

IMUNOSTIMULASI PADA HEWAN AKUATIK

Immunostimulan on Aquatic Organisms

M. Alifuddin

*Jurusan Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680, Indonesia*

PENDAHULUAN

Pengembangan perikanan budidaya di Indonesia berlangsung demikian pesatnya melalui ekstensifikasi dan intensifikasi. Kondisi ini tentunya akan memperbesar peluang berjangkitnya wabah penyakit ikan yang menimbulkan kerugian ekonomis. Rijkers (1981) menyebutkan, bahwa patogen selalu ada dalam media hidup ikan. Karenanya masalah penyakit infeksi sewaktu-waktu dapat timbul dalam kegiatan perikanan budidaya dan bahkan pada ikan-ikan di perairan umum.

Di Indonesia, pernah terjadi beberapa wabah penyakit yang mengakibatkan kerugian ekonomi yang tinggi; misalnya pada tahun 1980-an terjadi wabah penyakit bercak merah pada ikan budidaya air tawar, pada awal 1990-an penyakit MBV (monodon baculovirus) mewabah di pertambakan udang windu. Bahkan, hingga saat ini penyakit *white spote* masih merupakan kendala yang belum dapat diatasi dalam proses produksi udang windu (*Penaeus monodon*) baik di pembenihan maupun di tambak pembesaran.

Pengendalian perluasan penyakit harus dilakukan sedini mungkin, agar tidak terjadi wabah penyakit yang menyebabkan kerugian ekonomi. Upaya pengendalian dapat dilakukan dengan pemakaian bahan kimia, namun pemakaiannya untuk jangka panjang dapat menimbulkan dampak negatif. Dampak ini bukan saja terhadap lingkungan perairan dan patogen-patogen yang menjadi resistensi, bahkan terhadap kesehatan konsumen dan antara lain berupa adanya residu antibiotik.

Untuk menghindari hal itu, pengembangan ketahanan tubuh perlu dilakukan dengan imunostimulasi (imunisasi—vaksinasi) dan pemakaian imunostimulan yang ramah lingkungan. Secara laboratoris dan pada aplikasi lapangan terbatas, imunostimulasi dapat meningkatkan sintasan hidup ikan budidaya (Gina 1997; Alifuddin 1999; Alifuddin *et al.* 2001a, 2001b). Tulisan ini mengulas secara singkat imunostimulasi pada hewan akuatik, ikan dan udang, antara lain mengenai dasar imunostimulasi, preparasi vaksin konvensional dan imunostimulan.

DASAR IMUNOSTIMULASI

Mori (1990) mengemukakan, bahwa respon imunitas pada hewan merupakan upaya proteksi

terhadap infeksi maupun preservasi fisiologik – homeostasi. Respon imunitas hewan akuatik terdiri dari respon non spesifik dan spesifik baik pada ikan (Corbel 1975) maupun pada udang (Itami 1994; Bechère 2000). Karenanya, memori, spesifitas dan pengenalan zat asing merupakan dasar mekanisme respon imunitas baik pada ikan maupun udang.

Udang

Respon imunitas dibentuk oleh jaringan limfoid. Pada udang, jaringan limfoid menyatu dengan jaringan mieloid, sehingga dikenal sebagai jaringan limfomioid (Corbel 1975; Itami 1994). Produk jaringan limfomioid adalah sel-sel darah dan respon imunitas baik seluler maupun humoral.

Pada udang, organ limfoidnya disebut sebagai *organ oka*, yang mirip dengan sel dentritik retikulum pada folikel mamalia (Itami 1994). *Organ oka* ini terdiri dari 2 lobus, terletak di dorso-anterior hepatopankreas dan ventro-lateral lambung anterior dan posterior; secara histologis, anastomosa tubul organ limfoid mengandung massa basofilik (Bell dan Lightner 1988).

Maynard (1960) menyatakan, bahwa sel hemosit yang identik dengan leukosit vertebrata adalah granulosit dan hialosit. Granula sekretori pada hemosit mengandung phenoloksidase (PO), prophenoloksidase (proPO) dan serin protease yang berperan dalam respon humoral.

Struktur eksoskeleton dan hambatan kimiawi merupakan bagian dari sistem ketahanan non spesifik udang. Respon non spesifik yang merupakan ketahanan seluler udang dilakukan oleh sel-sel hemosit bergranula (Johansson dan Soederhall 1989; Mori 1990; Itami 1994), yang dilakukan melalui fagositosis. Fagositosis merupakan aktivitas primer respon imun udang terhadap benda asing (Alvarez dan Friedl 1990; Hirsch dan Hunte 1990).

Albores *et al.* (1998) mengemukakan, bahwa komponen mikrobial dapat mengaktifasi respon pertahanan seluler, dalam hal ini mengaktifasi fagositosis, melanisasi, enkapsulasi, nodulasi dan koagulasi. Oponin akan meningkatkan kemampuan fagosit sel hemosit (McKay dan Jenkin 1970; Johansson dan Soederhall 1985; Itami 1994). Aktivitas ini dapat distimulir oleh β 1,3-glukan dan lipopolisakarida (LPS)

(Johansson dan Soederhall 1989; Itami 1994; Johansson dan Soederhall 1985).

Respon humoral pada udang dimungkinkan oleh adanya multivalen sugar *binding agglutinin*, disebut sebagai lektin atau hemagglutinin dan monovalen sugar *binding residue*, disebut beta glukon *binding protein* (BGBP). Selain itu, monomer glikoprotein merupakan faktor humoral yang berperan dalam respon humoral. Molekul ini dengan berat molekul 76 kDA dan titik isoelektriknya sebesar 7,2 berperan sebagai faktor pelekat sel hemosit pada permukaan benda asing dan berkaitan dengan sistem proPO, enkapsulasi. Secara *in vitro* sistem memacu proses degranulasi dengan menghambat sintesis protein dan agregasi sel hemosit.

Ikan

Seperti halnya dengan udang, jaringan limfoid ikan menyatu dengan jaringan mieloid disebut sebagai jaringan limfomioid (Corbel 1975; Walczak 1985). Pada ikan teleost jaringan limfomioidnya adalah limfa, timus dan ginjal depan (Rijkers 1981; Anderson 1974; Fänge 1982). Berbeda dengan udang, pada ikan terdapat populasi sel B dan sel T. Sel-sel ini sangat berperan dalam respon imunitas baik seluler maupun humoral.

Respon dan faktor humoral antara lain antibodi, transferin, interferon, protein C-reaktif; respon dan faktor seluler seperti sel makrofag, sel killer (Kaige *et al.* 1990), neutrofil (Fletcher 1986), reaksi penolakan allograft dan hipersensitivitas (Rijkers 1982). Selain itu, barier mekanik dan kimiawi permukaan seperti kulit, sisik dan mukus pada permukaan tubuh dan insang juga merupakan alat pertahanan tubuh ikan yang bersifat non spesifik (Anderson 1974).

Respon humoral merupakan respon yang bersifat spesifik dilakukan oleh suatu substansi yang dikenal sebagai antibodi atau imunoglobulin, sedangkan respon seluler ikan bersifat non spesifik dilakukan oleh "cell mediated immunity" (Anderson 1974; Walczak 1985). Komunikator dan amplikator dalam fungsi dan mekanisme pertahanan humoral dan seluler ikan dilakukan oleh limfokin (Anderson *et al.* 1984), interleukin, interferon dan sitokin (Anderson 1992).

IMUNOSTIMULASI

a. Vaksinasi

Vaksinasi merupakan suatu upaya untuk menimbulkan ketahanan tubuh yang bersifat spesifik melalui pemberian vaksin. Secara umum aktivitas ini dikenal sebagai imunisasi aktif dan pasif. Imunisasi pasif diperoleh dengan pemberian serum kebal maupun dengan cara diturunkan oleh induk ikan yang dikenal sebagai imunitas maternal; sedangkan imunisasi aktif

dilakukan melalui tindak vaksinasi. Induk-induk ikan yang divaksinasi dapat menurunkan respon imunitas tersebut pada turunannya. Ellis (1988) telah menguraikan tentang vaksinasi terutama untuk ikan.

Ikan akan merespon imunostimulasi—vaksinasi dengan mensintesis antibodi, dikenal sebagai imunoglobulin (Corbel 1975). Karena itu, antibodi hanya akan bereaksi terhadap agen penginduksinya dan berfungsi sebagai aglutinin, presipitin, opsonin dan antitoksin. Imunoglobulin ikan dapat ditemukan dalam plasma darah, mukus dan cairan tubuh.

Tujuan dan Manfaat Vaksinasi

Tujuan spesifik vaksinasi adalah untuk memperoleh ketahanan terhadap suatu infeksi tertentu, sehingga diperoleh sintasan hidup yang tinggi akibat proteksi imunologik tersebut. Secara umum, manfaat vaksinasi antara lain dalam hal: peningkatan daya tahan ikan, pencegahan efek samping kemoterapeutika, proteksi terhadap serangan penyakit infeksi tertentu, keamanan lingkungan budidaya dari pencemaran bahan kemoterapeutik dan keamanan konsumen dari residu antibiotik.

Jenis dan Sifat Vaksin

Secara umum terdapat 2 jenis vaksin yakni vaksin konvensional dan vaksin moderen. Penjenisan ini semata-mata didasarkan atas teknologi produksi vaksin yang digunakan. Produk vaksin dengan teknologi tinggi (*hi-tech*) dikenal sebagai vaksin moderen; sedangkan vaksin konvensional diproduksi dengan teknologi sederhana.

Vaksin konvensional dibedakan atas vaksin mati dan vaksin hidup. Vaksin mati berasal dari patogen yang dimatikan, ekstrak atau bagian-bagian tertentu dari patogen; sedang vaksin hidup berasal dari patogen yang dilemahkan atau diatenuasi. Vaksin yang termasuk kelompok vaksin moderen atau vaksin biotek adalah vaksin rekombinan, vaksin monoklonal, *protein engineering vaccine* dan *genetic attenuation vaccine*.

Untuk mencapai sasaran vaksinasi yakni sintasan hidup yang tinggi, maka vaksin harus bersifat antara lain antigenik, imunogenik dan protektif. Sifat-sifat ini menunjukkan, bahwa vaksin yang diberikan harus memacu terbentuknya antibodi yang menyebabkan ikan tahan (imun) terhadap patogen tersebut. Disamping itu, vaksin harus aman dan tidak boleh menimbulkan tanda-tanda sakit yang secara spesifik diakibatkan oleh patogen tersebut.

Dosis dan Cara Imunisasi (Vaksinasi)

Sebagai suatu upaya pencegahan penyakit, maka imunisasi biota budidaya harus dilakukan dan merupakan tahap dalam proses produksi. Imunisasi dengan vaksin dapat diaplikasikan melalui perendaman, per oral (bersama dengan pakan) dan injeksi. Pemilihan

cara aplikasi ini terutama didasarkan atas ukuran ikan. Sangat dianjurkan untuk melakukan vaksinasi pada fase larva, 1-2 minggu setelah menetas. Umumnya dosis vaksin yang diberikan sebesar 10^5 - 10^6 sel/ml. Vaksinasi ini sebaiknya diulangi setelah 2-3 minggu dari pemberian pertama; dan dapat diulangi pada saat ikan berumur 2 bulan.

Beberapa kendala membatasi pengembangan dan penggunaan vaksin secara meluas pada perikanan budidaya. Kendala tersebut diantaranya adalah keragaman jenis dan saluran patogen ikan, kemampuan imunogenik patogen dan keterbatasan informasi tentang patogenesis dan epizootiologi penyakit ikan.

Preparasi Vaksin Konvensional

Sejauh ini, vaksin konvensional yang paling aman digunakan adalah vaksin mati; baik berasal dari patogen yang dimatikan, ekstrak maupun bagian dari patogen tersebut. Secara umum, preparasi vaksin bakteri dilakukan dengan perlakuan fisik dan kimiawi. Perlakuan fisik yang umum dipakai adalah pemanasan kultur patogen, sehingga dikenal *heat killed vaccine*; sedangkan perlakuan kimiawi adalah dengan formalin, sehingga dikenal "*formalin killed vaccine*" (Ellis 1985). Preparasi vaksin bakterial dengan pemanasan dapat dilakukan sebagai berikut; a) biakan murni bakteri dalam media cair umur 24 jam dipanaskan dalam penangas 100 °C selama 15-20 menit atau 60 °C selama 30-60 menit, b) biakan dipanen, kemudian dipusingkan dengan sentrifus 3500-5000 rpm, selama 15-20 menit; selanjutnya pisahkan pelet dan supernatannya; c) pelet vaksin dicuci dengan fosfat buffer saline (PBS) 3 kali, sehingga diperoleh pelet vaksin murni sebagai vaksin utuh (*whole cell vaccine*); supernatan sebagai hasil pemusangan pertama juga dapat digunakan sebagai vaksin yang dikenal sebagai vaksin supernatan.

Sebagai tindakan pengamanan sebelum digunakan perlu dilakukan uji viabilitas vaksin. Dalam hal ini, dilakukan dengan membiakkan vaksin yang telah dibuat tersebut dalam media kultur padat. Vaksin aman digunakan apabila pada media kultur tersebut tidak terjadi pertumbuhan bakteri. Sifat protektif vaksin diketahui dengan melakukan uji tantangan pada biota yang diberi vaksin.

Preparasi vaksin bakterial dengan perlakuan kimiawi (biasanya dengan formalin) dilakukan sebagai berikut; 1) biakan murni bakteri dalam media cair umur 24 jam dimatikan dengan formalin 0,5% selama 24 jam; 2) biakan dipanen, kemudian dipusingkan dengan sentrifus 3500-5000 rpm, selama 15 menit; selanjutnya pelet dan supernatannya dipisahkan; 3) pelet vaksin dicuci dengan PBS 3 kali, sehingga diperoleh pelet vaksin murni sebagai vaksin utuh (*whole cell vaccine*).

Uji viabilitas dan keamanan vaksin perlu dilakukan. Pada prosedur pengujian ini seperti pada

heat killed vaccine, dan disamping itu vaksin tidak boleh mengandung formalin.

Pengukuran Efektivitas Vaksin

Efektivitas vaksin dapat diketahui setelah vaksinasi dilakukan. Secara laboratoris, proteksi imunologis suatu vaksin diketahui dengan ujiantang. Efektivitas suatu vaksin dapat ditentukan antara lain berdasarkan sintasan hidup yang diperoleh dan titer antibodi sebagai berikut;

1. Tingkat Kelulusan Hidup Relatif (Relative Percent Survival, RPS).

RPS ini didasarkan atas kematian ikan yang terjadi setelah ujiantang. Ujiantang diberikan 1-2 minggu setelah vaksinasi; ujiantang ini diberikan secara perendaman dengan dosis LC_{50} . Kematian diamati setiap hari selama 15 hari. RPS ini ditentukan berdasarkan formula, $RPS = 1 - (v/k) \times 100\%$, dengan v adalah mortalitas ikan yang divaksin (%) dan k adalah mortalitas ikan kontrol (%). Secara umum, efektivitas vaksin dianggap baik, apabila nilai $RPS \geq 50\%$.

2. Tingkat Titer Antibodi

Pengukuran efektivitas vaksin juga dapat dilakukan dengan pengukuran titer antibodi. Dalam hal ini, dilihat besarnya titer antibodi yang terbentuk, dan biasanya dilakukan melalui uji aglutinasi secara *in vitro*. Uji ini dilakukan melalui pengenceran seri serum atau plasma darah pada sumur-sumur mikroplat, kemudian direaksikan dengan antigen dalam jumlah sama banyak. Titer antibodi dinyatakan pada pengenceran tertinggi yang setelah pengenceran itu tidak terjadi aglutinasi.

Dengan titer antibodi yang tinggi diharapkan dapat memberikan proteksi yang tinggi pula. Selain itu dengan pengukuran titer ini juga dapat diketahui lama proteksi imunologik yang terjadi.

Peningkatan Efikasi Vaksin

Peningkatan efikasi vaksin dapat dilakukan dengan melakukan vaksinasi ulang (*booster*). Hal ini dilaksanakan selang 1-2 minggu dari vaksinasi pertama. Aplikasi vaksinasi kedua dapat dilakukan dengan cara yang sama atau berbeda dengan cara pada vaksinasi pertama.

Disamping dengan pengulangan vaksinasi, juga dapat dilakukan dengan menggunakan adjuvant seperti Freud kompleks adjuvant (FCA), kalium aluminium sulfat, dimetil sulfoxida (DMSO), muramil peptida (MDP), levamisol, ete (ekstrak ectainas-cidia turbinata). Vaksin ini dikenal sebagai vaksin beradjuvant. Selain dengan adjuvant, efikasi vaksin dapat ditingkatkan dengan pemakaian vitamin C, vitamin E dan imunostimulan. Hal ini dapat dilakukan sebelum, bersama atau sesudah vaksinasi dilakukan.

Faktor-faktor yang Mempengaruhi Vaksinasi

Vaksinasi yang merupakan tindakan memasukkan antigen ke dalam tubuh akan memacu terbentuknya ketahanan spesifik. Proses pembentukan respon ini dipengaruhi oleh faktor kualitas vaksin, ikan dan lingkungan media budidaya. Kualitas vaksin dipengaruhi oleh keasingan struktur molekuler vaksin, mudah dikenali oleh limfosit dan kekuatannya berikatan dengan antibodi. Faktor ikan meliputi antara lain, umur, jenis dan kondisi fisiologis. Salah satu faktor lingkungan budidaya yang sangat berpengaruh terhadap vaksinasi adalah suhu. Suhu media budidaya harus optimal bagi proses pembentukan respon imunitas spesifik. Respon spesifik yang terbentuk yakni ini respon yang sangat bergantung kepada suhu (*temperature dependent*). Karena itu, suhu media budidaya harus diatur sedemikian rupa berkisar 20-25 °C, agar respon spesifik dapat terbentuk optimum dalam waktu 1-2 minggu.

Faktor lainnya yang harus diperhatikan dalam vaksinasi adalah jenis adjuvant. Penggunaan adjuvant yang tidak sesuai dapat menimbulkan efek samping seperti timbulnya abses, granulomata lokal, dan autoimun. Selain hal tersebut, kualitas pakan yang diberikan dan padat penebaran tinggi juga akan berpengaruh terhadap vaksinasi. Kesemuanya ini dapat menghambat pembentukan respon imunitas.

b. Imunostimulasi dengan Imunostimulan

Imunostimulan merupakan senyawa kimia, obat atau bahan lainnya yang mampu meningkatkan mekanisme respon imunitas ikan (Anderson 1992), baik seluler maupun humoral (Alifuddin 1999). Galleotti (1998) dan Anderson (1992) telah mengungkap jenis, berbagai aspek dan aplikasi imunostimulan berkaitan dengan budidaya perikanan.

Lipopolisakarida (LPS) merupakan salah satu imunostimulan yang digunakan untuk stimulasi sel B. Kajita *et al.* (1990) telah mengevaluasi efek levamisole terhadap peningkatan aktivitas fagositik ikan rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). Anderson & Rumsey (1995) mengemukakan, bahwa *Candida utilis* dan *Saccharomyces cerevisiae* dapat meningkatkan produksi radikal oksidatif, aktivitas fagositik, produksi mieloperoksidase dan imunoglobulin plasma ikan rainbow trout.

Berbeda dengan vaksin, imunostimulan tidak direspon ikan dengan mensintesis antibodi, melainkan peningkatan aktivitas dan reaktivitas sel pertahanan seluler ataupun humoral. Secara *in vitro* peningkatan respon seluler ditunjukkan oleh aktivitas fagositik yang diukur melalui uji nitro blue tetrazolium (NBT) (Anderson dan Siwicki 1993). Peningkatan ini didasarkan atas kemampuan imunostimulan menginduksi berlangsungnya transformasi limfoblastik yang ditunjukkan dengan memakai isotop tritium (H^3) (Alifuddin 1989). Aktivitas fagositik ini merupakan

manifestasi peningkatan respon seluler dan pada akhirnya akan meningkatkan respon humoral.

Imunotimulan yang sering dipakai untuk imunostimulasi adalah LPS (lipopolisakarida), dan β 1,3 glukukan yang diperoleh dari *Saccharaomyces cerevisiae*, dan Levamisol. Beberapa vitamin seperti vitamin A, B dan vitamin C juga dapat digunakan sebagai imunostimulan (Sohne *et al.* 2000; Galeotti 1998).

Seperti halnya dengan vaksin, imunostimulan dapat diberikan melalui injeksi, bersama pakan (per oral) dan perendaman (Anderson 1992). Dosis imunostimulan yang digunakan sebesar 100-200 ppm. Imunostimulan ini dapat diberikan secara terus menerus selama 1 minggu kepada larva ikan ketika masih dalam hapa pendederan; kemudian dihentikan pemberiannya, diberikan kembali pada minggu ke 3 selama satu minggu. Karena itu, pada tahap awal, imunostimulan diberikan melalui perendaman, dan pada pemberian selanjutnya dapat diberikan bersama pakan. Pemilihan cara aplikasi imunostimulan didasarkan atas kepraktisan dan efisiensi dalam kegiatan budidaya.

Mengingat keragaman patogen yang ada dalam media budidaya ikan, imunostimulan merupakan alternatif upaya pengendalian penyakit infeksi yang harus dilakukan bersama dengan vakinas. Pemanfaatannya dalam kegiatan budidaya dapat mengoptimalkan produksi budidaya melalui peningkatan ketahanan tubuh ikan atau udang windu terhadap penyakit infeksi (Pujiharto 1998; Alifuddin 1999; Bagni *et al.* 2000; Sohne *et al.* 2000).

DAFTAR PUSTAKA

- Albores, F.V., J.H. Lopez, T.G. Galvan, K.M. Perez, F.J. Vegas & G.Y. Placencia. 1998. Activation of shrimp cellular defence function by microbial products, p: 161-166. In Flagel, T.W. (ed.), *Advances in Shrimps Biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok
- Alifuddin, M. 1989. Etude de l'activite cytotoxique naturelle et la transformation lymphoblastique chez la carpe miroir (*Cyprinus carpio*) sous l'influence de Mn^{2+} , Prothymosine, Arg. vassopresin et de PHA. Rapport de Stage. Lab. de Physiologie Animale. Fac. de Sciences Univ. de Limoges. 32 pp.
- Alifuddin, M. 1999. Peran Imunostimulan (Lipopolisakarida, *Saccharomyces cerevisiae* and Levamisol) terhadap Peningkatan Respons Imunitas Ikan Jambal Siam (*Pangasius hypophthalmus*). Tesis. Program Studi Ilmu

- Perairan. Program Pascasarjana IPB, Bogor. 50 hal.
- Alifuddin, M., Waryat, A. Putra, D. Setyani & Soewidah. 2001a. Uji Adaptasi Usaha Penanggulangan Penyakit pada Budidaya Ikan Hias di DKI Jakarta.. Laporan Akhir Penelitian Kerjasama LP-IPB dengan BPTP/PAATP Wilayah DKI Jakarta. 26 hal.
- Alifuddin, M., N.B.P. Utomo & A.O. Sudradjat. 2001b. Pengembangan Imunostimulan untuk Meningkatkan Produksi Budidaya Udang Windu (*Penaeus monodon* Fab.) di Tambak. Laporan Kemajuan Tahun I. RUK. LP-IPB dan BPPT, Jakarta. 25 hal.
- Alvarez, M.R. & F.E. Friedl. 1990. Factors affecting *in vitro* phagocytosis by hemocytes of the American oyster. Proceeding of the Third International Colloquium on Pathology in Marine Aquaculture. 2-6 October 1988. Virginia, USA.
- Anderson, D.P. 1974. Immunology of fish diseases. *In* S.F. Snieszko & H.R. Axelrod (eds.). Book 4. Diseases of Fishes. T.F.H. Publication. Neptune, N.J.
- Anderson, D.P. 1992. Immunostimulant, adjuvant and vaccine carrier in fish: Applications to aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases*, 21: 281-307.
- Anderson, D.P. & A.K. Siwicki. 1993. Basic Hematology and Serology for Fish Health Programs. Asian Fisheries Society. 17 hal.
- Anderson, D.P. & G.L. Rumsey. 1995. Injection or immersion delivery of selected immunostimulants to trout demonstrate enhancement of non specific defence mechanisms and protective immunity, p: 413-426. *In* M. Sharif, J.R. Arthur & R.P. Subangsihe (Eds.), Diseases in Asian Aquaculture II. Proceeding of Second Symposium on Diseases in Asian Aquaculture. 25-29th October 1993. FHS-AFS.
- Anderson, D.P., W.B. van Muiswinkel & B.S. Roberson. 1984. Effects of chemically induced immune modulation on infectious diseases of fish, p: 187-211. *In* M. Kende, J. Gainer & M. Chirigos (Eds.), Chemical Regulation of Immunity in Veterinary Medicine. Alan R. Liss. Inc., New York.
- Bagni, M., L. Archetti. M. Amadori & G. Marino. 2000. Effect of long-term oral administration of an immunostimulant diet on innate immunity in seabass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Vet. Med.*, 47: 745-751
- Bechère, E. 2000. Introduction shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*, 191: 3-11
- Bell, T.A. & D.V. Lightner. 1988. A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA
- Corbel, M.J. 1975. The immune response in fish: A review. *J. Fish Biol.*, 7: 539-563.
- Ellis, A.E. (Ed.). 1988. Fish Vaccination. Academic Press, San Diego.
- Fange, R. 1982. A comparative study of lymphomieloid tissue in fish. *Develop. and Comp. Immunol. Suppl.*, 2 : 23-33.
- Fletcher, T.C. 1986. Modulation of non spesific host defenses in fish. *Vet. Immunol. and Immunopathol.*, 12: 59-67.
- Galeotti, M. 1998. Some aspects of the application of immunostimulants and a critical review of methods for their evaluation. *J. Appl. Ichthyol.* 14: 189-199.
- Gina, S. 1997. Gambaran Sistem Kekebalan Non Spesifik pada Ikan Gurame (*Osphronemus gouramy* Lac. 1973) Akibat Pemberian Imunostimulan. Tesis. Program Studi Sains Veteriner. Program Pascasarjana IPB, Bogor. 44 hal.
- Hinsch, G.W & M. Hunte. 1990. Ultrastructure of phagocytosis by hemocytes of the American oyster. Proceeding of the Third International Colloquium on Pathology in Marine Aquaculture. 2-6 October 1988. Virginia, USA
- Itami, T. 1994. Body Defense System of Penaeid Shrimp. Paper Presented on Seminar on Fish Physiology and Prevention of Epizootics. Dept. of Aquaculture and Biology. Shimonosheki Univ. of Fisheries. Japan.
- Johansson, M.W. & K. Soederhall. 1985. Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes. *J. Comp. Physiology B.*, 156 : 175-181.
- Johansson, M.W. & K. Soederhall. 1989. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. *Parasitology Today*, 5(6): 171-176.

- Kaige, N., T. Miyazaki & S. Kubota. 1990. Opsonic Effect of Antiserum and Complement on Phagocytosis by Macrophages from the Peritoneal Cavity of the Japanese Eel, *Anguilla japonica*.
- Kajita, Y., M. Sakai., S.D. Atsuta & M. Kobayashi. 1990. The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*. *Fish Pathol.*, 25: 93-98.
- Maynard, D.M. 1960. Circulation and heart function. In T.H. Waterman (Ed.). *The Physiology of Crustacea*. Vol. I. Academic Press, New York.
- McKay, D. & C.R. Jenkin. 1970. Immunity in the invertebrates, correlation of the phagocytic activity of haemocytes with resistance to infection in the crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*). *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 48: 609-617.
- Mori, K. 1990. The present state of immunological research in marine aquaculture. Proceeding of the Third International Colloquium on Pathology in Marine Aquaculture. 2-6 October 1988. Virginia, USA.
- Pujiharto, Y.R.C. 1998. Pengaruh Pemberian Vaksin Utuh (*Whole Cell Vaccine*) dan LPS (Lipopolisakarida) terhadap Respon Kebal Udang Windu (*Penaeus monodon* Fab.). Skripsi. Jurusan Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan IPB, Bogor.
- Rijkers, G.T. 1981. Introduction to fish immunology. *Develop. and Comp. Immunol.*, 5: 527-534
- Rijkers, G.T. 1982. Kinetic of humoral and celluler immune reactions in fish. *Develop. and Comp. Immunol. Suppl.* 2: 93-100
- Sohne, K.S., M.K. Kim, J.D. Kim & I.K. Han. 2000. The role of immu-nostimulants in monogastric animal and fish – review. *J. Anim. Sci.*, 13(8): 1178-1187
- Walczak, B.Z. 1985. Immune Capability of Fish – A Literature Review. Canadian Tech. Report of Fisheries and Aquatic Sciences, No. 1334. 33 p.
-