

PENGARUH PEMBERIAN PROBIOTIK TERHADAP JUMLAH BAKTERI PADA GINJAL IKAN NILA SETELAH UJI TANTANG DENGAN *Aeromonas hydrophila* DAN *Aeromonas salmonicida* ATIPIKAL

The Effect of Probiotic Supplementation to The Total Number of Bacteria In Kidney of Nila Fish After Antagonism Test With *Aeromonas hydrophila* and a typical *Aeromonas salmonicida*

Ferina Nursanti, Agus Irianto dan Hernayanti

Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman Kampus Unsoed Grendeng Po Box 30, Purwokerto 53122

Diserahkan : 30 Nopember 2004; Diterima : 25 Juli 2005

ABSTRAK

Penelitian ini untuk mengetahui efek dari pemberian probiotik A3-51 pada makanan terhadap jumlah bakteri yang ada di ginjal dan kematian ikan nila merah (*Oreochromis niloticus*). Penelitian dilaksanakan dalam dua tahap, pertama untuk mengetahui tingkatan imun tertinggi dari ikan yang mengindikasikan peningkatan aktivitas *macrophage* dan *phagocytic*. Tahap kedua untuk mengetahui tingkat imun ikan dengan menginjeksi *Aeromonas hydrophila* dan *Aeromonas salmonicida* atipikal. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 kali ulangan. Hasil dari tahap pertama menunjukkan sistem imun non spesifik tertinggi ditemukan pada 21 hari perlakuan. Tahap kedua menunjukkan total bakteri tertinggi pada ginjal dan tingkat kematian 20.23×10 cells/g dan 46,67 %. Keduanya ditemukan pada perlakuan B2.

Kata kunci : probiotik, *macrophage*, jumlah bakteri, kematian

ABSTRACT

*This research was aimed to know the effect of A3-51 probiotic supplementation on food to the total number of bacteria in kidney and mortality of nila fish (*Oreochromis niloticus*). This research was carried out in two steps, the first was to know the highest immunity level from fish indicated by the increasing number of the macrophage and its phagocytic activity. Meanwhile, the second was to know the immunity level of fish which injected by *Aeromonas hydrophila* and atypical *Aeromonas salmonicida*. The experimental method used was Completely Randomized Design in 3 replicates. The result from the first step showed that the highest non specific immune system was found in 21 days treatment. The second step showed that the highest total number of bacteria in kidney and mortality level were 20.23×10 cells/g and 46.67% respectively, both was found in B2 treatment.*

Key words: probiotic, macrophage, total number of bacteria, mortality

PENDAHULUAN

Ikan nila merupakan salah satu jenis ikan air tawar yang memiliki ciri-ciri bentuk tubuh panjang dan ramping,

dengan sisik berukuran besar. Ikan nila tumbuh normal pada suhu 14-38°C. Ikan nila tergolong ikan peranakan segala atau omnivora. Masalah yang dihadapi pada budidaya ikan nila antara lain penyakit

Pengaruh Pemberian Probiotik (F. Nursanti)

infeksi bakteri.

Penyakit pada ikan yang dibudidayakan umumnya timbul apabila kondisi budidaya kurang baik seperti kualitas air menurun, pemberian pakan yang kurang baik atau tidak mencukupi, dan kepadatan terlalu tinggi (Cristensen, 1989). Salah satu patogen pada ikan nila adalah bakteri *Aeromonas hydrophila* yang menyebabkan penyakit *Motile Aeromonad Septicacma* (MAS) (Dana dan Angka, 1990). Selain itu *Aeromonas salmonicida* atipikal merupakan penyebab penyakit pada sejumlah spesies ikan air tawar dan ikan laut non-salmonoid.

Penyebaran atau invasi bakteri patogen di dalam tubuh dapat menyebabkan rusaknya jaringan dan organ. Menurut Prayitno (1997), setelah *Aeromonas* masuk ke dalam tubuh, bakteri ini akan menembus masuk ke dalam organ pembuluh darah dan akhirnya terbawa masuk ke organ tubuh. Kerusakan yang parah pada ginjal ikan dapat meningkatkan jumlah angka kuman ginjal.

Probiotik merupakan suplemen pakan berupa kultur atau sel-sel mikroba hidup yang memberikan keuntungan inang dengan perbaikan keseimbangan mikroba di usus (Fuller, 1992). Menurut Fuller (1987) keuntungan penggunaan mikroba probiotik untuk manipulasi populasi mikroba saluran pencernaan yaitu: merubah metabolisme mikrobial dengan meningkatkan atau menurunkan aktivitas enzim, menstimulasi imunitas melalui peningkatan kadar *makrofag* dan antibodi, menekan populasi mikroba patogen dengan memproduksi senyawa antimikroba, kompetisi nutrisi dan tempat pelekatan pada dinding intestinal.

Hasil penelitian Irianto dan Austin

(2002b), menunjukkan bahwa pemberian pakan yang disuplemen probiotik selama 7 dan 14 hari, mampu meningkatkan jumlah *makrofag* ginjal dan aktivitas fagositosis pada *rainbow trout*.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui :

1. interaksi antara pemberian probiotik dan lama waktu pemberiannya terhadap respon imun non spesifik ikan nila,
2. pengaruh pemberian probiotik terhadap respon imun non spesifik ikan nila,
3. pengaruh lama waktu pemberian probiotik terhadap respon imun non spesifik ikan nila,
4. pengaruh probiotik dan lama waktu pemberiannya terhadap angka kuman total ginjal dan mortalitas ikan nila setelah uji tantang dengan *A. hydrophila* dan *A. salmonicida* atipikal.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan dalam 2 (dua) tahap. Metode penelitian yang digunakan dalam tahap 1 (pertama) adalah metode eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial.

Tahap I :

Terdiri dari 2 faktor yang dikombinasi yaitu :

- POL1 = pemberian pakan tanpa probiotik selama 7 hari
- POL2 = pemberian pakan tanpa probiotik selama 14 hari
- POL3 = pemberian pakan tanpa probiotik selama 21 hari
- PIL1 = pemberian pakan probiotik selama

- 7 hari
P1L2 = pemberian pakan probiotik selama
14 hari
P1L3 = pemberian pakan probiotik selama
21 hari

Tahap II. Uji Tantang dengan Bakteri Patogen

Ujiantang dilakukan untuk melihat angka kuman total ginjal dan tingkat mortalitas ikan Nila. Ujiantang dilakukan menggunakan 2 jenis bakteri patogen yaitu *A. hydrophila* dan *A. salmonicida* atipikal.

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian tahap 2 adalah eksperimental, dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan yang dicobakan terdiri atas :

- Bo = Pemberian pakan tanpa probiotik dan tidak diuji tantang (kontrol)
B1 = Pemberian pakan tanpa probiotik dan diuji tantang dengan *Aeromonas hydrophila*
B2 = Pemberian pakan tanpa probiotik dan diuji tantang dengan *Aeromonas salmonicida* atipikal.
B3 = Pemberian pakan probiotik pada ikan yang lamanya waktu tergantung hasil penelitian tahap 1 dan diuji tantang dengan *Aeromonas hydrophila*
B4 = Pemberian pakan probiotik pada ikan yang lamanya waktu tergantung hasil penelitian tahap 1 dan diuji tantang dengan *Aeromonas salmonicida* atipikal.

Setiap perlakuan yang dicobakan tersebut diulang sebanyak 3 (tiga) kali. Variabel yang digunakan adalah variabel tergantung dan variabel bebas. Variabel tergantung berupa pemberian probiotik

dan bakteri untuk uji tantang, sedangkan variabel bebasnya adalah bakteri patogen pada ginjal dan kematian ikan. Parameter utama yang diukur adalah angka kuman total pada ginjal dan mortalitas ikan, sedangkan parameter pendukungnya adalah jumlah *makrofag*, aktivitas fagositosis *makrofag* dan persentase neutrofil.

Cara kerja

Ikan nila yang digunakan dalam penelitian mempunyai ukuran panjang 13-15 cm dan dalam keadaan sehat serta telah diaklimatisasi selama 2 minggu untuk menyesuaikan diri dengan lingkungan dalam kondisi laboratorium dalam akuarium ukuran 60 x 40 x 40 cm. Pemberian pakan dilakukan sehari 3x, sebanyak 3% dari berat tubuh ikan. Pakan probiotik disiapkan menurut Irianto dan Austin (2002b). Kontrol hanya diberi pakan tanpa penambahan probiotik.

A. hydrophila dan *A. salmonicida* dikultur pada medium TSB (oxid) dan diinkubasi 2 x 24 jam dalam suhu ruangan. Suspensi bakteri diurai dengan sentrifugasi (3000 rpm, 15 menit) menggunakan larutan garam fisiologis sebanyak 3 kali, dan dihitung kepadatan selnya dengan haemositometer dan siap diinfeksi ke ikan uji (konsentrasi 10⁸ sel/mL; 0,1 mL) secara injeksi intraperitoneal.

Sampel ginjal ikan yang mati atau terinfeksi karena uji tantang diambil dan ditumbuhkan, selanjutnya Sampel ginjal dilakukan pengenceran dengan asumsi antara ginjal : larutan = 1:9. Dua pengenceran terakhir diambil 0,1 dan ditumbuhkan secara sebar ulas (*spread plate*) duplo pada media TSA. Kemudian diinkubasi 24 jam dan dilakukan

Pengaruh Pemberian Probiotik (F. Nursanti)

perhitungan secara *Total Plate Count* (TPC).

Ikan yang diinjeksi intraperitoneal dengan *A. hydrophila* atau *A. salmonicida* diinkubasi selama 7 hari. Persentase mortalitas (M) dihitung dari I-S, dengan rumus :

$$S = Nt/No \times 100\%$$

Keterangan :

- S = Kelangsungan hidup ikan,
Nt = Jumlah ikan uji yang mati sampai akhir penelitian,
No = Jumlah ikan uji pada awal penelitian.

Makrofag ginjal dihitung dengan mengambil ginjal dari perlakuan tahap 1. Ginjal diambil dengan spatula 1 secara aseptis, ditimbang, dihancurkan dengan *tissue grinder*, dan diencerkan dengan perbandingan 1: 10 pada RPMI 1640+ yang mengandung 1 g per 100 mL penstrep, 0,2 mg per 100 mL heparin dan 10% (v/v) *Foetal Bovine Serum* (FBS) (RPMI 1640+) yang disterilkan dengan penyaring bakteri steril (0,22 m, *Millipore Millex*). Perhitungan total *makrofag* dilakukan dengan cara memeriksa bilik hitung dengan mikroskop perbesaran sedang (40x) dan *makrofag* dihitung dalam 4 kotak kecil.

$$\text{Makrofag ginjal} = \text{rata-rata} \times 4 \times 106 \times \frac{1}{fp}$$

(fp = faktor pengenceran)

Sisa suspensi sel sebanyak 3 mL di teteskan pada *object glass* dan diratakan, diinkubasi selama 60 menit pada suhu kamar (26°C). *Object glass* kemudian dicuci dengan RPMI 1640+ untuk

menghilangkan sel yang tidak melekat pada *object glass*, selanjutnya ditambahkan 1,0 mL suspensi yeast 109 sel/mL. Diinkubasi pada suhu 26°C selama 60 menit. Kemudian *object glass* dicuci 3 kali dengan RPMI 1640+, difiksasi dengan metanol 96% (v/v) dan dibiarkan selama 3-5 menit pada temperatur ruang, dikeringkan dan ditetesi dengan larutan Giemsa, dibiarkan selama 20-30 menit selanjutnya dicuci dengan air. *Object glass* diperiksa dengan mikroskop perbesaran 400x dan dihitung untuk determinasi perbandingan sel yang menelan sel yeast. Aktivitas fagositosis dirumuskan sebagai berikut :

$$PA = (\text{jumlah makrofag yang menelan yeast} / 100 \text{ makrofag}) \times 100\%$$

Presentase neutrofil dihitung dengan membuat preparat ulas dari darah ikan pada perlakuan tahap 1. Jenis-jenis leukosit yang ada dihitung dari tiap 100 sel leukosit dan hasilnya dinyatakan dalam persen (%).

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan Analisis Ragam (uji F) pada tingkat kesalahan 5% dan 1 % 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 (Sastrosupadi, 2000).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis varian pemberian pakan probiotik (P) dan lama waktunya (L) pada ikan nila menunjukkan bahwa pemberian pakan probiotik dan lama waktunya berpengaruh sangat nyata terhadap jumlah

total *makrofag* ginjal ikan nila ($P < 0,01$; $L < 0,01$). Pengaruh interaksi antara jenis pakan dengan lama waktu juga memberikan hasil yang sangat nyata ($P \times L < 0,01$). Karena interaksi antara jenis pakan dengan lama waktu memberikan hasil yang sangat nyata, maka dilakukan pengujian lanjut dengan uji beda nyata terkecil.

Pemberian pakan probiotik selama 21 hari (PIL3) memberikan pengaruh peningkatan rerata jumlah total *makrofag* ginjal ikan nila tertinggi yaitu sebesar $3,08 \times 10^8$ sel/mm³. Pemberian pakan tanpa probiotik dengan lama waktu yang berbeda tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap peningkatan rerata jumlah total *makrofag* ginjal ikan nila karena didapatkan hasil yang tidak berbeda nyata. Peningkatan rerata jumlah *makrofag* sudah mulai terlihat pada pemberian pakan probiotik 7 hari. Peningkatan rerata jumlah *makrofag* terjadi karena sel-sel monosit yang distimulasi oleh adanya probiotik yang ditambahkan ke dalam pakan ikan.

Hal ini didukung oleh penelitian Irianto (2002b), bahwa peningkatan rerata jumlah *makrofag* pada ginjal ikan *rainbow trout* (*O. mykiss*) terjadi karena proses proliferasi dan diferensiasi dari sel-sel yang distimulasi oleh adanya probiotik yang berfungsi sebagai imunostimulan yang ditambahkan ke dalam pakan.

Menurut Irianto dan Austin (2002b), selain meningkatkan jumlah sel *makrofag* ginjal, pemberian probiotik juga meningkatkan kemampuan aktivitas fagositosis. Peningkatan respon fagosit dari sel *makrofag* dapat diketahui dengan pemberian sel yeast sebagai antigen dalam pengamatan setiap 7 hari (Gambar 1).

Aktivitas fagositosis terus meningkat sampai hari ke 21 dengan peningkatan sampai 20,33%. Peningkatan aktivitas fagositosis pada perlakuan pakan probiotik menunjukkan bahwa semakin lama pemberian pakan probiotik, semakin tinggi pula aktivitas fagositosis. Pada perlakuan kontrol tanpa probiotik, aktivitas fagositosis mengalami kenaikan pada hari ke 14 tetapi terjadi penurunan sebesar 1 % pada hari ke 21.

Neutrofil ditemukan pada stadium pertama peradangan (Robert, 1989). Fungsi utama sel neutrofil adalah penghacuran bahan asing melalui proses fagositosis. Neutrofil akan mengalami peningkatan jumlah sebagai bentuk respon imun terhadap hadirnya suatu antigen atau protein asing.

Jumlah neutrofil tertinggi di dapat pada hari ke 7 setelah pemberian probiotik yaitu sebesar 35%. Pada hari ke 21 terjadi penurunan sebesar 13,33%, sedangkan pada kontrol sampai hari ke 21 didapatkan jumlah yang relatif sama.

Berdasarkan hasil penelitian tahap I, menunjukkan bahwa peningkatan sistem imun non spesifik tertinggi terjadi pada hari ke 21. Hal itu diketahui dari gambaran *makrofag* dan aktivitasnya. Dari hasil penelitian tahap I dilakukan ujiantang untuk tahap II. Ujiantang dilakukan untuk mengetahui dan mengukur tingkat kekebalan tubuh ikan yang diinfeksi dengan bakteri patogen aktif. Tingkat kekebalan diketahui dari jumlah angka kuman total ginjal dan mortalitas ikan uji.

Hasil ujiantang dengan *A. hydrophila* dan *A. salmonicida* atipikal menunjukkan bahwa jumlah angka kuman total dari ikan yang diberi pakan probiotik mengalami penurunan dibandingkan dengan kontrol

Pengaruh Pemberian Probiotik (F. Nursanti)

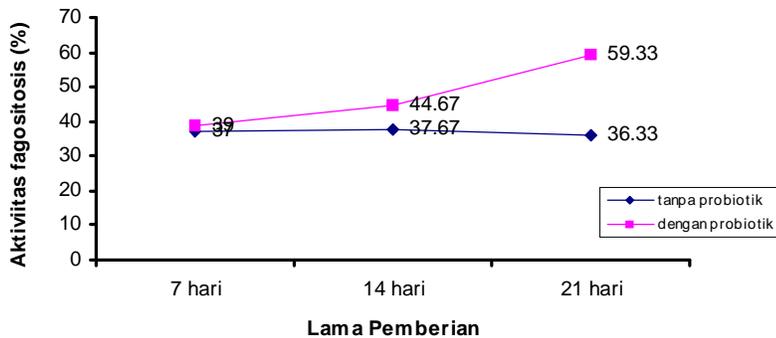
tanpa probiotik. Analisis varians dari TPC jumlah angka kuman total ginjal ikan nila menunjukkan bahwa pemberian probiotik berpengaruh sangat nyata terhadap jumlah total angka kuman ginjal ikan nila ($P < 0,01$).

Pengaruh probiotik terhadap jumlah angka kuman total ginjal ikan nila dapat dilihat antar perlakuan yang diuji tantang dengan patogen yang sama. Ikan uji yang ditantang dengan *A. hydrophila* tanpa probiotik (B1) mempunyai rerata jumlah angka kuman total sebesar $9,3054 (20,23 \times 10^8 \text{ CFU/g})$, sedangkan ikan uji yang diberi probiotik selama 21 hari (B3) mempunyai rerata jumlah angka kuman total sebesar $9,1901 (15,72 \times 10^8 \text{ CFU/g})$. Perbedaan jumlah juga terjadi pada ikan yang diuji tantang dengan *A. salmonicida*

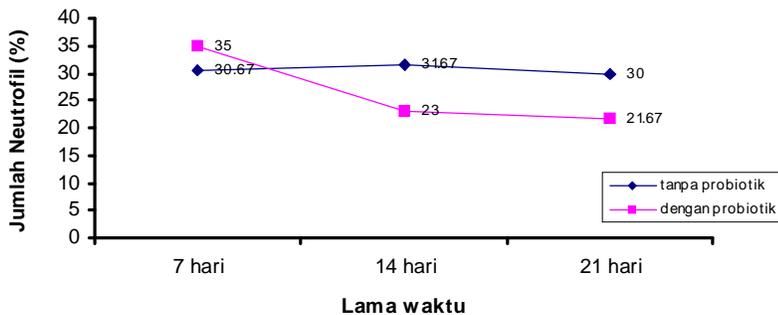
atipikal (perlakuan B2 dan B4) yaitu $9,1245 (13,51 \times 10^8 \text{ CFU/g})$ dan $8,5011 (31,90 \times 10^7 \text{ CFU/g})$.

Data di atas jelas menunjukkan bahwa penambahan probiotik dalam pakan ikan dapat mengurangi jumlah angka kuman total dari ginjal ikan nila. Iriyanti dan Rimbawanto (2001) menyatakan bahwa pemberian probiotik dalam pakan mampu menurunkan populasi bakteri patogen, seperti *Escherichia coli* dan *Salmonella* sp.

Ikan uji yang ditantang dengan *A. hydrophila* mempunyai jumlah total kuman ginjal yang lebih tinggi dibandingkan dengan ikan yang ditantang dengan *A. salmonicida* atipikal. Hal tersebut menunjukkan bahwa *A. salmonicida* kurang virulen terhadap



Gambar 1. Aktifitas fagositosis sel *makrofaq* pada ginjal ikan nila



Gambar 2. Jumlah neutrofil (%) darah ikan nila setelah pemberian probiotik

ikan nila, Irianto (2002b) menjelaskan bahwa *A. salmonicida* atipikal dapat menyebabkan penyakit eritrodermatitis pada ikan karp dan karp koi serta penyakit borok pada ikan mas (*Cyprinus carpio*). Kemungkinan *A. salmonicida* atipikal memiliki inang spesifik atau memiliki tingkat virulensi yang berbeda terhadap jenis ikan yang berbeda.

Penambahan probiotik dalam pakan ikan selain menurunkan jumlah angka kuman total dan ginjal ikan nila juga menurunkan tingkat mortalitas dari ikan uji. Hasil analisis varian menunjukkan bahwa penambahan probiotik selama 21 hari memberikan pengaruh sangat nyata terhadap tingkat mortalitas ikan ($P < 0,01$).

Tingkat mortalitas tertinggi terjadi pada perlakuan B1 yaitu sebesar 46,67%. Penambahan probiotik dalam pakan ikan mampu menurunkan tingkat mortalitas dari ikan uji yang ditunjukkan dari perlakuan B3 yaitu penambahan probiotik dalam pakan selama 21 hari yang ditantang dengan patogen yang sama yaitu *A. hydrophila*. Penurunan tingkat mortalitas mencapai 50% yaitu dari prosentase 46,67% sampai 23,33%. Hal ini menunjukkan bahwa probiotik efektif dalam mencegah timbulnya penyakit yang disebabkan oleh *A. hydrophila*.

Perlakuan dengan ujiantang *A. salmonicida* atipikal tidak dapat menyebabkan kematian pada ikan uji baik dengan atau tanpa penambahan probiotik. Hal ini ditunjukkan dari perlakuan B1 dan B4 yang menghasilkan 0 % tingkat mortalitas. Dari hasil penelitian yang diperoleh dimungkinkan patogen *A. salmonicida* atipikal bukan merupakan bakteri patogen penyebab penyakit pada ikan nila walaupun patogen ini mampu menyebabkan penyakit pada ikan mas.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Interaksi antara pemberi probiotik dan lama waktu pemberiannya memberikan perbedaan yang nyata terhadap respon imun non spesifik ikan nila. Pemberian probiotik selama 21 hari meningkatkan rerata jumlah *makrofag* ginjal sebesar $3,08 \times 10^8$ sel/mm³ dan aktivitas fagositosis sebesar 59,33% serta meningkatkan jumlah neutrofil darah 5% dari kontrol. Pemberian probiotik selama 21 hari juga mampu menekan jumlah angka kuman total ginjal sebesar $4,51 \times 10^8$ cfu/g serta menurunkan tingkat mortalitas ikan nila sampai 50% setelah ujiantang dengan *A. hydrophila* dan jumlah angka kuman total ginjal sebesar $10,32 \times 10^8$ cfu/g setelah ujiantang dengan *A. salmonicida* atipikal.

Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa mortalitas hanya terjadi pada ikan yang diujiantang dengan *A. hydrophila* tetapi jumlah angka kuman total yang tinggi dialami oleh seluruh ikan uji, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tingkat virulensi *A. salmonicida* atipikal terhadap ikan nila.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih kami sampaikan kepada Drs Agus Irianto MSc, Ph.D, Dra Hemayanti, MSi dan Dra Ning Iriyanti, MSc yang telah membiayai proyek penelitian ini sebagai bagian dari Proyek Hibah Bersaing XII. Dr Bambang Heru Budianto, MSc yang telah membantu penyempurnaan analisis data selama penyusunan laporan serta semua pihak

Pengaruh Pemberian Probiotik (F. Nursanti)

yang telah membantu selama proses penelitian ini berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Baratawidjaja, K.G. 2000. "Imunologi Dasar", Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Bastiawan, D., A. Wahid., M. Alifuddin dan I. Agustiawan. "Gambaran darah Lele Dumbo yang infeksi Cendawan *Aphanomyces spp.* pada pH yang berbeda", Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia, 7(3) : 44-47.
- Bellanti, JA. 1993. "Imunologi III", Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Cristensen, M.S. 1989. "Budidaya intensif air tawar dalam keramba di wilayah tropik dan subtropik", Yayasan Obor Indonesia, Jakarta.
- Dana, D dan S.L. Angka. 1990. "Masalah penyakit parasit dan bakteri pada ikan air tawar serta cara penanggulangannya", Prosiding Seminar Nasional II Penyakit Ikan dan Udang. Balai Penelitian Perikanan Air Tawar, Bogor, pp.10-23.
- Fuller, R. 1987. A Review. "Probiotic in men and animals", Journal Application Bacteria 66: 365-378.
- Fuller, R. 1992. "Probiotics, The Scientific Basis", Chapman & Hall, New York.
- Iriyanti, N dan Rirnbawanto E,A. 2001. "Pengaruh suplementasi probiotik *Lactobacillus Sp.* dalam ransum unggas terhadap aktivitas antagonisme dan kompetisi *Lactobacillus Sp.* pada saluran pencernaan unggas", Biosfera 18(2) : 68-72.
- Irianto, A dan Austin, B. 2004. "Respon imun Ikan Komet (*Carassius auratus*) terhadap suplementasi Probion A3-51 per oral melalui pakan dan kelulusan hidupnya pada uji tantang dengan *Aeromonas Salmonicida atipikal*". Prosiding, Pengendalian Penyakit pada Ikan dan Udang Berbasis Imunisasi dan *Biosecurity*, Purwokerto. pp.86-90.
- Irianto, A and B. Austin. 2002b. "Use of probiotic to control furunculosis in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss (Walbaum)*", Journal of Fish Diseases 25 : 333-342.
- Prayitno, S,B. 1997. "Penyakit pada Katak Lembu (*Rana catesbeiana*) dan cara penanggulangannya", Yayasan Karya Asih dan Dinas Perikanan Provinsi Dati I Jawa Tengah Bandungan, Ambarawa.
- Robert, R.J. 1989. "Fish Pathology 2nd". Bailliere Tindall, London.
- Soeharsono, H.1997. "Probiotik alternatif pengganti antibiotik", Buletin PPSKI 9 (X):3-5.