kapiler dipotong dengan gunting pada batas leukosit dengan eritrosit, leukosit dikoleksi dan disimpan pada tabung mikro baru, dan siap digunakan untuk uji fagositosis. Sisa koleksi darah pada tabung mikro disentrifusi dengan kecepatan 500 rpm selama 5 menit, kemudian dipisahkan plasma darah ke tabung mikro baru dengan mikropipet, plasma ini siap digunakan untuk uji aktivitas lisosim.

Uji aktivitas fagositik (PA) dan indeks fagositik (PI)

Uji PA dan PI menggunakan modifikasi dari metoda Siwicki & Anderson (1993) dan Ellis (1993). Untuk uji PA dan PI dibutuhkan bahan enzim *Zymosan A* (produksi Sigma) yang berasal dari *Saccharomyces cerevisiae*. 50 µl *Zymosan A* dalam *Phosphate Buffer Saline* (PBS), dicampur dengan dimasukkan kedalam tabung evendoff. Selanjutnya diambil 50 µl leukosit dalam microtube dan diaduk rata dengan mikro

pipet. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 25°C selama 1 jam. Setelah inkubasi, campuran tersebut dibuat preparat ulas tipis dan diwarnai dengan *May-Gruenwald's Solution Modified* dan *Gyemsa Solution 3%*. Aktivitas fagositik (PA) dan indeks fagositik (PI) dihitung berdasarkan rumus berikut

$$PA (\%) = \frac{\text{Fagositosis}}{\text{Total Leukosit}} \times 100\%$$

$$PI = \frac{\text{Jumlah Zymosan A}}{\text{Jumlah Fagosit}}$$

Uji aktivitas lisosim (LA)

Pengujian LA menggunakan modifikasi dari metoda Rowley (1993) dan Klontz (1997) yang. Pada Cawan petri yang berisikan media agar yang mengandung *Micrococcus lysodeikticus* (produksi Sigma), dibuat lubang kecil sebanyak tiga lubang pada permukaan agar dengan menggunakan straw. Plasma darah sebanyak 10 µl dan Chicken egg white lysozyme (Sigma) dimasukkan dalam lubang. Cawan petri diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar, kemudian diinkubasi pada suhu 25°C. Diameter cakram zona aktivitas lisosim (LA), diamati setiap hari selama 3 hari dihitung dengan berdasarkan rumus berikut:

$$LA (\text{cm}) = \frac{\text{Diameter plasma darah uji}}{\text{Diameter Kontrol}}$$

Analisis statistik

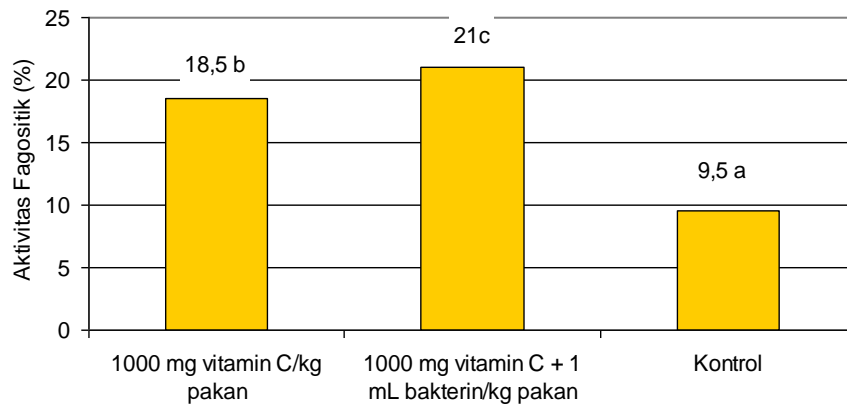
Data dari nilai persentase aktivitas fagositik, indeks fagositik dan diameter cakram aktivitas lisosim yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisis dengan ANOVA. Untuk mengetahui perlakuan yang berbeda dilakukan uji LSD (Least Significant Difference by Student's T) dengan level signifikan 95%.

Hasil dan pembahasan

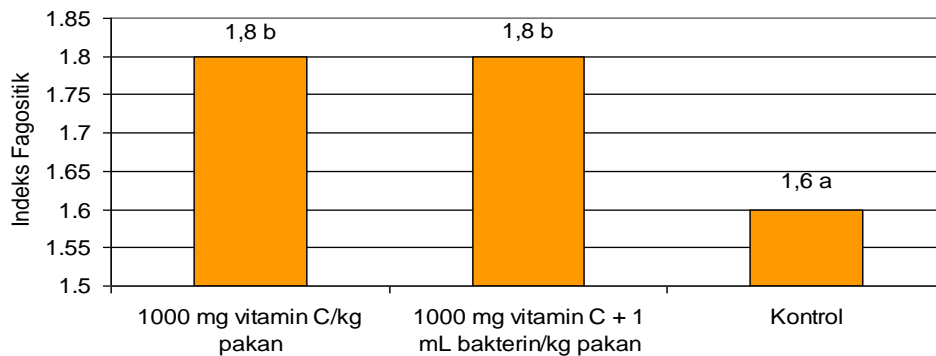
Hasil percobaan penggunaan vitamin C dan bakterin pada benih ikan kerapu lumpur, *Epinephelus coioides* terhadap keragaan aktivitas fagositik (PA)

disajikan pada Gambar 1, indeks fagositik (PI) disajikan pada Gambar 2, dan untuk nilai aktivitas lisosim (LA) pada Gambar 3.

Hasil yang diperoleh pada Gambar 1, 2, dan 3 terlihat bahwa pemberian kombinasi vitamin C dan bakterin dalam pakan memberikan nilai PA, PI dan LA yang lebih tinggi dari pemberian vitamin C saja. Hal ini menunjukkan bahwa kombinasi vitamin C dan bakterin dapat bekerja saling menunjang sebagai imunostimulator. Vitamin C (asam askorbat) merupakan salah satu bahan yang sering digunakan dalam pencegahan penyakit ikan, vitamin C dalam tubuh ikan berperan mengurangi stress dan mempercepat proses penyembuhan luka. Selain itu, vitamin C mempunyai kemampuan untuk mempercepat reaksi hidrosilasi antara lain formulasi kolagen yang sangat penting untuk pemeliharaan keseimbangan alami oleh kulit beserta jaringan lainnya. Dalam percobaan di laboratorium, vitamin C memperlihatkan keterlibatannya dalam proses pelepasan zat kebal oleh sel kebal. Pada hewan, vitamin C merupakan suatu kebutuhan yang harus ada untuk produksi interferon dan komplemen. Banyak zat yang penting dikeluarkan atas bantuan vitamin C dalam pertahanan tubuh dari pencegahan infeksi patogen (Lagler *et al.*, 1977; Halver, 1989). Selain itu, vitamin C diketahui juga mempunyai kemampuan untuk menstimulasi imunitas beberapa hewan, termasuk ikan dan fungsi biokimianya mempunyai pengaruh untuk meningkatkan daya tanggap kebal non-spesifik dan spesifik secara optimal (Verlhac *et al.*, 1998). Imunostimulan merupakan sekelompok senyawa biologi dan sintetis yang dapat meningkatkan tanggap kebal spesifik dan non-spesifik. Mekanisme kerja imunostimulan yaitu dengan cara meningkatkan aktivitas oksidatif netrofil (Anderson, 1996).



Gambar 1. Aktivitas fagositik (PA) leukosit benih ikan kerapu lumpur, *Epinephelus coioides* dengan perlakuan vitamin C dan bakterin 60 hari setelah perlakuan. Setiap nilai yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak beda nyata ($P>0,05$)



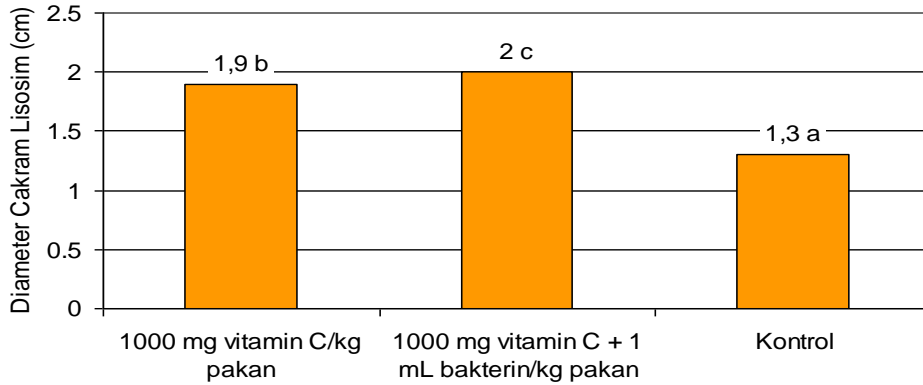
Gambar 2. Indeks fagositik (PI) leukosit benih ikan kerapu lumpur, *Epinephelus coioides* dengan perlakuan vitamin C dan bakterin 60 hari setelah perlakuan. Setiap nilai yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak beda nyata ($P>0,05$)

Nilai PA dan PI yang diperoleh dalam penelitian ini (Gambar 1 dan 2) memperlihatkan hasil bahwa dengan penambahan 1000 mg vitamin C kombinasi 1 ml bakterin dalam pakan memberikan nilai lebih tinggi dari perlakuan lainnya. Dari hasil yang diperoleh ini terlihat bahwa daya kerja vitamin C sebagai stimulator imunitas ikan dan meningkatkan fungsi biokimia untuk tanggap kebal non-spesifik dan spesifik akan semakin optimal dengan adanya kombinasi bakterin. Hal ini disebabkan pula karena fungsi bakterin adalah sebagai imunostimulan yang bekerja meningkatkan aktivitas sel - sel

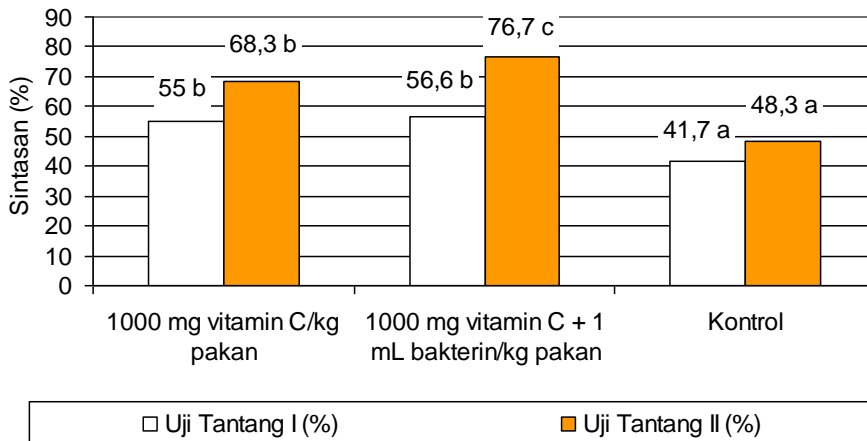
fagosit. Vitamin C dan bakterin hanya berperan pada peningkatan aktivitas fagositosis dan tidak bekerja dalam meningkatkan jumlah sel-sel fagosit itu sendiri. Hal ini diperkuat oleh laporan Johnny *et al.*, (2002) yang menyatakan bahwa vitamin C tidak berpengaruh terhadap peningkatan jumlah sel-sel fagosit seperti monosit, neutrofil dan limosit. Lebih lanjut Secombes (1996) menyatakan bahwa aktivitas fagositik adalah suatu kegiatan sel-sel fagosit untuk melakukan fagositosis dalam suatu sistem kekebalan non-spesifik, dengan melibatkan sel mononuklier (monosit dan makrofag), granulosit

(neutrofil), dan limfosit. Fagosit mempunyai kemampuan intrisik untuk mengikat mikroorganism secara langsung. Fagositosis yang efektif pada invasi kuman dini akan dapat mencegah timbulnya infeksi. Penambahan 1000 mg vitamin C kombinasi 1 ml bakterin dalam pakan juga memperlihatkan hasil diameter cakram aktivitas lisosim (LA) lebih tinggi dari kontrol, namun sama

dengan tanpa kombinasi dengan bakterin (Gambar 3). Nampaknya dalam percobaan ini, kombinasi bakterin sebagai imunostimulan tidak membantu peningkatan nilai LA secara optimal. Padahal Johnny *et al.*, (2005) melaporkan bahwa penyuntikan bakterin pada benih ikan kerapu Lumpur mampu meningkatkan nilai diameter cakram LA dan lebih meningkat lagi setelah dilakukan booster.



Gambar 3. Diameter cakram (cm) aktivitas lisosim (LA) plasma benih ikan kerapu lumpur dengan perlakuan vitamin C dan imunostimulan bakterin 60 hari setelah perlakuan. Setiap nilai yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak beda nyata ($P>0,05$)



Gambar 4. Sintasan (%) benih ikan kerapu lumpur, *Epinephelus coioides* dengan perlakuan vitamin C dan imunostimulan bakterin setelah uji tantang pada hari ke 30 dan 60 perlakuan dengan virus irido selama 10 hari pengamatan. Setiap nilai yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak beda nyata ($P>0,05$).

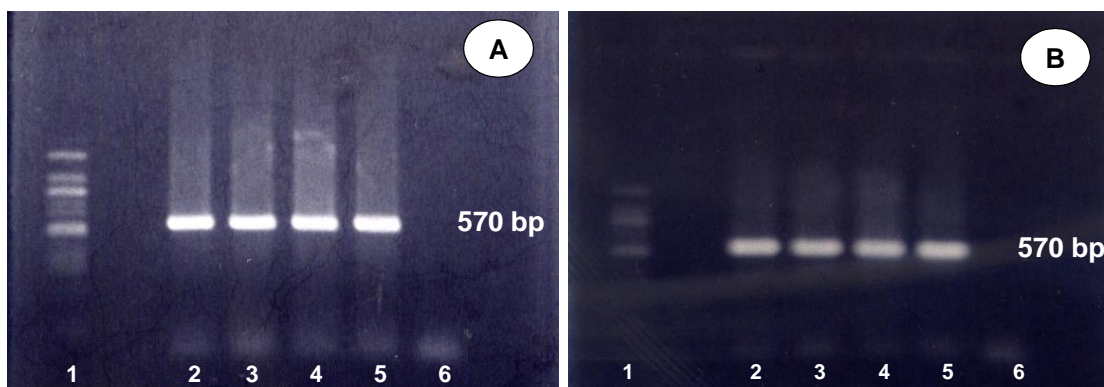
Dalam hal ini mungkin kombinasi vitamin C dengan bakterin tidak bekerja optimal dalam meningkatkan nilai LA. Lebih lanjut Ellis (1993) menjelaskan bahwa lisosim adalah enzim hidrolitik yang ada di dalam lendir, serum dan sel-sel fagositik dari pelbagai spesies ikan. Kemungkinan zat ini memberikan daya kekebalan yang penting terhadap patogen mikrobik. Neutrofil dan monosit dari ikan-ikan mengandung lisosim dalam sitoplasmanya dan lisosim serum mungkin berasal dari leukosit-leukosit tersebut.

Hasil sintasan (Gambar 4) benih ikan kerapu lumpur dengan penggunaan vitamin C dan bakterin ujiantang I setelah 30 hari perlakuan dengan penyuntikan virus irido dan dipelihara selama 15 hari memberikan sintasan lebih tinggi, namun tidak berbeda nyata dengan perlakuan vitamin C ($P > 0,05$), tetapi berbeda nyata dengan kontrol ($P < 0,05$). Sintasan yang diperoleh pada ujiantang II setelah 60 hari perlakuan tertinggi pada kombinasi vitamin C dengan bakterin, analisis sidik ragam menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$).

Penambahan vitamin C dan bakterin pada pakan efektif untuk meningkatkan respon imun non-spesifik benih ikan

kerapu lumpur terhadap infeksi virus irido. Pada hari ke-5 setelah penyuntikan virus irido, terlihat nafsu makan ikan uji menurun, pada hari ke-6 terlihat ikan mulai diam di dasar bak, berenang tidak normal. Pada hari ke-6 mulai terjadi kematian, terutama pada kontrol, dan pada hari ke-7 dan 8 kematian semakin tinggi pada semua perlakuan, dan puncak kematian terjadi setelah hari ke-10. Itami *et al.* (1996) melaporkan bahwa pemberian peptidoglikan dalam pakan selama 21 hari pada ikan ekor kuning, *Seriola quinqueradiata* meningkatkan tanggap kebal non-spesifik dan setelah ujiantang memberikan sintasan yang lebih tinggi. Selanjutnya di BBRPBL Gondol, percobaan penggunaan imunostimulan pada ikan kerapu bebek telah dilakukan, diantaranya penggunaan imunostimulan peptidoglikan dalam pakan segar ikan lemuru yang dicacah halus dan ditambahkan vitamin campuran memberikan sintasan lebih tinggi (Zafran *et al.*, 1998).

Terhadap benih ikan kerapu lumpur yang mengalami kematian selama ujiantang dilakukan deteksi virus irido dengan metoda PCR. Organ yang diambil untuk pemeriksaan PCR adalah organ limpa.



Gambar 5. Hasil deteksi virus irido dengan metoda PCR setelah ujiantang I (A) dan ujiantang II (B) dengan virus irido pada benih ikan kerapu lumpur, *Epinephelus coioides* yang ditingkatkan respon imun spesifiknya dengan menggunakan vitamin C dan imunostimulan bakterin (1 = marker; 2 = 1000 mg vitamin C/kg pakan (A); 3 = 1000 mg vitamin C + 1 ml bakterin/kg pakan (B); 4 = control (C); 5 = positif kontrol; 6 = negatif kontrol).

Dari deteksi virus irido dengan PCR tersebut, semua perlakuan menunjukkan positif virus irido (Gambar 5).

Hal ini menunjukkan bahwa ikan yang dilakukan ujiantang dengan penyuntikan virus irido, pada kontrol menimbulkan kematian yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan vitamin C dan imunostimulan bakterin. Virus irido menginfeksi semua ikan uji pada ujiantang, namun vitamin C dan imunostimulan bakterin mampu meningkatkan ketahanan dan kekebalan ikan terhadap infeksi virus irido tersebut.

Kesimpulan

Penambahan vitamin C dan bakterin dalam pakan dapat meningkatkan imunitas benih ikan kerapu lumpur terhadap infeksi virus irido. Kombinasi vitamin C dengan bakterin dapat sebagai imunostimulan yang meningkatkan respon imun non-spesifik seperti aktivitas fagositik dan lisosim.

Ucapan Terima kasih

Terima kasih diucapkan kepada Saudara Putu Suarjana dan Slamet Haryanto selaku Teknisi Laboratorium Patologi yang telah banyak membantu penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Anderson, D.P. 1996. Environmental factors in fish health: immunological aspects. In *The fish immune system: organism, pathogen and environment*. G. Iwama and T. Nakanishi (eds.), p. 289-310. Academic Press. USA.
- Arimoto, M., K. Mori, T. Nakai, K. Muroga and I. Furusawa. 1993. Pathogenicity of the causative agent of viral nervous necrosis disease in striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch and Schneider). *Journal of Fish Disease*. 16:461 – 469.
- Chou, H. Y., C. C. Hsu and T. Y. Peng. 1998. Isolation characterization of a pathogenic iridovirus from cultured grouper (*Epinephelus* sp.) in Taiwan. *Journal of Fish Pathology*, 33, 201-206.
- Danayadol, Y., S. Direkbusarakom, S. Boonyaratpalin, T. Miyazaki and M. Miyata. 1997. Iridovirus infection in brown-spotted grouper (*Epinephelus malabaricus*) cultured in Thailand. In T. W. Flegel and I. H. MacRae (eds), *Diseases in Asian Aquaculture III*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila. 67-72.
- Ellis, A.E. 1993. Lysozyme assays. P. 101-103. In *Stolen et al. (Eds.)*. *Techniques in fish immunology-1*. Sos Publications, Fair Haven, NJ 07760. USA.
- Halver, J.E. 1989. The vitamin (In Halver, J.E. (Eds) *Fish nutrition*; Second Edition. Academic Press, Inc. San Diego, California. P.32-101.
- Itami, T., M. Kando, M. Uozu, A. Sukanuma, T. Abe, A. Nakagawa, N. Suzuki and Y. Takahashi. 1996. Enhancement of resistance against *Enterococcus seriolicida* infection in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* (Temminck & Schlegel), by oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Journal of Fish Disease*. 19:185-187.
- Johnny, F., Koesharyani, I., Roza, D., Tridjoko, Giri, N.A. dan Suwiryana, K. 2001. Respon ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* terhadap imunostimulan peptidoglycan melalui pakan pelet. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. Vol. VII. No. 4, p. 52-56.

- Johnny, F., Zafran, D. Roza dan I. N. A. Giri. 2002. Pengaruh vitamin C dalam pakan terhadap perubahan hemositologi ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis*. Jurnal Aquaculture Indonesia. 3(1):27-34.
- Johnny, F. dan D. Roza. 2004. Pengaruh penyuntikan imunostimulan peptidoglikan terhadap peningkatan tanggap kebal non-spesifik ikan kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus*. Jurnal Aquaculture Indonesia. 5(2): 109-115.
- Johnny, F., D. Roza, K. Mahardika, Zafran dan A. Prijono. 2005. Penggunaan imunostimulan untuk meningkatkan kekebalan non-spesifik benih ikan kerapu lumpur, *Epinephelus coioides* terhadap infeksi virus irido. Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia. Vol. 11(5):75-84.
- Klontz, G.W. 1997. Fish Hematology. In : Techniques in fish immunology-3 (2nd ed). Stolen, J.S., T.C. Fletcher, A.F. Rowley, J.T. Zelikoff, S.L. Kaattari, S.A. Smith. (Eds.). SOS Publications, Fair Haven, NJ 07704-3303. USA. p.121-131
- Kurita, J., K. Nakajima, I. Hirono and T. Aoki. 1998. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA of red sea bream iridovirus (RSIV). Journal of Fish Pathology, 33, 17-23.
- Lagler, K.F., J.E. Bardach, R.R. Miller and D.R.M. Passino. 1977. Ichthyology. John Willey and Sons. Inc. New York-London. 506 pp.
- Mahardika, K., Zafran, D, Roza dan F. Johnny. 2004. Uji kerentanan ikan kerapu Lumpur, *Epinephelus coioides* dan kerapu batik, *Epinephelus microdon* terhadap infeksi iridovirus. Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia. Vol. 10 (2) : 83-88.
- Rowley, A.F. 1993. Collection, separation and identification of fish leukocytes. P. 113-136. In Stolen et al. (Eds.). Techniques in Fish Immunology-1. Sos Publications, Fair Haven, NJ 07760. USA.
- Santarem, M., B. Novoa and A. Figueras. 1997. Effect of β -Glucan on the non-specific immune responses of turbot (*Schophthalmus maximus* L.). Journal of Fish and shellfish Immunology, 7:429-437.
- Secombes, C.J. 1996. The nonspecific immune system; cellular defences. In : The fish immune system: organism, pathogen and environment. G. Iwama and T. Nakanishi (Eds.). Academic Press. San Diego, California. p. 63-95
- Siwicki, A.K. and Anderson, D.P. 1993. Immunostimulation in fish : Measures the effects of stimulants by serological and immunological methods, International Workshop and Training Course in Poland. 15 p.
- Vadstein, O. 1997. The use of immunostimulatin in marine larviculture: possibilities and challenges. Journal of Aquaculture, 155:401-417.
- Verlhac, V., Alex Obach., Jacques Gabaudan., Willy Schuep., Reid Hole. 1998. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Aquaculture 8 : 409-424
- Zafran, I. Koesharyani, D. Roza, F. Johnny dan K. Yuasa. 1998. Peningkatan sintasan ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) dengan penambahan vitamin dan imunostimulan ke dalam pakan segar. Sudrajat, A., E.S. Heruwati, K. Sugama, A. Purnomo, Z.I. Azwar, I.N.A. Giri. (Eds.) Seminar Teknologi Perikanan Pantai. Denpasar 6-7 Agustus 1998. 164-168.