

Prosiding Seminar Nasional Kemaritiman dan Sumberdaya Pulau-Pulau Kecil, 1 (1) : 62-70

PENINGKATAN AKTIVITAS FAGOSITOSIS PADA IKAN KERAPU BEBEK (*Cromileptes altivelis*) DENGAN PEMBERIAN IMUNOSTIMULAN (β -GLUCAN) YANG DIEKSTRAK DARI JAMUR TIRAM PUTIH (*Pleurotus ostreatus*)

Juharni¹ dan Fatma Muchdar*

¹*Program Studi Budidaya Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan.
Universitas Khairun. Ternate
Email.junaxks@gmail.com

ABSTRAK

Ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) merupakan jenis ikan laut yang mempunyai prospek bagus dan layak dikembangkan sebagai ikan budidaya laut akan tetapi masih terkendala dengan rentannya penyakit terutama diakibatkan oleh bakteri, hal ini disebabkan karena tingkat kekebalan masih rendah. sehingga Kerugian yang ditimbulkan sangat besar, Usaha penanggulangan penyakit menggunakan vaksin (antigen) yang memicu produksi antibodi spesifik terhadap satu patogen tertentu, sekelompok senyawa biologi dan sintesis yang disebut imunostimulan dapat meningkatkan pertahanan non-spesifik dan spesifik. Imunostimulan adalah suatu zat yang mempunyai kemampuan untuk meningkatkan ketahanan tubuh terhadap infeksi. Berbagai jenis imunostimulan dapat digunakan, salah satunya adalah *Chromium yeast*, yang berfungsi juga untuk mengatasi bakteri. Salah satunya adalah jamur jenis “*Shiitake*” atau jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*); Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh β -glukan yang diekstrak dari jamur tiram putih (*Pleurotus ostratus*) terhadap aktifitas fagositosis, dan tingkat kelangsungan hidup ikan kerapu bebek dan untuk mengetahui dosis yang efektif penggunaan β -glukan untuk meningkatkan aktifitas fagositosis pada ikan kerapu bebek, manfaat penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dalam usaha meningkatkan aktifitas fagositosis Ikan Kerapu berupa penggunaan β -Glukan sebagai immunostimulan terhadap bakteri *Vibrio alginoliticus*. Sel ini berada dalam sirkulasi darah dalam bentuk monosit, kemudian akan meninggalkan sirkulasi, menjadi matang dan menetap di jaringan pengikat sebagai *macrophage*. *Macrophage* yang berada di dalam jaringan sering disebut sebagai sel *kupffer* pada *hepar*, sel debu pada *pulmo*, osteoklas pada tulang, dan lain-lain. Jadi aktivitas fagositosis *macrophage* meningkat setelah pemberian imunostimulan ekstrak jamur tiram putih mengandung zat yang dapat berperan sebagai *macrophage activating factor*. Sehingga Pemberian β - glukan yang diekstrak dari dinding jamur tiram putih dapat meningkatkan aktivitas fagositosis dan β - glukan yang paling efektif dapat meningkatkan respon imun ikan kerapu bebek terdapat pada perlakuan 100 μ l/ekor.

PENDAHULUAN

Ikan kerapu merupakan komoditas perikanan laut dengan nilai ekonomis tinggi dan telah dapat dikembangkan di Indonesia melalui teknologi pengembangan budidaya. Daerah produksi benih ikan kerapu terletak di wilayah Bali, Situbondo, dan Lampung, sedangkan daerah budidaya atau pembesaran terletak di wilayah Jakarta, Lombok dan Makassar. Budidaya ikan kerapu telah dilakukan di beberapa tempat di Indonesia, namun dalam proses pengembangannya masih menemui banyak kendala. Ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) merupakan salah satu jenis ikan laut yang mempunyai prospek yang cerah dan layak dikembangkan sebagai ikan budidaya laut karena mempunyai nilai ekonomis yang tinggi dipasar lokal maupun internasional. Selain itu Ikan kerapu bebek juga potensial untuk dibudidayakan karena pertumbuhannya relatif cepat, mudah untuk dipelihara, mempunyai toleransi yang tinggi terhadap perubahan lingkungan. (Akbar dan Sudaryanto, 2001).

Budidaya ikan ini sangat potensial akan tetapi masih terkendala dengan rentannya penyakit terutama diakibatkan oleh bakteri dan pertumbuhannya relatif agak lambat, hal ini disebabkan karena tingkat kekebalan masih rendah (Feliatra *dkk.*, 2004). Kendala utama di tingkat pembenihan maupun pembesaran adalah masih rendahnya tingkat kelangsungan hidup (*survival rate*) karena adanya serangan penyakit yang disebabkan oleh bakteri, virus, jamur. Bakteri menyerang hampir semua jenis ikan termasuk ikan kerapu yang diperlihara di tambak bersalinitas rendah adalah bakteri *Vibrio alginolyticus*. Kerugian yang ditimbulkan sangat besar, sebab dalam waktu relatif singkat ikan akan mati secara massal (Kordi, 2004).

Usaha penanggulangan penyakit dapat berupa pengobatan dan pencegahan. Pencegahan penyakit dirasakan lebih menguntungkan apabila dibanding dengan pengobatan. Karena dengan pengobatan selain dapat menimbulkan pencemaran dan mahal, juga tidak dapat memecahkan masalah dengan tuntas. Tidak seperti halnya vaksin (antigen) yang memicu produksi antibodi spesifik terhadap satu patogen tertentu, sekelompok senyawa biologi dan sintesis yang disebut imunostimulan dapat meningkatkan pertahanan non-spesifik juga dapat meningkatkan pertahanan spesifik. Oleh karena itu imunostimulan dapat dijadikan alternatif dalam perlindungan serangan terhadap bakteri penyebab penyakit melalui peningkatan sistem kekebalan spesifik dan non-spesifik. Imunostimulan adalah suatu zat yang mempunyai kemampuan untuk meningkatkan ketahanan tubuh terhadap infeksi (Mudjiutami *dkk.*, 2007). Berbagai jenis imunostimulan dapat digunakan, salah satunya adalah *Chromium yeast*, yang berfungsi juga untuk mengatasi bakteri. Bahan ini biasanya digunakan sebagai pencampur pakan pada hewan, yang diharapkan dapat berdampak positif juga bagi pertahanan tubuh ikan.

Banyak jenis jamur yang dapat membantu tubuh memerangi kanker dan membangun sistem imun. Salah satunya adalah jamur jenis “*Shiitake*” atau jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*); jamur ini mengandung *polysaccharida*, terutama *lentinan*, senyawa ampuh yang membantu imunitas. Jamur ini mengandung protein yang disebut lecitin, yang menyerang sel-sel pencetus kanker dan mencegahnya menggandakan diri. Kandungannya yang lain adalah *Thioproline*. Jamur ini dapat menstimulir produksi interferon di dalam tubuh. Ekstrak jamur sukses diuji di Jepang sebagai pelengkap Chemotherapy.

METODE PENELITIAN

Prosedur penelitian

Ekstrak jamur tiram putih

Penelitian ini terdiri atas beberapa tahap, yaitu persiapan sampel (pengumpulan bahan baku, sortasi basah, pencucian, perajangan). Pengumpulan bahan baku. Bahan baku Jamur tiram putih diperoleh dari petani Kemitraan jamur tiram putih Bogor. Sortasi basah. Memisahkan kotoran atau bahan-bahan asing lainnya dari tanaman jamur tiram putih. Pencucian. Menghilangkan tanah yang masih menempel pada sampel yang sudah disortasi basah. Perajangan. Mempermudah proses pengeringan dan penggilingan. Penggilingan. Sampel segar digiling untuk mendapatkan bentuk ekstrak kental.

Metode ini berdasarkan pada penelitian Doughari (2006). Sampel yang sudah digiling, kemudian ditimbang sebanyak ± 100 g. Setelah itu, sampel diekstraksi secara maserasi dengan etanol 70%, lalu disaring dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* sampai diperoleh residu kering (ekstrak etanol). Ekstrak ditimbang dan dihitung rendemennya dengan persamaan sebagai berikut.

Rendemen ekstrak = $\frac{a}{b} \times 100\% \times fkb$

Keterangan:

a = bobot ekstrak (g)

b = bobot contoh awal (g)

fk = faktor koreksi = (1-kadar air)

Ekstrak jamur tiram putih dihasilkan melalui ekstraksi yang dilakukan dengan menggunakan metode maserasi, dengan prosedur sebagai berikut :

1. Jamur tiram putih segar ditimbang, kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender.
2. Selanjutnya akuades disiapkan untuk perendaman perbandingan selama 24 jam.
3. Disaring menggunakan kertas saring Whatman no.40 dan ditampung dalam sebuah wadah kemudian di uapkan menggunakan Rotary Evaporator dengan suhu 40°C sehingga yang tersisa adalah ekstrak jamur berupa gel.

Uji Fitokimia

Ekstrak yang telah diperoleh kemudian dilakukan uji kualitatif kandungan senyawa (uji fitokimia), seperti alkaloid, flavonoid, saponin, steroid, triterpenoid, tanin, dan β -glucandengan menggunakan metode Harborne (1987).

Uji Alkaloid.

Sebanyak 1 g ekstrak dilarutkan dalam 10 ml kloroform dan 4 tetes NH_4OH , kemudian disaring dan filtratnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi bertutup. Ekstrak kloroform dalam tabung reaksi dikocok dengan 6 ml H_2SO_4 2 M dan lapisan asamnya dipisahkan ke dalam tabung reaksi yang lain. Lapisan asam ini diteteskan pada lempeng (spot) tetes dan ditambahkan pereaksi Mayer, Wagner, dan Dragendorf yang akan menimbulkan endapan warna berturut-turut putih, coklat, dan hijau kekuningkuningan.

Uji Toksisitas terhadap ikan kerapu bebek

Uji toksisitas dengan menentukan nilai konsentrasi dilakukan untuk menentukan konsentrasi ambang untuk pengujian *in vitro*. Uji toksisitas ekstrak dilakukan dengan menggunakan benih ikan kerapu bebek ukuran 11-12cm sebanyak 5 ekor per wadah dimasukkan ke dalam toples yang berisi air laut yang sudah disterilkan dan dilengkapi aerator. Dan pengenceran bertingkat (1:1, 1:2, 1:3) sehingga dosis akhir ekstrak menjadi 0, 50 μl , 100 μl , 200 μl , 300 μl , 400 μl diamati selama 24 jam, jumlah hewan uji yang mati dihitung.

Cara Menentukan Konsentrasi Bakteri Uji

1. Biakan murni bakteri *V.alginolyticus* dari TSA ditumbuhkan dalam media Nutrien Broth (NB), biakan bakteri dari NB juga ditumbuhkan pada media TCBS agar dalam cawan petri.
2. Setelah di inkubasi dalam suhu 27°C selama 48 jam dilakukan perhitungan jumlah sel bakteri pada media TCBS agar, dengan menggunakan metode TPC (Perhitungan Jumlah Cawan) untuk mengetahui jumlah bakteri pada NB.
3. Jumlah bakteri per 1 ml sampel NB dapat diperoleh dengan membagi jumlah koloni terhitung percawan dengan volume sampel yang diinokulasikan dibagi dengan pengenceran dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$N = T/Q \times 1/V \times 1/S \text{ (cfu/ml)}$$

Dimana : N = Jumlah bakteri (cfu/ml)
T = Total koloni bakteri pada semua cawan dengan tingkat pengenceran yang sama (cfu)
Q = Jumlah cawan
V = Volume sampel yang diinokulasi (ml)
S = Tingkat pengenceran

Sedangkan untuk mengetahui jumlah bakteri pada wadah pemeliharaan (bakteri penantang) dapat dihitung dengan menggunakan rumus pengenceran sebagai berikut :

$$N1 \times V1 = N2 \times V2$$

Dimana :

N1 = Jumlah bakteri dalam NB (cfu/ml)
N2 = Jumlah bakteri yang ada dalam wadah penelitian (cfu/ml)
V1 = Volume NB yang digunakan (ml)
V2 = Volume air dalam wadah penelitian

Hewan uji dan Pemberian Immunostimulan



Ikan yang digunakan adalah ikan Kerapu Bebek dengan ukuran \pm 11 - 12 cm yang ambil dari BBAP Takalar dan dipelihara dalam akuarium ukuran 30 x 30 x 30 dengan kepadatan 10 ekor/bak. Aklimatisasi dilakukan selama 1 minggu dan penggantian/penambahan air sebanyak 10-25% total volume.

- (A) : Kontrol/larutan fisiologis
- (B) : 100 μ l/ekor,
- (C) : 200 μ l / ekor, dan
- (D) : 300 μ l /ekor.

Penyuntikan imunostimulan β -glucan dari ekstrak dinding jamur tiram putih, dengan konsentrasi larutan 2:1 (Ekstrak jamur tiram putih dan aquadest/miliQ), penyuntikan ikan uji menggunakan syring berukuran 1 ml dilakukan secara intramuscular. Masa pemeliharaan setelah pemberian imunostimulan 96 jam dengan pengacakan unit-unit percobaan.

Uji Tantang

Untuk melihat ketahanan terhadap bakteri setelah pemberian imunostimulan ekstrak jamur tiram putih selama 96 jam dilakukan uji tantang terhadap *Vibrio alginolyticus* juga 96 jam dengan kontak langsung antar individu dan ikan uji. Adapun prosedurnya adalah sebagai berikut :

- a. Ujiantang dengan *Vibrio alginolyticus* dilakukan setelah pemeliharaan ikan selama 96 jam (± 4 hari);
- b. Ikan yang akan diujiantang dipelihara di hatchery mini Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin masing-masing sebanyak 10 ekor ikan tiap ulangan;
- c. Selanjutnya ikan dimasukkan ke dalam akuarium dan dilakukan penginfeksi dengan *Vibrio alginolyticus* melalui pemaparan.
- d. Setelah pemaparan dengan *Vibrio alginolyticus* dilakukan pemeliharaan ikan suhu dibawah 30°C (suhu optimum untuk perkembangbiakan *Vibrio alginolyticus*) selama 96 jam.
- e. Selama pemeliharaan ikan di akuarium dilakukan pengamatan tingkah laku ikan dan gejala klinis, penghitungan parameter darah setelah ujiantang, dan RPS (*Relative Percent Survival*);

Uji Aktifitas Fagositosis

Setelah melakukan pengukuran hematokrit dan leukosit, kapiler hematokrit kemudian dipotong pada batas antara eritrosit dan leukosit. Bagian leukosit ditampung pada tabung evendorff. Leukosit sebanyak 100 μl dimasukkan pada microplate well, kemudian ditambah dengan *Vibrio alginolyticus* (kepadatan 10^5 sel/ml) dengan volume yang sama. Leukosit dengan *Vibrio alginolyticus* dicampur dengan cara pipeting, kemudian diinkubasi selama 20 menit. Selanjutnya 5 μl sampel dari mikroplate well diletakkan diatas obyek glas dan dibuat preparat ulas dan diamkan hingga kering angin. Fiksasi dengan ethanol/methanol absolut selama 5 menit dan dikeringanginkan. Kemudian diwarnai dengan safranin (0,15%) atau Giemsa (7%) selama 10 menit dan diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000 X. Aktifitas fagositosis dinyatakan dengan jumlah sel yang memfagosit bakteri / 100 sel fagosit yang diamati dikali 100% (Wagner dan Jurcic, *Dalam* Wulansari (2009).

Preparat hapus dari masing-masing pertakuan diamati dibawah mikroskop dan dihitung aktivitas fagositosis (SFA) yaitu, jumlah sel yang aktif memfagosit se! bakteri dalam 100 sel fagositosis yang dinyatakan dalam persen (Wagner dan Jurcic, *Dalam* Wulansari (2009).

$$\text{Aktifitas fagositosis} = \frac{\text{Jumlah sel yang memfagosit}}{\text{Jumlah sel keseluruhan}} \times 100\%$$

HASIL PENELITIAN

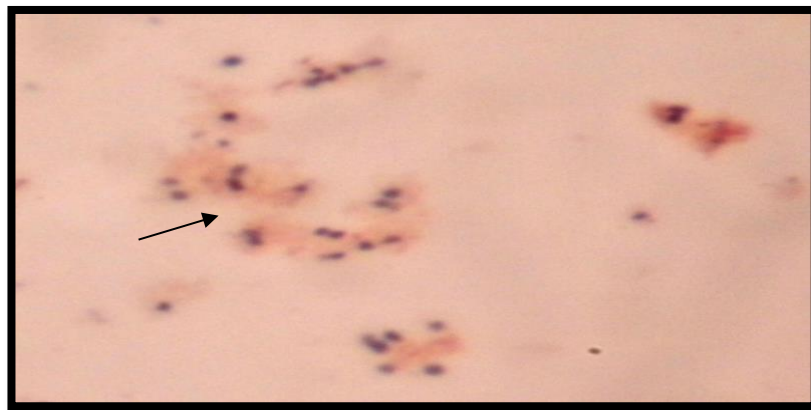
Pengaruh Imunostimulan Terhadap Aktivitas fagositosis Ikan Kerapu Bebek

Tabel 1. Rata-rata nilai sel fagositosis dengan pemberian β -glucan yang di ekstrak dari jamur tiram putih

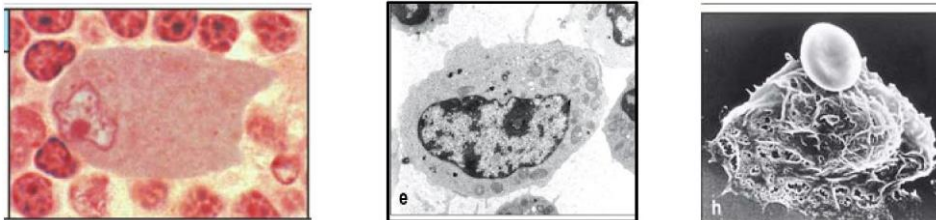
No	Perlakuan	Nilai rata-rata (%)
1.	A (0 μl)	$11,268 \pm 0,114$
2.	B (100 μl)	$94,737 \pm 0,505$

3.	C (200 µl)	59,884 ± 0,329
4.	D (300 µl)	31,9249 ± 0,071

Macrophage dibentuk di sumsum tulang dari sel induk mieloid. Sel ini berada dalam sirkulasi darah dalam bentuk monosit, kemudian akan meninggalkan sirkulasi, menjadi matang dan menetap di jaringan pengikat sebagai *macrophage*. *Macrophage* yang berada di dalam jaringan sering disebut sebagai sel *kupffer* pada *hepar*, sel debu pada *pulmo*, osteoklas pada tulang, dan lain-lain. *Macrophage* mempunyai masa hidup yang lebih lama daripada sel fagosit granulositik dan tetap dapat bekerja pada pH yang rendah. *Macrophage* yang melakukan fagositosis seperti terlihat pada Gambar 9 dibawah ini.



Gambar 2. *Macrophage* yang terfagosit (Pembesaran 1000x)



Gambar 3. Sel Makrofag dilihat dengan mikroskop cahaya (A), mikroskop elektron (B) dan *scanning electron microscop* (C)

Macrophage dapat mengenali adanya patogen karena adanya reseptor permukaan yang dapat membedakan antara patogen dan sel inang. Reseptor permukaan yang dapat ditemukan pada sel *macrophage* yaitu:

- a. *scavenger receptors*, yang dapat mengikat *lipoteichoic acids* yang merupakan komponen dinding bakteri Gram-positif.
- b. *mannose receptors* dan *glucan receptors* yang dapat berikatan dengan komponen karbohidrat dari bakteri.
- c. CD14 yang dapat mengikat lipopolisakarida (LPS).

Toll-like receptors (TLRs) yang dapat mengenali komponen-komponen yang terdapat pada mikroorganisme. TLRs juga merupakan *signalling receptors* yang berperan dalam menginisiasi respon imun spesifik.

Ligasi antara patogen dan reseptor-reseptor tersebut akan diikuti proses fagositosis patogen. Fagositosis adalah suatu proses aktif, yang dimulai dengan *engulf* patogen oleh sel *macrophage*, kemudian patogen dimasukkan ke dalam phagosome (*endocytic vacuole*), mengalami reaksi oksidasi-reduksi sehingga derajat keasamannya meningkat.

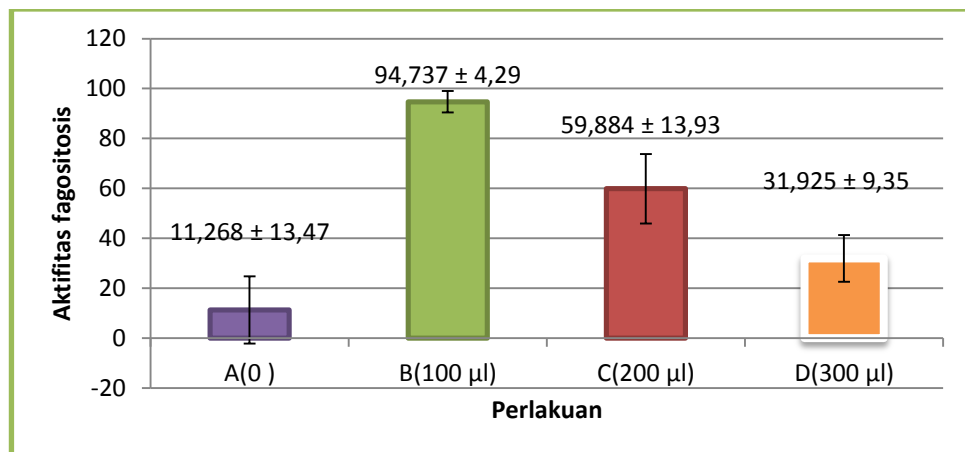
Selain *phagosome*, di dalam *macrophage* juga terdapat *lysosom* yang berisi lebih dari 50 macam enzim yang berfungsi untuk mencerna zat-zat yang masuk ke dalamnya. Enzim yang paling khas didalam *lysosom* yaitu *acid phosphatase*. *Macrophage* yang teraktivasi mempunyai jumlah *lysosom* yang meningkat dan menghasilkan serta melepaskan interleukin-1 yang sangat berperan dalam proses inflamasi. Selanjutnya *macrophage* akan mempresentasikan antigen kepada sel limfosit T, sebagai *Antigen Presenting Cells* dan ini merupakan awal respon imun spesifik.

Aktivitas fagositosis *macrophage* merupakan suatu fenomena yang kompleks dan dipengaruhi oleh *macrophage activating factor (MAF)*, akan merangsang transkripsi berbagai gen yang menyandi berbagai protein yang diperlukan untuk aktivasi *macrophage*. Jadi aktivitas fagositosis *macrophage* meningkat setelah pemberian imunostimulan ekstrak jamur tiram putih berarti bahan uji mengandung zat yang dapat berperan sebagai *macrophage activating factor*.

Jamur tiram putih mengandung suatu senyawa yang dapat meningkatkan aktivitas fagositosis *macrophage*, yang berarti juga dapat meningkatkan sistem imun seluler.

Berdasarkan penghitungan jumlah sel yang memfagosit maka didapatkan persentase jumlah sel yang memfagosit dari dua sumuran (duplo) dan dihitung rata-ratanya dapat dilihat data persentase sel *macrophage* yang aktif nampak adanya perbedaan nyata antara setiap kelompok yang diberi imunostimulan dengan kelompok kontrol negatif. Hasil yang paling tinggi didapatkan pada sel ikan kerapu bebek yang diberi dosis 100 μ l yaitu 94,737 % dapat meningkatkan aktivitas fagositosis *macrophage*.

Hal ini berarti bahwa pemaparan selama 96 jam efektif dalam meningkatkan persentase jumlah sel memfagosit. yang berarti mempunyai efek dalam meningkatkan aktivitas *macrophage*. Histogram rata-rata aktifitas fagositosis (Gambar 4).



Gambar 4. Histogram nilai rata-rata aktifitas fagositosis dengan pemberian β -glucan yang di ekstrak dari jamur tiram putih

Aktifitas fagositosis di ketahui dengan tehnik pewarnaan bakteri yang terfagosit dalam neutrofil. Dalam pewarnaan bakteri akan terwarnai antara sel yang aktif dan yang tidak aktif. Proses fagositosis terdiri dari dua fase yaitu pelekatan dan ingesti. Pelekatan bakteri/partikel melibatkan dua jenis reseptor membrane plasma neutrofil yaitu untuk reseptor untuk Fc dan C3b. Perlekatan tersebut dipermudah oleh opsonisasi yaitu penempelan opsonin pada bakteri (Ferencik, 1993).

Rendahnya kapasitas fagositosis neutrofil terhadap *Vibrio alginolyticus* dalam penelitian ini kemungkinan berhubungan dengan fatogenitas yang di miliki bakteri ini. Patogenitas/virulensi suatu mikroorganisme ditentukan oleh kelengkapan struktur antigenik suatu mikroorganisme; semakin virulen/pathogen, semakin resisten terhadap aktifitas pertahanan tubuh. Alfa toxin merupakan toxin yang dihasilkan oleh bakteri *Vibrio alginolyticus* yang dapat menyebabkan pembentukan agregat granulosit. Banyaknya granulosit (neutrofil) yang membentuk agregat akan menurunkan kapasitas neutrofil untuk memfagosit *V.alginolyticus* (Joklik *dkk.*,1992). Lebih lanjut Schneling *dkk.*, (1991) menyatakan bahwa alpha toxin akan menghambat pelekatan dan migrasi bakteri pada neutrofil. Aktifitas fagositosis membuktikan bahwa *V.alginolyticus* yang patogen maupun nonpatogen dapat di fagosit oleh neutrofil, namun, bakteri yang patogen difagosit dalam jumlah yang lebih sedikit dibandingkan bakteri nonpatogen. Struktur antigenik membrane *V.alginolyticus* yang mempengaruhi nilai aktifitas fagositosis adalah asam.

KESIMPULAN DAN SARAN

Pemberian β - glucan yang diekstrak dari dinding jamur tiram putih dapat meningkatkan aktivitas fagositosis dan dosis β - glucan yang paling efektif dapat meningkatkan respon imun ikan kerapu bebek terdapat pada perlakuan 100 μ l/ekor.

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, S. dan Sudaryanto. 2001. Pembenihan dan Pembesaran Kerapu Bebek. Penebar Swadaya. Jakarta. 103P
- Feliatra, Efendi, I, Suryadi, S. 2004. Solusi dan Identifikasi Bakteri Probiotik dari Ikan Kerapu Macan (*Ephinephelus fuscogatus*) dalam Upaya Efisiensi Pakan Ikan. Jurnal Natur Indonesia 6(2): 75-80 (2004)
- Ferencik, M. 1993. Handbook of Immunochestry. Champan and Hall. London. Glasgoww. New York. Tokyo. Melbourne. Madras. 519P.
- Joklik. W K, Willett HP, Amos DB, and Wilfert CM,. 1992. Zinsser microbiology. 20th Ed. Appleton and Lange. California: 23-38.
- Kordi. 2004. Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan. Bina Adiaksara. Jakarta
- Mudjiutami, E., Ciptoroso, Z. Zainun, Sumarjo, Rahmat 2007. Pemanfaatan Imunostimulan untuk Pengendalian Penyakit Pada Ikan Mas. Jurnal Budidaya Air Tawar Volume 4 No. 1 Mei 2007
- Schneling DJ, Gemmell CG, Craddock PR, Quie PG, and Peterson PK, 1991. Effect of staphylococcal α -toxin on Neutrophil Migration and Adhesiveness. Journal of Inflammation. 5: 313-318.
- Tontowi, A., Kusmiati, Nuswantara, S. 2007. Produksi β -Glukan *Saccharomyces cerevisiae* dalam Media dengan Sumber Nitrogen Berbeda pada Air-Lift Fermentor. Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong-Bogor. Volume 8, Nomor 4 Oktober 2007. 253-256P.
- Utojo, Tonnek, Suharyanto S dan Marsam A. 1999. Studi bioekologi ikan kerapu di perairan pantai barat Sulawesi Selatan. Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia. Volume V No. I : 31-37.
- Ortuno, J., Cuesta, A., Esteban M. A dan Meseguer. J. 2002. Oral Administration Of Yeast, *Saccharomyces cereviceae*, Enhances The Cellular Innate Immun Response Of Gilthead Seabream (*Sparus Aurata* L). Veterinary Immunology and Immunopathology 85, 41-50.

- Ooi, V. E. C. and F. Liu, 2000, Immunomodulation and Anti-Cancer Activity of Polysaccharide-Protein Complexes, *Current Medicinal Chemistry*,
- Wajizah, S. 2004. Perspektif Minyak Ikan Sebagai Imunonutrisi. Makalah .Pengantar ke Falsafah Sains (PPS-702) Sekolah Pasca Sarjana/Program S3. Institut Pertanian Bogor.
- Widodo, N., 2007. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Alkoloid yang terkandung dalam Jamur Tiram Putih. Tugas Akhir. Universitas Negeri Semarang.
- Williams SE, 1990. Relationship between intracellular survival in macrophages and pathogenicity of streptococcus suis type 2 isolates. *Journal of Microbia 1 Pathogenesis*. 8:189.196
- Wulansari et all,. 2009. Pengaruh Ekstrak Air dan Ethanol *Alpinia* spp terhadap aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Sel Macrophage yang Diinduksi dari Bakteri *Stapilococcusepidermis* Secara In Vitro. Pusat penelitian Biologi LIPI. Bogor.
- Wu D, Meydani SN. 1999. Antioxidant and Immune Function. Diet, Nutrition, and Health. Edited by Papas A M. CRC Press Boca Roton, London, New York, Washington DC.
- Yap, A.T., S. K. Chandramohan, M. L. N. Mary, 2004, Partially Purified Lentinam from Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes*) still Retain Antitumour Activity
- Yuwono, T. 2008. *Biologi Molekular*. Jakarta: Erlangga.