

PENGARUH VITAMIN B₆ DALAM PAKAN TERHADAP SISTEM KEKEBALAN BENIH IKAN KERAPU BEBEK, *Cromileptes altivelis*

Fris Johnny, Nyoman Adiasmara Giri, Ketut Suwirya, dan Des Roza

ABSTRAK

Percobaan pemberian vitamin B₆ dalam pakan ikan telah dilakukan di laboratorium patologi Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol-Bali. Tujuan percobaan ini adalah untuk mengetahui pengaruh vitamin B₆ dengan dosis yang berbeda dalam pakan ikan terhadap sistem kekebalan benih ikan kerapu bebek. Benih ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* sebanyak 180 ekor dengan bobot awal antara 10–20 g disebar secara acak ke dalam 18 buah bak fiber volume 100 L dengan sistem air laut mengalir dan diaerasi. Ikan diberi pakan berupa pelet kering dengan dosis vitamin B₆ berbeda, yaitu 0 mg (sebagai kontrol), 2 mg, 4 mg, 6 mg, 8 mg, dan 16 mg vitamin B₆ dalam 100 g pakan. Pakan diberikan dua kali sehari, pagi dan sore hari. Percobaan dirancang menggunakan rancangan acak lengkap dengan tiga ulangan. Pengamatan parameter sistem kekebalan ikan uji dilakukan setelah 18 minggu terhadap aktivitas fagositik (PA), indeks fagositik (PI), dan aktivitas lisosim (LA). Hasil percobaan menunjukkan bahwa penambahan vitamin B₆ dalam pakan ternyata sangat mempengaruhi PA dan LA benih ikan kerapu bebek ($P < 0.05$). Nilai PA dan LA tertinggi diperoleh pada perlakuan vitamin B₆ 6 mg/100 g pakan. Perlakuan vitamin B₆ dalam pakan ikan dapat memacu sistem kekebalan benih ikan kerapu bebek.

ABSTRACT: *The effects of vitamin B₆ on the immune system of humpback grouper juveniles, Cromileptes altivelis. By: Fris Johnny, Nyoman Adiasmara Giri, Ketut Suwirya, and Des Roza*

An experiment on the effects of vitamin B₆ on the immune system as non-specific immune response of humpback grouper, Cromileptes altivelis juveniles had been conducted at the Pathology Laboratory of the Gondol Research Institute for Mariculture, Bali. Six groups of fish, 30 fish each, with body weight ranged from 10 to 20 g were maintained on diet supplemented with different concentrations of vitamin B₆, namely 0 mg, 2 mg, 4 mg, 6 mg, 8 mg, and 16 mg/100 g of diet respectively. The parameters of non-specific immune response changes observed were phagocytic activity (PA), phagocytic index (PI), and lysozyme activity (LA). Data were collected after 18 weeks of the experiment. Results showed the vitamin B₆ on diet stimulated non-specific immune response as PA and LA humpback grouper juvenile ($P < 0.05$). The highest value of PA and LA was obtained on the treatment with vitamin B₆ 6 mg/100 g diet. Vitamin B₆ treatment was able to stimulate the immune response of humpback grouper juvenile.

KEYWORDS: *vitamin B₆, immune system, humpback grouper juvenile*

PENDAHULUAN

Sel darah, terutama leukosit atau sel darah putih, mempunyai peran sangat penting dalam sistem kekebalan. Leukosit mempunyai beberapa jenis dan fungsi dalam melawan benda asing yang berhasil masuk ke dalam tubuh hewan. Kemampuan leukosit dapat ditingkatkan dengan menggunakan imunostimulan, vitamin, dan hormon (Anderson, 1974; Manning & Tatner, 1985; Post, 1987; Schubert, 1987; Andrew *et al.*, 1988; Tizard, 1988; Brown, 1993; Stoskopf, 1993; Klontz, 1994; Anderson, 1996).

Penggunaan imunostimulan akhir-akhir ini sudah banyak dilakukan, menyusul banyaknya kasus penyakit yang tidak efektif ditanggulangi dengan obat

konvensional (Rukyani *et al.*, 1999). Penambahan unsur atau bahan yang dapat memacu timbulnya ketahanan tubuh seperti vitamin C dan E merupakan alternatif baru dalam penanggulangan penyakit ikan.

Pengaruh vitamin B₆ terhadap darah ikan telah dilaporkan oleh Wanakowat *et al.* (1989) pada ikan kakap, *Lates calcarifer*, pada ikan mas *Cyprinus carpio* (Sakthivel & Sampath, 1989), pada ikan nila, *Oreochromis niloticus* (Shiau & Hsieh, 1997), dan pada ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* (Johnny *et al.*, 2004). Sedangkan pengaruh kombinasi vitamin C dan glucan terhadap respon imun non spesifik baru dilaporkan oleh Verlhac *et al.* (1998) pada ikan rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Wahli *et al.* (1998) menggunakan kombinasi vitamin C dan E pada jenis

ikan yang sama. Pada ikan lele dumbo, *Clarias* sp. pemberian vitamin C dalam pakan dapat meningkatkan respon imun non spesifik (Rukyani *et al.*, 1999). Selanjutnya Johnny *et al.* (2003) melaporkan pula bahwa pemberian vitamin C dalam pakan benih ikan kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus* berpengaruh terhadap keragaan respon imun non spesifik.

Vitamin B₆ terdiri atas tiga derivat piridin yang berhubungan erat yaitu; piridoksin, piridoksal, dan piridoksamin (turunan vitamin B₁₂), dan derivat fosfat yang bersesuaian. Dari semua derivat ini, piridoksin, piridoksal, piridoksamin, dan piridoksamin fosfat merupakan wakil utama vitamin tersebut dalam makanan. Ketiga bentuk di atas semuanya memiliki aktivitas vitamin yang sama karena dapat melakukan inter konversi satu sama lain di dalam tubuh. Semua bentuk vitamin tersebut diabsorpsi dari dalam intestin, tetapi hidrolisis senyawa ester fosfat tertentu terjadi selama proses pencernaan (Murray *et al.*, 1997). Defisiensi vitamin B₆ dapat menyebabkan anemia. Anemia terjadi akibat terganggunya sintesis DNA yang menghalangi pembelahan sel dan pembentukan nukleus pada eritrosit yang baru dengan penumpukan megaloblas dalam organ pembentukan eritrosit. Wanakowat *et al.* (1989) melaporkan bahwa yuwana kakap, *Lates calcarifer* tanpa pemberian vitamin B₆ setelah 2—6 minggu memperlihatkan gejala klinis anoreksia, pertumbuhan terhambat, berenang di permukaan, lesi pada bagian bawah bibir, kejang, dan tingkat kematian yang tinggi.

Percobaan ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan vitamin B₆ dalam pakan dengan perbedaan dosis terhadap keragaan parameter sistem kekebalan benih ikan kerapu bebek yaitu aktivitas fagositik (PA), indeks fagositik (PI), dan aktivitas lisosim (LA).

BAHAN DAN METODE

Pakan Uji

Komposisi pakan uji yang digunakan dalam percobaan ini adalah seperti disajikan pada Tabel 1, dengan pakan uji yang digunakan sebanyak 6 perlakuan yaitu pelet yang berisikan nutrisi esensial dan vitamin B₆ dengan 6 dosis berbeda. Perlakuan A tanpa vitamin B₆ sebagai kontrol, dan perlakuan B, C, D, E, dan F masing-masing dengan dosis 2, 4, 6, 8, dan 16 mg vitamin B₆/100 g pakan pelet. Vitamin B₆ yang digunakan adalah *piridoksin*, secara rinci dosis vitamin B₆ dalam pakan ditampilkan pada Tabel 1.

Ikan Uji

Ikan uji yang digunakan adalah benih ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* dengan bobot awal antara 10—20 g yang telah diaklimatisasi pada kondisi percobaan selama 7 hari. Bak uji yang digunakan adalah bak fiber kapasitas 100 L sebanyak 18 buah dengan sistem air laut mengalir dan diaerasi. Setiap bak berisikan masing-masing 10 ekor ikan uji. Ikan uji diberi pakan dua kali sehari dengan dosis 3%—5% bobot badan dan lama percobaan selama 18 minggu.

Percobaan ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan tiga ulangan dan data dianalisis dengan ANOVA. Peubah yang diamati adalah aktivitas fagositik (PA), indeks fagositik (PI), dan aktivitas lisosim (LA).

Koleksi darah dan pemisahan leukosit

Darah ikan uji diambil dari vena jugularis setelah terlebih dahulu ikan uji dipingsankan dengan menggunakan bahan pembius *FA-100* produksi Tanabe

Tabel 1. Komposisi pakan uji (100 g pakan)
Table 1. Composition of test diet (100 g diet)

Bahan (Ingredient)	A	B	C	D	E	F
Tepung ikan (<i>Fish meal</i>)	50	50	50	50	50	50
Kasein (<i>Casein</i>)	20	20	20	20	20	20
Lemak (<i>Lipid</i>)	8	8	8	8	8	8
Dekstrin (<i>Dextrin</i>)	16	16	16	16	16	16
Campuran vit (<i>Vit. Mix</i>) (Vit. B ₆)	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3
Campuran mineral (<i>Mineral Mix.</i>)	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7
CMC	2	2	2	2	2	2
Sellulosa (<i>Cellulosa</i>)	1	0.98	0.996	0.994	0.992	0.984
Vit. B ₆ (<i>Piridoxine</i>)	0	0.02	0.004	0.006	0.008	0.016
Total (100 g)	100	100	100	100	100	100

Seiyaku, Jepang dengan dosis 1 cc/5 L. Setelah ikan uji pingsan, sampel darah disedot dengan spuit plastik steril volume 2,5 cc dengan jarum No. 18 yang di dalamnya telah berisikan antikoagulan *Heparin* produksi Sigma. Selanjutnya disimpan dalam tabung evendoff.

Darah pada tabung evendoff disedot dengan tabung kapiler plastik, ditutup dengan lilin lebah dan disentrifusa pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Tabung kapiler dipotong dengan gunting pada batas leukosit dengan eritrosit, leukosit dikoleksi dan disimpan pada tabung evendoff baru, leukosit ini siap digunakan untuk uji fagositosis.

Sisa koleksi darah pada tabung evendoff disentrifusa dengan minisentrifusa dengan kecepatan 6.000 rpm selama 5 menit, setelah disentrifusa plasma darah dipisahkan ke tabung evendoff baru dengan mikropipet, plasma ini siap digunakan untuk uji aktivitas lisosim. Metode yang digunakan adalah modifikasi dari metode Rowley (1993) dan Klontz (1994).

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

Untuk uji PA dan PI dibutuhkan bahan enzim *Zymosan A* (produksi Sigma) yang berasal dari *Saccharomyces cerevisiae*. *Zymosan A* diambil sebanyak 50 mL yang telah dilarutkan dengan larutan *phosphate buffer saline* (PBS), dimasukkan ke dalam tabung evendoff. Selanjutnya diambil leukosit yang telah disiapkan sebanyak 50 mL dan dicampurkan dengan *Zymosan A*, diaduk rata dengan mikropipet, disimpan pada suhu 25°C selama 1 jam. Kemudian ditetaskan pada kaca slide, dibuatkan preparat ulas tipis, dilakukan pewarnaan darah dengan *May-Gruenwald's Solution Modified* dan *Gyemsa Solution 3%*, kemudian dihitung aktivitas fagositik (PA) dan indeks fagositik (PI) dilakukan berdasarkan rumus yang disajikan di bawah ini (Siwicki & Anderson, 1993; Ellis, 1993).

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

$$PI = \frac{\text{Jumlah zymosan A}}{\text{Jumlah fagosit}}$$

Uji aktivitas lisosim (LA)

Sebelumnya disiapkan media agar yang mengandung *Micrococcus lysodeikticus* (produksi Sigma) pada cawan petri. Cawan petri yang berisikan media agar, dibuatkan lobang kecil sebanyak tiga lobang pada permukaan agar dengan menggunakan *straw*, masukkan sebanyak 10 mL plasma darah, dan pada lobang satunya dimasukkan *chicken egg white*

lysozyme (produksi Sigma) sebagai kontrol. Didiamkan dulu selama 10 menit pada suhu kamar, kemudian disimpan pada inkubator dengan suhu 25°C, dicek setiap hari dan diukur zona aktivitas lisosim (LA) dengan penggaris, pengamatan dilakukan selama 3 hari. Nilai LA dihitung dengan berdasarkan rumus tersaji di bawah ini menggunakan modifikasi dari metode Siwicki & Anderson (1993) dan Ellis (1993).

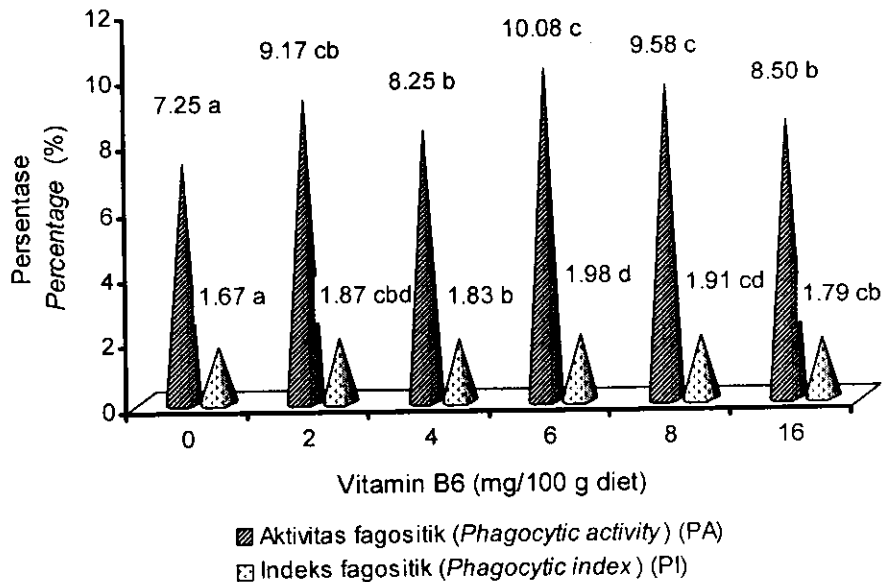
$$LA (\text{cm}) = \frac{\text{Diameter plasma darah uji}}{\text{Diameter kontrol}}$$

HASIL DAN BAHASAN

Data keragaan aktivitas fagositik (PA) dan indeks fagositik (PI) benih ikan kerapu bebek yang diberi pakan dengan dosis vitamin B₆ berbeda disajikan secara lengkap pada Gambar 1.

Dari Gambar 1 terlihat bahwa pengaruh vitamin B₆ terhadap keragaan aktivitas fagositik (PA) benih ikan kerapu bebek dosis 6 mg/100 g pakan (D) memberikan nilai PA tertinggi sebesar 10,08%. Pada percobaan ini secara statistik perlakuan vitamin B₆ dibandingkan dengan kontrol berbeda nyata (P<0,05). Nilai antar perlakuan dosis vitamin B₆ tidak berbeda nyata (P>0,05). Dari percobaan ini terlihat bahwa perlakuan vitamin B₆ dengan peningkatan dosis memberikan nilai PA yang juga meningkat. Perlakuan vitamin B₆ dosis 6 mg/100 g pakan memberikan nilai PA yang maksimal, namun menurun pada perlakuan vitamin B₆ dosis 8 mg/100 g pakan. Johnny *et al.* (2004) melaporkan bahwa perlakuan vitamin B₆ dalam pakan dapat meningkatkan jumlah eritrosit dan leukosit pada benih ikan kerapu bebek. Dengan meningkatnya jumlah total leukosit yang berfungsi sebagai sel fagosit, kemampuan fagositosisnya juga distimulir oleh vitamin B₆.

Aktivitas fagositik (PA) 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 mikroorganisme secara langsung. Fagositosis yang efektif pada invasi kuman dini akan dapat mencegah timbulnya infeksi. Dalam kerjanya, sel fagosit juga berinteraksi dengan komplemen dan sistem kekebalan spesifik. Monosit ditemukan dalam sirkulasi, tetapi dalam jumlah yang lebih kurang dibanding neutrofil. Sel-sel tersebut bermigrasi ke jaringan dan di sana berdiferensiasi menjadi makrofag yang seterusnya hidup dalam jaringan. Makrofag dapat hidup lama, mempunyai beberapa granula dan melepas berbagai bahan, antara lain lisosim, komplemen, interferon, dan sitokin yang



Keterangan (Note):

Setiap nilai yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak beda nyata ($P > 0,05$)

Values in column followed by the same superscripts are not significantly different ($P > 0,05$)

Gambar 1. Pengaruh vitamin B₆ dalam pakan dengan dosis yang berbeda terhadap aktivitas fagositik (PA) dan indeks fagositik (PI) pada benih ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis*

Figure 1. Effects of vitamin B₆ on the phagocytic activity (PA) and phagocytic index (PI) on humpback grouper, *Cromileptes altivelis* juvenile.

semuanya memberikan kontribusi dalam sistem kekebalan non spesifik dan spesifik (Post, 1987; Tizard, 1988; Stoskopf, 1993; Secombes, 1996; Baratawidjaja, 2002).

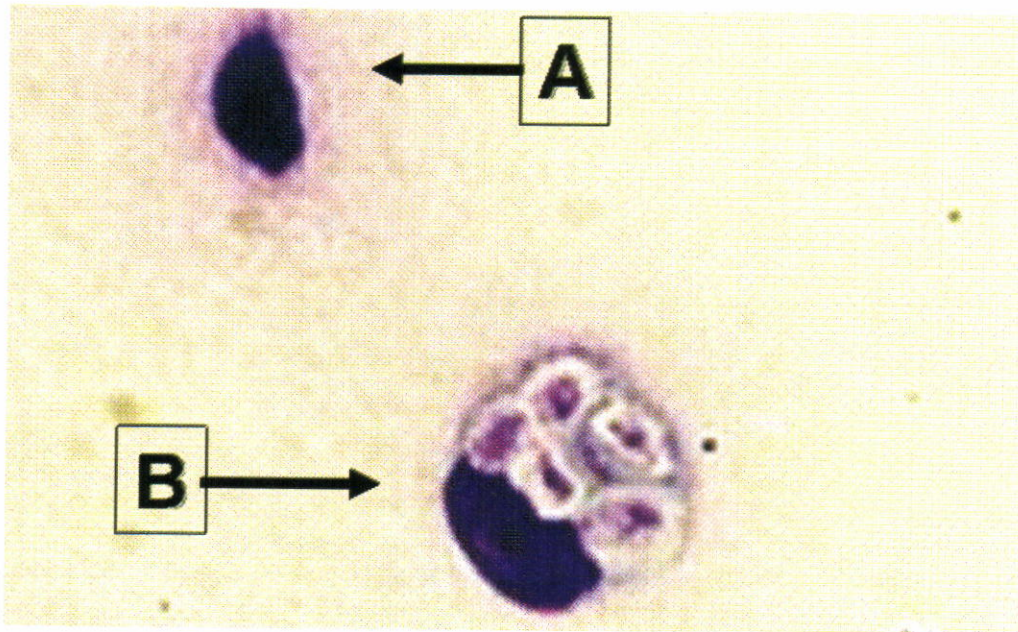
Keragaan indeks fagositik (PI) pada percobaan ini (Gambar 1) terlihat nilai indeks fagositik (PI) tertinggi pada perlakuan vitamin B₆ dosis 6 mg/100 g pakan (D) sebesar 1,98. Secara statistik perlakuan vitamin B₆ dibandingkan dengan kontrol berbeda nyata ($P < 0,05$). Nilai antar perlakuan dosis vitamin B₆ tidak berbeda nyata ($P > 0,05$). PI adalah nilai konstanta dari jumlah total agent yang dihitung dibagi dengan jumlah total sel fagosit. Pada perlakuan vitamin B₆ dosis 6 mg/100 g pakan diperoleh nilai PI sebesar 1,98 yang artinya sel fagosit mampu memfagositosis agent rata-rata sebanyak 2 sampai 5 agent.

Dari percobaan ini terlihat bahwa peningkatan dosis vitamin B₆ berpengaruh terhadap aktivitas fagositik dan indek fagositik. Peningkatan aktivitas fagositik maksimal pada perlakuan dosis vitamin B₆ sebesar 6 mg/100 g pakan dan menurun pada dosis vitamin B₆ 8 mg/100 g pakan. Berdasarkan hasil ini dapat diduga bahwa peningkatan aktivitas fagositik merupakan indikator terhadap peningkatan respon imun non spesifik. Kekebalan terhadap infeksi penyakit dapat dipacu dengan cara vaksinasi, pemberian

imunostimulan, vitamin C, dan vitamin E (Raa *et al.*, 1992). Halver (1989) menyatakan bahwa derivat vitamin B umumnya bekerja sebagai stimulator produksi sel darah yang meliputi eritrosit dan leukosit. Leukosit atau sel darah putih adalah sel yang bertanggung jawab dalam sistem pertahanan tubuh. Leukosit pada ikan terdiri atas neutrofil, monosit, limfosit, dan trombosit. Sebagian besar leukosit ditransfer ke daerah-daerah infeksi untuk memberikan pertahanan yang cepat dan tanggap terhadap setiap gen infeksi (Anderson, 1974; Schalm *et al.*, 1975; Manning & Tatner, 1985; Brown, 1993; Klontz, 1994).

Johnny *et al.* (2004) melaporkan bahwa vitamin B₆ dosis 8 mg/100 g pakan meningkatkan nilai total leukosit pada benih ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis*. Pada ikan *mas Cyprinus carpio*, vitamin B₆ dosis 5 mg/kg pakan dapat meningkatkan nilai total leukosit (Sakthivel & Sampath, 1989). Pada ikan *kakap putih*, Wanakowat *et al.* (1989) melaporkan bahwa vitamin B₆ juga meningkatkan nilai total leukosit.

Penambahan vitamin C pada ikan lele dumbo, *Clarias sp.* antara 500—1.000 mg/kg pakan mampu mempertahankan sintasan ikan yang dipelihara selama delapan minggu hingga 90%, dan juga meningkatkan respon imun non spesifik (Rukyani *et al.*, 1999). Johnny *et al.* (2003) melaporkan bahwa pemberian vitamin C dosis 12 mg/100 g pakan pada benih ikan kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus*



Gambar 2. Peningkatan aktivitas fagositik (PA) pada benih ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis*. Sel fagosit yang tidak melakukan fagositosis (A), dan sel fagosit dengan fagositosis (B)

Figure 2. Stimulated of the phagocytic activity (PA) on humpback grouper, *Cromileptes altivelis* juvenile. Phagocyte cell non phagocytosis (A), and phagocyte cell on phagocytosis (B)

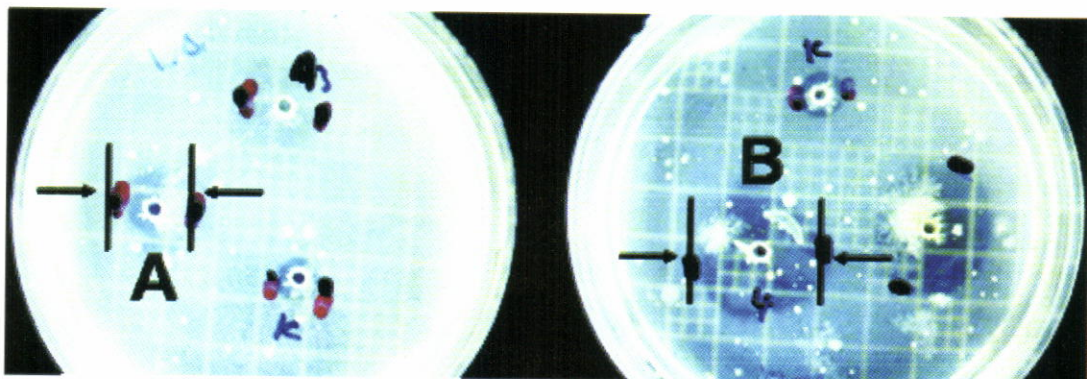
Keterangan (Note):

- Setiap nilai yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak beda nyata ($P>0,05$)
- Values in column followed by the same superscripts are not significantly different ($P>0,05$)

memberikan nilai aktivitas fagositik sebesar 14,67% dan nilai indeks fagositik sebesar 1,97. Perlakuan vitamin B₆ menunjukkan nilai aktivitas fagositik lebih rendah apabila dibanding dengan perlakuan vitamin C, hal ini sesuai dengan pernyataan Anderson (1996) bahwa vitamin C merupakan suatu bahan stimulator respon imun non spesifik di samping sebagai antioksidan dan stimulator multipel sel. Pada ikan *rainbow trout*, *Oncorhynchus mykiss* kombinasi

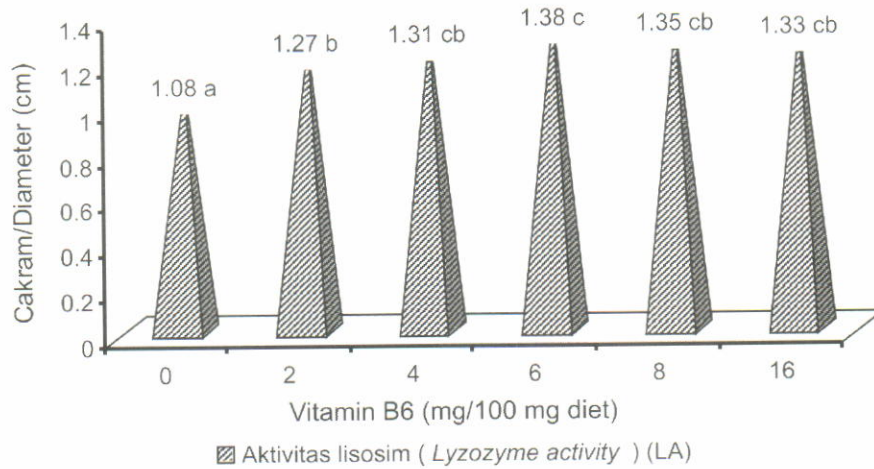
vitamin C dan glucan dapat meningkatkan aktivitas fagositik (Verlhac *et al.*, 1998), dan kombinasi vitamin C dan E pada jenis ikan yang sama juga dapat meningkatkan aktivitas fagositik (Wahli *et al.*, 1998).

Pada Gambar 3 terlihat bahwa pengaruh vitamin B₆ terhadap keragaan aktivitas lisosim (LA) benih ikan kerapu bebek dosis 6 mg/100 g pakan (D) memberikan nilai LA tertinggi sebesar 1,38 cm dan secara statistik perlakuan vitamin B₆ dibandingkan



Gambar 3. Pengaruh vitamin B₆ dalam pakan dengan dosis yang berbeda terhadap aktivitas lisosim (LA) pada benih ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis*

Figure 3. Effects of vitamin B₆ on the lysozyme activity (LA) of humpback grouper, *Cromileptes altivelis* juvenile



Gambar 4. Peningkatan aktivitas lisosim (LA) pada benih ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis*. Aktivitas lisosim pada kontrol (A), dan aktivitas lisosim yang ditingkatkan (B)

Figure 4. Stimulated of the lysozyme activity (LA) on humpback grouper, *Cromileptes altivelis* juvenile. Lysozyme activity on control (A), lysozyme activity on stimulating (B)

dengan kontrol berbeda nyata ($P < 0,05$). Nilai antar perlakuan dosis vitamin B₆ tidak berbeda nyata ($P > 0,05$). Peningkatan dosis vitamin B₆ memberikan pengaruh terhadap peningkatan aktivitas lisosim. Aktivitas lisosim maksimal terjadi pada perlakuan vitamin B₆ dosis 6 mg/100 g pakan, kemudian menurun pada perlakuan vitamin B₆ dosis 8 mg/100 g pakan.

Makrofag yang diaktifkan akan melepaskan produk hidrolase seperti lisosim. Lisosim adalah enzim hidrolitik yang ada di dalam lendir, serum, dan sel-sel fagositik dari pelbagai spesies ikan. Kemungkinan zat ini memberikan daya pertahanan yang penting terhadap patogen mikrobik. Neutrofil dan monosit dari ikan-ikan mengandung lisosim dalam sitoplasmanya dan lisosim serum mungkin berasal dari leukosit-leukosit tersebut. Lisosim mempunyai aktivitas biologi sebagai mukopeptidase yang menghidrolisa peptidoglikan dinding sel bakteri, hilangnya struktur, dan sel menjadi sensitif terhadap lisis osmotik (Ellis, 1993; Yano, 1996; Baratawidjaja, 2002).

Johnny *et al.* (2003) melaporkan bahwa perlakuan vitamin C pada benih ikan kerapu macan dosis 25 mg/100 g pakan memberikan nilai 2,2 cm dan terlihat lebih tinggi dari perlakuan vitamin B₆. Beberapa laporan lain, pada ikan *rainbow trout*, *Oncorhynchus mykiss* kombinasi vitamin C dan glucan dapat meningkatkan aktivitas lisosim (Verlhac *et al.*, 1998), dan kombinasi vitamin C dan E pada jenis ikan yang sama juga dapat meningkatkan aktivitas lisosim (Wahli *et al.*, 1998).

KESIMPULAN

Perlakuan vitamin B₆ dosis 6 mg/100 g pakan dapat memacu sistem kekebalan pada benih ikan

kerapu bebek yang dilambangkan dengan aktivitas fagositik (PA), indeks fagositik (PI), dan aktivitas lisosim (LA).

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada saudara Kasiyanto dan Sumardi teknisi Laboratorium Nutrisi, serta Saudara Putu Suarjana dan Slamet Haryanto teknisi Laboratorium Patologi atas kelancaran penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, D.P. 1974. *Fish Immunology*. T.F.H. Publication Inc. Ltd. USA, 239 pp.
- 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.), Academic Press. USA, p. 289—310.
- Andrew, C., A. Exell, and N. Carrington. 1988. *The Manual of Fish Health*. Salamander Books Ltd. United Kingdom, 208 pp.
- Baratawidjaja, K.G. 2002. *Imunologi Dasar Edisi Kelima*. Balai Penerbit FK-UI. Jakarta, 457 pp.
- Brown, L. 1993. *Aquaculture for Veterinarians: Fish husbandary and Medicine*. Pergamon Press Ltd. USA, 447 pp.
- Ellis, A.E. 1993. Lysozyme assays. In Stolen *et al.* (Eds.). *Techniques in Fish Immunology-1*. Sos Publications, Fair Haven, NJ 07760. USA, p. 101—103.
- Halver, J.E. 1989. The Vitamin (In) Halver, J.E. (Eds.) *Fish Nutrition; Second Edition*. Academic Press, Inc. San Diego, California, p. 32—101.
- Johnny, F. I.N.A. Giri, K. Suwirya, dan D. Roza. 2003. Pengaruh vitamin C dalam pakan terhadap keragaan respon imun non-spesifik benih ikan kerapu macan,

- Epinephelus fuscoguttatus*. Laporan Hasil Penelitian BBRPBL Gondol, 12 pp.
- Johnny, F., I N.A. Giri, K. Suwirya, dan D. Roza. 2004. Pengaruh vitamin B₆ dalam pakan terhadap keragaan hemositologi benih ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis*. Laporan Hasil Penelitian BBRPBL Gondol, 15 pp.
- Klontz, G.W. 1994. Fish Hematology. In Stolen *et al.* (Eds.). *Techniques in Fish Immunology-3*. Sos Publications, Fair Haven, NJ 07704-3303. USA, p. 121—131.
- Manning, M.J. and M.F. Tatner. 1985. *Fish Immunology*. Academic Press Inc. London, 369 pp.
- Murray, R.K., D.K. Granner, F.A. Mayes, and V.W. Rodwell. 1997. *Biokimia Harper*. Terjemahan Hartono (Eds.). Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta, p. 623—625.
- Post, G. 1987. *Textbook of Fish Health*. T.F.H. Publications Inc. USA, 288 pp.
- Raa, J., G. Roerstad, R. Engstad, and B. Robertsen. 1992. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections (In) Shariff, M., R.P. Subangsihe and J.R. Arthur (Eds.) *Disease in Aquaculture I*. Fish Health Section Asian Fisheries Society. Manila. Phillipines, p. 39—50.
- Rowley, A.F. 1993. Collection, separation and identification of fish leukocytes. In Stolen *et al.* (Eds.). *Techniques in Fish Immunology-1*. Sos Publications, Fair Haven, NJ 07760. USA, p. 113—136.
- Rukyani, A., A. Sunarto, dan Taukhid. 1999. Pengaruh pemberian imunostimulan dan penambahan vitamin C pada ransom pakan terhadap peningkatan daya tahan tubuh ikan lele dumbo, *Clarias sp.* *J. Penel. Perik. Indonesia*, 5(4): 30—36.
- Sakthivel, M. and K. Sampath. 1989. Dietary requirement of pyridoxine for *Cyprinus carpio* based on haematological studies. *J. Aqua. Trop.*, (4): 125—135.
- Secombes, C.J. 1996. The Nonspecific Immune System: Cellular Defenses. D.P. 1996. (In) *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment*. G. Iwama and T. Nakanishi (Eds.), Academic Press. USA, p. 63—105.
- Schubert, G. 1987. *Fish Diseases a Complete Introduction*. T.F.H. Publications Inc. USA, 125 pp.
- Schalm, O.W., N.C. Jain, and E.J. Carroll. 1975. *Veterinary Hematology*. 3rd Edition. Lea & Fehiger. Philadelphia, 807 pp.
- Siwicki, A.K. and D.P. Anderson. 1993. Immunostimulation in Fish; Measures the effects of stimulants by serological and immunological methods, *International Workshop and Training Course in Poland*, 15 pp.
- Shiau, S.Y. and H.L. Hsieh. 1997. Vitamin B₆ requirements of tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus* fed two dietary protein concentrations. *Fisheries Science*, 63(6): 1,002—1,007.
- Stoskopf, M.K. 1993. *Fish Medicine*. W.B. Saunders Company. Mexico, 664 pp.
- Tizard, I. 1988. *Pengantar Immunologi Veteriner*. Terjemahan Partodiredjo *et al.* 1988. Airlangga University Press, 497 pp.
- Wahli, T., V. Verlhac, J. Gabaudan, W. Schuep, and W. Meler. 1998. Influence of combined vitamins C and E on non-specific immunity and disease resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Disease*. 21: 127—137.
- Wanakowat, J., M. Boonyaratpalin, T. Pimoljinda, and M. Assavaare. 1989. Vitamin B₆ requirement of juvenile Seabass, *Lates calcarifer*. Takeda & Watanabe (Eds.) *Proc. Third Int. Symp. on Feeding and Nutr. in Fish*. Toba Aug. 28—Sept. 1, Japan, 1989, p. 141—147.
- Verlhac, V., A. Obach, J. Gabaudan, W. Schuep, and R. Hole. 1998. Immunomodulation by dietary vitamin C and gluca in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 8: 409—424.
- Yano, T. 1996. The nonspecific immune system: Humoral defense Anderson, D.P. 1996. (In) *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment*. G. Iwama and T. Nakanishi (Eds.), Academic Press. USA, p. 106—159.

