

PEMBERIAN TOTAL FENOL TERIPANG PASIR (*Holothuria scabra*) UNTUK MENINGKATKAN LEUKOSIT DAN DIFERENSIAL LEUKOSIT IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) YANG DIINFEKSI BAKTERI *Aeromonas Hydrophila*

Achmad Suhermanto¹, Sri Andayani², Maftuch³

¹Post graduated student of Brawijaya University

²Faculty of Fisheries and Marine University of Brawijaya Science

ABSTRACT

Freshwater fishery commodities are most likely to be increased production of carp (*Cyprinus carpio*). Intensification of cultivation which raises new problems with fish disease outbreaks caused by *Aeromonas hydrophila*. Providing of immunostimulatory bioactive compounds of sea cucumbers (*Holothuria scabra*) can enhance non-specific immune responses in the goldfish as a mechanism of defense against disease. The purpose of this study is to determine the role and optimal dose of total phenols sea cucumber in enhancing non-specific immune response seen from the hematology parameters. Extraction of bioactive components from sea cucumber prepared by using methanol and fractionated with ethyl acetate solvent (v/v). Identification of total phenols in ethyl acetate fraction performed using UV-Vis spectrophotometer and infrared. Total phenol produced was tested on carp with intraperitoneal injection, the concentration of 0.09, 0.18 and 0.27 mg phenol/kg fish. Challenge test was done by using the *Aeromonas hydrophila* (10^7 cells/ml) through the immersion method. The observations included hematological parameters and total plasma proteins. The observations of hematological parameters that Leukocytes, Neutrophils pre-and post-infection were significantly increased. Lymphocyte pre infection was increased significantly and post-bacterial infection was decreased significantly. Eosinophils, Monocytes pre-and post-bacterial infection were not differ significantly between treatment. The use of phenolic compounds at 0.09 mg / kg can be increase of non-specific immune response in carp (*Cyprinus carpio*).

Key Words : Total phenol, *Aeromonas hydrophila*, *Cyprinus carpio*, nonspecific immune response

PENDAHULUAN

Sistem budidaya perikanan air tawar yang hingga kini telah mencapai tahap intensifikasi tidak terlepas dari resiko biologis, yaitu munculnya penyakit (Khairuman, 2008). Penyakit MAS (*Motile Aeromonas Septicemia*) merupakan penyakit bakterial terpenting pada budidaya ikan air tawar. Serangan infeksi dapat menyebabkan kematian ikan sampai 80 % (Yin *et al.*, 2010; Kamiso, 2003).

Penggunaan obat-obatan memberikan dampak negatif dengan meningkatnya pencemaran lingkungan (Rairakhwada 2007), akumulasi residu antibiotik mempengaruhi pertumbuhan dan resistensi terhadap obat-obatan serta immunosupresi (Maqsood *et al.*, 2009). Dampak negatif tersebut dapat dicegah dengan cara meningkatkan kekebalan tubuh ikan terhadap penyakit (Selvaraj *et al.*, 2006).

Makhluk hidup telah dilengkapi dengan dua sistem kekebalan tubuh yaitu kekebalan non-spesifik/alamiah (*innate immune system*) dan spesifik/didapat (*adaptive immune system*). Pada ikan, respon imun baru terbentuk secara sempurna disaat ikan telah dewasa. Ikan-ikan muda tidak mempunyai respon imun spesifik yang sempurna (Ellis, 1988) dan bergantung pada respon selular non-spesifik untuk bertahan dari serangan infeksi mikroba. Pertahanan non-spesifik merupakan pertahanan utama pada ikan stadia benih dan ikan *fingerling*.

Alternatif penanggulangan agar ikan tidak terinfeksi bakteri yaitu dengan pemberian imunostimulan. Imunostimulan merupakan zat kimia, obat-obatan, stresor, atau aksi untuk meningkatkan respon imun ikan yang berinteraksi secara langsung dengan sel sistem imun (Sakai, 1999).

Teripang jenis *Holothuria sp.* dapat digunakan sebagai imunostimulan karena mengandung komponen senyawa yang berperan dalam penanggulangan penyakit ikan. Senyawa di dalam teripang antara lain lektin, sterol, saponin/triperten glikosid (Stonik, 1986; Tian *et al.*, 2007), mineral, polifenol, flavonoid (Mamelona *et al.*, 2007), total phenol (Althunibat *et al.*, 2009; Himaya *et al.*, 2010).

Penelitian terhadap bioaktif teripang telah dilakukan antara lain senyawa fenol sebagai antioxidant, anti inflamasi dan antiproliferasi (Althunibat 2009), antioxidant dan anti melanogenesis (Jingfeng *et al.*, 2010), aktifitas antibakteri (Haug *et al.*, 2002), antikoagulan dan antitrombotik, menurunkan kadar kolesterol dan lemak darah, anti kanker dan anti tumor, antibakteri, anti jamur, anti virus, anti malaria dan anti rematik (Farouk *et al.*, 2007). Namun belum pernah dilakukan penelitian terhadap pemanfaatan senyawa bioaktif tersebut sebagai immunostimulan pada ikan mas.

Tujuan dari penelitian ini adalah

1. Mengetahui peranan pemberian total fenol teripang pasir (*Holothuria scabra*) terhadap jumlah leukosit dan diferensial leukosit ikan mas pra dan pasca infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*;
2. Mengetahui konsentrasi total fenol teripang pasir (*Holothuria scabra*) paling optimal yang dapat meningkatkan respon imun non spesifik pada ikan mas post infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*

METODE PENELITIAN

Hewan coba

Ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang digunakan berukuran 12-15 cm sebanyak 10 ekor/bak diperoleh dari Balai Benih Ikan Kota Batu. Teripang berasal dari perairan di Kec. Socah, Kab. Bangkalan. Ikan diberi perlakuan dengan pemberian komponen bioaktif total fenol teripang pasir melalui penyuntikan dengan dosis 0;

0,09; 0,18; and 0,27 mg / kg. Bakteri *Aeromonas hydrophila* diperoleh dari Lab. Mikrobiologi Fakultas Kedokteran. Bakteri ini digunakan untuk ujiantang dengan kepadatan 1×10^7 sel/ml.

Ekstraksi dan karakterisasi total fenol teripang

Ekstraksi total fenol teripang dilakukan menggunakan metode modifikasi dari Himaya *et al.*, (2010). Hasil ekstraksi kemudian diukur konsentrasinya pada panjang gelombang 760 nm dengan menggunakan reagen Folin-dennis dan konsentrasinya diukur berdasarkan kurva standar asam galat. Karakterisasi total fenol teripang dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan Infrared.

Hematologi

Pengambilan darah dilakukan pra dan 24 jam post infeksi bakteri. Nilai hematokrit, jumlah eritrosit, leukosit dan diferensial leukosit ikan mas berdasarkan Bijanti (2005). Perhitungan jumlah leukosit menurut Svobodova (1991), Perhitungan diferensial leukosit berdasarkan Stoskopf (1993)

Analisis data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan Analysis of Variance (ANOVA) dengan Minitab 14 for windows.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Leukosit

Perubahan jumlah total leukosit dapat dijadikan indikator adanya infeksi tertentu pada ikan. Aktifitas pagositik yang dilakukan oleh sel-sel leukosit akan meningkat pada awal infeksi dan mengalami penurunan pada infeksi kronis (Anderson dan Siwicki, 1993). Hasil pengamatan total leukosit ikan mas pra dan post infeksi disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Total Leukosit Ikan Mas Pra dan

Post Infeksi		
Perlakuan	Pra Infeksi ± SD (10 ⁴ /mm ³)	Post Infeksi ±SD (10 ⁴ /mm ³)
Kontrol	(K+) 2,78 ± 0.16	(K-) 3,51 ± 0.59
A	4,56±0.45	6,08 ± 0.34
B	3,74 ± 0,53	4,95± 0,31
C	3,22 ± 0.01	4,41 ± 0.36

Keterangan : Dosis K = 0; A = 0,09; B = 0,18 dan 0,27 (dalam satuan mg fenol/kg ikan)

Hasil analisis data menggunakan analisis keragaman satu arah (*one way anova*) didapatkan bahwa jumlah sel leukosit pra infeksi bakteri berbeda nyata antar perlakuan dalam taraf 5%, $F_{hit} : 14,66$ dan nilai $P(F) 0,001 < 0,05$; sel leukosit post infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* berbeda nyata antar perlakuan dalam taraf 5%, $F_{hit} : 47,76$ dan nilai $P(F) 0,000 < 0,05$.

Leukosit merupakan komponen penting, mempunyai peran dalam sistem kekebalan tubuh ikan. Peningkatan jumlah sel darah putih ini merupakan respon dalam bentuk proteksi terhadap adanya sel asing termasuk adanya infeksi bakteri yang masuk ke tubuh ikan. Hasil produksi leukosit akan diarahkan menuju daerah terinfeksi sebagai pertahanan ikan. Naiknya jumlah leukosit merupakan indikator adanya infeksi yang mengakibatkan terjadinya inflamasi

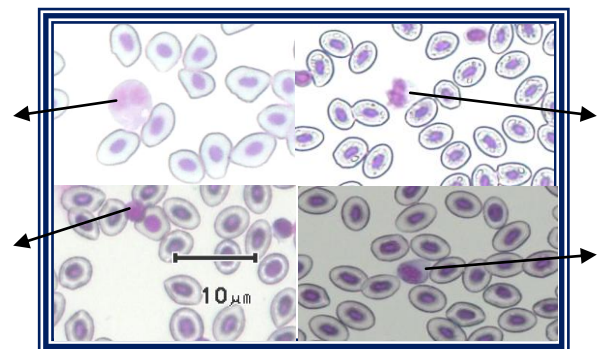
Penelitian Harikrishnan *et al.*, (2010) terjadi peningkatan jumlah leukosit ikan mas pada minggu pertama dan kedua post infeksi. Harikrishnan *et al.*, (2003) menyatakan terjadi peningkatan jumlah leukosit ikan mas yang ditretmen ekstrak herbal kemudian diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*, demikian pula penelitian Selvaraj *et al.*, (2005) dengan perlakuan pemberian yeast glucan melalui injeksi mampu meningkatkan total leukosit (10³/mm³) dari kontrol $24 \pm 0,816$ menjadi $48,44 \pm 0,471$.

Kemampuan leukosit untuk membunuh mikroba patogen merupakan salah satu mekanisme perlindungan paling penting dalam tubuh ikan dengan

menghasilkan spesies oksigen reaktif (ROS) dan nitrogen yang dianggap beracun untuk bakteri patogen pada ikan, mampu menghancurkan serangan patogen dan dianggap indikator penting dari pertahanan non-spesifik pada ikan (Alexander *et al.*, 2010). Sel darah putih mampu memproteksi adanya infeksi yang dihasilkan oleh mikroba maupun faktor kimia lain. Pengamatan leukosit dapat menjelaskan secara umum sistem imun dan status kesehatan ikan (Harikrishnan *et al.*, 2010).

Diferensial Leukosit

Pengamatan diferensial leukosit bertujuan mengetahui perbedaan prosentase komponen sel leukosit. Leukosit ikan terbagi menjadi 2 bagian besar yaitu granulosit dan agranulosit. Diferensial leukosit yang diamati meliputi jenis sel neutrofil, limfosit, monosit, dan eosinofil. Diferensial leukosit dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Diferensial Leukosit (A = Neutrofil; B= Monosit; C = Eosinofil; D = Limfosit)

Sel Neutrofil

Neutrofil merupakan sel pagosit sistem polymorphonuklear yaitu sel yang bekerja cepat dalam melakukan fagosit tetapi tidak mampu bertahan lama. Sel ini berupa sel bundar dengan sitoplasma bergranula halus dan ditengahnya terdapat nukleus bersegmen (Tizard, 1982). Hasil pengamatan sel neutrofil ikan mas pra dan post infeksi disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Sel Neutrofil Ikan Mas Pra dan Post Infeksi

Perlakuan	Pra Infeksi ± SD (%)	Post Infeksi ±SD (%)
Kontrol	(K+)19,66 ± 1	(K-)27,27± 0,25
A	28,77± 1,5	35,55± 1,34
B	27,44± 1,64	32,66 ± 1
C	25,44± 1,07	30,88± 1,57

Hasil analisis data didapatkan bahwa sel neutrofil pra infeksi bakteri berbeda nyata antar perlakuan dalam taraf 5%, $F_{hit} : 27,13$ dan nilai $P(F) 0,000 < 0,05$, sel neutrofil post infeksi bakteri berbeda nyata antar perlakuan dalam taraf 5% dimana $F_{hit} : 26,86$ dan nilai $P(F) 0,000 < 0,05$. Sel ini merupakan fagosit kuat, fagositosis dilakukan dengan cara mendekati partikel asing, mengeluarkan pseudopodi kesegala arah sekitar partikel (rangsangan kimiawi eksternal), satu neutrofil dapat memfagosit 5 – 20 bakteri sebelum kemudian tidak aktif (Tizard, 1982).

Fungsi utama neutrofil adalah penghancuran bahan asing melalui proses fagositik yaitu kemotaksis dengan jalan sel bermigrasi menuju partikel atau perlekatan partikel pada sel, penelanan partikel oleh sel dan penghancuran partikel oleh enzim lisosom didalam fagolisosom.

Didalam sitoplasma neutrofil terdapat granula pertama yaitu lisosom, merupakan struktur padat elektron dan enzim seperti enzim fosfatase, alkali, liozozim dan aminopeptidase (Tizard, 1982; Abbas *et al.*, 2010). Neutrofil dalam darah akan meningkat jika terjadi infeksi dan berperan sebagai pertahanan pertama dalam tubuh (Harikrishnan *et al.*, 2010).

Sel Eosinofil

Eosinofil secara normal berada dalam berbagai jaringan pada ikan. Sel ini mempunyai inti yang terletak memanjang di tepi sel, memiliki granula besar dan sitoplasma berwarna merah. Hasil pengamatan sel eosinofil ikan pra dan post infeksi disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Sel Eosinofil Ikan Mas Pra dan Post Infeksi

Perlakuan	Pra Infeksi ± SD (%)	Post Infeksi ±SD (%)
Kontrol	(K+) 2,11± 0,19	(K-) 2,09± 0,46
A	3,22± 0,77	2,81± 0,25
B	2,55± 1,50	2,47± 0,47
C	3,66± 0,67	3,15± 0,15

Hasil analisis data didapatkan bahwa sel eosinofil pra infeksi tidak berbeda nyata antar perlakuan dalam taraf 5%, $F_{hit} : 1,72$ dan nilai $P(F) 0,241 > 0,05$; sel eosinofil post infeksi bakteri tidak berbeda nyata antar perlakuan dalam taraf 5%, $F_{hit} : 2,12$ dan nilai $P(F) 0,176 > 0,05$. Eosinofil merupakan sel utama kedua dari sistem meiloid, sel ini tidak seefisien neutrofil dalam fagositosis, tetapi memiliki lisosom dan mengadakan letupan pernafasan bila terangsang dengan tepat (Tizard, 1982). Eosinofil pada ikan diperlukan untuk kekebalan dalam melawan infeksi parasit. Eosinofil melekat pada parasit untuk menetralkan hasil produk sekresi parasit dan membunuhnya. Serta untuk menarik leukosit menuju area yang terinfeksi parasit tersebut (Ardelli dan Woo, 2006).

Eosinofil termasuk dalam fagosit lemah, berfungsi sebagai detoksikasi protein sebelum dapat menyebabkan kerusakan dalam tubuh. Sel ini masuk kedalam darah dalam jumlah besar bisa ada benda asing masuk (Bijanti, 2005).

Sel Limfosit

Limfosit memiliki diameter berkisar antara 8-12 µm. Sitoplasma berwarna biru pucat, inti berbentuk bulat hingga oval, lebih sering berbentuk tidak beraturan, serta berisi vakuola kecil dan granula azurofilik (Abbas *et al.*, 2010). Hasil pengamatan sel limfosit ikan mas pra dan post infeksi disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Sel Limfosit Ikan Mas Pra dan Post Infeksi

Perlakuan	Pra Infeksi ± SD (%)	Post Infeksi ±SD (%)
-----------	-------------------------	-------------------------

Kontrol	(K+)	63,11 ± 2,22	(K-) 54,44 ± 1,84
A		51,22 ± 1,26	42,44 ± 1,65
B		54,16 ± 1,92	48,88 ± 2,04
C		54,33 ± 0,58	30,88 ± 1,57

Hasil analisis data didapatkan bahwa sel limfosit pra infeksi bakteri berbeda nyata antar perlakuan dalam taraf 5%, $F_{hit} : 30,06$ dan nilai $P(F) 0,000 < 0,05$; sel limfosit post infeksi bakteri berbeda nyata antar perlakuan dalam taraf 5%, $F_{hit} : 20,61$ dan nilai $P(F) 0,000 < 0,05$.

Svobodová & Vykusová (1991) menjelaskan bahwa limfosit pada ikan mas berkisar antara 76 - 97,5%. Bullock *et al.*, (1990) mengatakan jumlah sel limfosit normal pada ikan mas adalah 89% sedangkan jumlah limfosit yang terinfeksi dengan *hemorrhagic septicemia* adalah 58%. Bijanti (2005) menjelaskan penurunan sel limfosit dipengaruhi adanya antigen asing sehingga zat kebal terganggu oleh masuknya infeksi yang menyebabkan jumlah limfosit menurun. Kono *et al.*, (2002) sel limfosit yang teraktivasi oleh imunostimulan dapat meningkatkan aktivitas mitogenik yang diinduksi oleh concanavalin A atau lipopolisakarida dan menghasilkan *macrophage activating factors*. Tizard (1982) menyatakan penurunan limfosit disebabkan di darah perifer ditarik dari sirkulasi kedalam jaringan yang mengalami peradangan, adanya stres berkepanjangan akan meningkatkan kadar kortisol dalam darah sehingga menyebabkan hilangnya limfosit dalam sirkulasi darah dan organ limfoid.

Sel Monosit

Monosit terdiri dari sitoplasma berwarna biru keabu-abuan hingga biru, bentuk inti bervariasi mulai bulat hingga oval. Hasil pengamatan sel limfosit ikan mas pra dan post infeksi disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Sel Monosit Ikan Mas Pra dan Post Infeksi

Perlakuan	Pra Infeksi ± SD (%)	Post Infeksi ±SD (%)
Kontrol	(K+) 15,10 ± 0,69	(K-) 15,77 ± 1,26
A	16,88 ± 0,69	19,22 ± 1,50
B	15,88 ± 0,39	17,55 ± 1,54
C	16,55 ± 1,02	17,11 ± 0,69

Hasil analisis data didapatkan bahwa sel monosit pra infeksi bakteri tidak berbeda nyata antar perlakuan dalam taraf 5%, $F_{hit} : 3,45$ dan nilai $P(F) 0,072 > 0,05$; sel monosit post infeksi bakteri tidak berbeda nyata antar perlakuan dalam taraf 5%, $F_{hit} : 3,61$ dan nilai $P(F) 0,065 > 0,05$.

Selvaraj *et al.*, (2005) mengatakan pemberian yeast glucan dapat meningkatkan monosit ikan mas saat diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. Peningkatan prosentase monosit selama proses infeksi disebabkan dalam tubuh ikan, mendorong monosit untuk menghancurkan benda asing yang masuk yaitu bakteri. Monosit merupakan sel dalam aliran darah dan berkembang menjadi makrofag. Ketika mengalami aktivasi, makrofag memiliki kapasitas fagosit lebih kuat daripada neutrofil meskipun granulosit mempunyai jumlah lebih besar (Irianto, 2005). Maftuch (2007) mengatakan bahwa pada proses inflamasi saat terjadi kerusakan jaringan oleh infeksi maupun reaksi antigen-antibodi, akan meningkatkan produksi monosit menjadi dua kali lebih banyak. Peredaran monosit dalam darah menjadi lebih singkat, pematangan monosit menjadi makrofag lebih cepat dan segera menuju ke jaringan yang rusak.

KESIMPULAN

1. Pemberian senyawa total fenol dari teripang dapat meningkatkan jumlah leukosit dan diferensial leukosit ikan mas yaitu Monosit dan Neutrofil
2. Konsentrasi senyawa total fenol teripang dosis optimal pada pemberian 0,09 mg/kg.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., A.H. Lichman dan S. Pillai. 2010. Cellular and Molecular Immunology. six Edition. W.B. Saunders Company. Philadelphia.
- Alexander, C. P., C.J.W. Kirubakaran, R.D. Michael, 2010. Water Soluble fraction of *Tinospora cordifolia* leaves enhanced the non spesific immune mechanism and disease resistance in *Oreochromis mossambicus*. Fish & shellfish immunology xxx. P. 1-8
- Althunibat, O.Y., Hashim R.B., Taher M., Daud, J.M., Ikeda, M.A., Zali, B.I., 2009. *In Vitro* Antioxidant and Antiproliferative Activities of Three Malaysian Sea Cucumber Species. European Journal of Scientific Research. ISSN 1450-216X Vol.37 No.3, P:376-387.
- Ardelli BF, Woo PTK. 2006. Immunocompetent Cells and Their Mediators in Fin Fish. Di dalam: Woo PTK, Bruno DW, editor. Fish Disease and Disorders. Vol 3. Ed ke-2. UK: CABI Publishing. P: 702-724.
- Bijanti, R., 2005. Hematologi Ikan Teknik Pengambilan Darah dan Pemeriksaan Hematologi Ikan. Bagian Ilmu Kedokteran Dasar Veteriner. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Ellis, A.E., 1998. *Fish Vaccination*. Academia Press. London. 155 pp.
- Farouk, A.E., Ghouse, F.A.H., Ridzwan, B.H., 2007. New Bacterial Species Isolated from Malaysian Sea Cucumbers with Optimized Secreted Antibacterial Activity. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 3 (2): P: 60-65.
- Haug, T., A.K. Kjuul, OB. Styrvold, E. Sandsdalen, OM Olsen, and K. Stensvag, 2002. Antibacterial activity in *Strongilocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuridea) and *Asterias rubens* (Asteroidea). Journal of Invertebrate Pathology. P: 94 -102
- Harikrishnan, R., M. N. Rani, and C. Balasundaram, 2003. Haematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophilla* infection. *Aquaculture*, 221. P : 41-50.
- Harikrishnan, R., C. Balasundaram, M. C. Kim, J. S. Kim, Y. J. Han, M.S. Heo, 2009. Innate Immune Response and Disease Resistance In *Carassius auratus* By Triherbal Solvent Extract. *Fish & Shellfish Immunology* 27. P: 508-515.
- Harikrishnan, R., C. Balasundaram, M.S. Heo, 2010. Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* 28. P: 354-361.
- Himaya, SWA, B.M Ryu, Z.J Qian, S. K. Kim, 2010. Sea cucumber, *Stichopus japonicus* ethyl acetate fraction modulates the lipopolysaccharide induced iNOS and COX-2 via MAPK signaling pathway in murine macrophages. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, P: 68 – 75.
- Irianto, A., 2005. Patologi ikan Teleostei. Penerbit Gajah Mada University press. Yogyakarta.
- Jingfeng, W., Yuming W., Qingjuan T., Yi W., Yaoguang C., Qin Z., and Changhu X., 2010. Antioxidant activities of low molecular weight gelatin hydrolysate

- isolated from Sea cucumber *Stichopus japonicus*. J. Ocean Univ. China, P: 94 – 98.
- Kamiso, H.N., 2003. Status Penyakit Ikan dan Pengendaliannya di Indonesia. Disampaikan pada Seminar Nasional Penyakit Ikan dan Udang IV yang dilaksanakan di Purwokerto pada tanggal 18-19 Mei 2003.
- Khairuman, Sudenda, D., dan Gunadi, B. 2008. Budi daya ikan mas secara intensif. Agromedia Pustaka.
- Kono, Tomoya, Aranya Ponpornpisit, Masahiro Sakai. 2003. The analysis of expressed genes in head kidney of common carp (*Cyprinus carpio* L.) Stimulated with peptidoglycan. Aquaculture Vol. 25. P: 37-52.
- Maftuch, 2007. Paparan *Vibrio Alginolyticus* Terhadap Histopatologi Usus Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) dan Peningkatan Jumlah Serta Aktivitas Sel Makrofag. Jurnal Penelitian Perikanan Vol. 10 no.1. Faperik Unibraw. Hal. 66-70.
- Mamelona, J., P. Emilien, G.L. Karl, L. Jean, K. Salwa, K. Selim, 2007. Quantification of phenolic contents and antioxidant capacity of. Atlantic sea cucumber *Cucumaria frondosa*, Food Chem., 104, 1040.
- 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.
- 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.
- Sakai, M., 1999. Current Research Status of Fis Immunostimulants Aquaculture 172 ; 63-92.
- Sahoo, P.K., J. Kumari and B. K. Mishra. 2005. Non-specific immune responses in juveniles of Indian major carps. J. Appl. Ichthyol. 21 p.151–155.
- Selvaraj, V., K. Sampath, V. Sekar, 2009. Administration of lipopolysaccharide increases specific and non-specific immune parameters and survival in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture 286. p : 176–183.
- 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.
- Selvaraj, V., K. Sampath, V. Sekar, 2005. Administration of yeast glucan enhances survival and some specific and non-specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. Fish & shellfish immunology 19. p : 293 - 306
- Shao, Z.J., liu, J and L.X. Xiang. 2004. *Aeromonas hydrophila* Induces Apoptosis In *Carassius Auratus* Lymphocytes In Vitro. J. Aquaculture, 229. P. 11-23.
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P. and Rumsey, G.L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protectio against furunculosis. Veterinary Immunology and

- Immunopathology*, **41** : 125-139. P125, 132-133.
- Stoskopf, M.K. 1993. Fish Medicine. WB Saunders Company Harcourt Brace Jovanivich Inc. North Carolina. 882 p
- Svobodova, Z. and Vykusova, 1991. Diagnostic, Prevention and Therapy of Fish Disease and Intoxycation. Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology. Vodnany, Czechoslovakia . (online) . <http://www.fao.org>.
- Swann LaDon dan White M. Randy, 1989. Diagnosis and Treatment of *Aeromonas hydrophila* Infection of Fish. P. 461-462.
- Tian, F., Zhu C., Zhang X-w., Xie X., Xin X-l., 2007. Philiopside E, a New Sulphated Saponin from Sea Cucumber, Blocks the Interaction between Kinase Insert Domain_Containing Receptor (KDR) and $\alpha\beta$ Integrin Via Binding to the Extracellular Domain of KDR (Abstrac). *Molecular Pharmacology* 72:545-552
- Tizard, I.R., 1982. An Introduction of Veterinary Immunology. W. B. Saunders Company. p.254-257.
- Yin, G., Ardo L., Thompson, K. D., Adams A., Jeney Z., Jeney G., 2010. Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carps, *Cyprinus carpio* and protection againts *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*. p: 140 - 145