

**VAKSINASI MIKROKAPSUL POLIVALEN *Vibrio alginolyticus* DAN
Vibrio parahaemolyticus PADA BENIH IKAN KERAPU TIKUS
(*Cromileptes altivelis*)**

Nur Safrida Fandina, Hari Suprpto dan Kismiyati

Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga
Kampus C Mulyorejo – Surabaya, 60115 Telp. 031-5911451

ABSTRAK

Ikan kerapu tikus merupakan salah satu komoditas unggulan budidaya di Indonesia karena memiliki nilai jual yang tinggi. Salah satu kendala utama budidaya ikan kerapu tikus adalah angka kematian benih yang tinggi akibat infeksi bakteri patogen dari genus *Vibrio* sp. Salah satu solusinya, yaitu dengan cara pemberian vaksin. Kendala vaksinasi oral adalah rusaknya antigen pada sistem pencernaan yang disebabkan oleh pH rendah sehingga vaksin harus diberikan pelapisan agar tidak rusak oleh asam lambung. Salah satu bahan yang digunakan untuk melapisi antigen adalah alginat.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian vaksin mikrokapsul polivalen *V. alginolyticus* dan *V. parahaemolyticus* terhadap tingkat kelulushidupan (*Survival Rate*) dan titer antibodi benih ikan kerapu tikus. Metode penelitian yang digunakan, yaitu eksperimental dan rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 4 ulangan. Dosis vaksin mikrokapsul polivalen *V. alginolyticus* dan *V. parahaemolyticus* yang digunakan, yaitu 0 (kontrol); 0,0125; 0,025 dan 0,05 mg/5 g BB ikan/hari. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan uji *Analysis of Varian* (ANOVA) dan jika terdapat perbedaan yang nyata maka dilanjutkan menggunakan uji jarak berganda Duncan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian vaksin mikrokapsul polivalen *V. alginolyticus* dan *V. parahaemolyticus* dengan dosis yang berbeda memberikan perbedaan nyata ($p < 0,05$) terhadap tingkat kelulushidupan benih ikan kerapu tikus. Rata-rata persentase tingkat kelulushidupan tertinggi pada perlakuan C (82,5%) yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan A (75%) dan perlakuan B (77,5%). Titer antibodi akhir penelitian pada perlakuan K (kontrol) sebesar 32, pada perlakuan A sebesar 256, sedangkan pada perlakuan B dan C masing-masing, yaitu 512. Titer antibodi mengalami peningkatan sebanyak 4 kali.

KATA KUNCI : vaksin mikrokapsul polivalen, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, ikan kerapu tikus

MICROCAPSULES POLYVALENT VACCINATION *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* IN FRY HUMPBAC GROUPE
(*Cromileptes altivelis*)

Nur Safrida Fandina, Hari Suprpto and Kismiyati

Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga
Kampus C Mulyorejo – Surabaya, 60115 Telp. 031-5911451

ABSTRACT

The grouper is one of the primer fish commodities in Indonesia because they have high economical value. One of the main problem on humpback grouper culture is a high number of mortality fry caused infection of bacteria pathogen from genus *Vibrio* sp. One of the solution is giving the vaccine. The problem of oral vaccine is antigen damaged in digestive tract because of the low pH, therefore vaccine should be given coating in order not to damage by stomach acid. One of the substances that can use to coating antigen is alginate.

This purpose of this research was to determine the effect of give microcapsules polyvalent vaccine *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* against survival rate and titer antibody of fry humpback grouper. The method used were an experimental method with a Completely Randomized Design (CRD) as an experimental design with 4 treatments and 4 replications. The treatment that being used were giving microcapsules polyvalent vaccine *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* at a dose of 0 (kontrol), 0.0125; 0.025 and 0.05 mg/5 g BW fish/day. In the last week conducted of the challenge test fry humpback grouper which has been given treatments vaccine. The main parameters measured were observed survival rate (%) and titer antibody. The support parameters were observed in clinical signs and water quality such as temperature, dissolved oxygen, acidity (pH) and salinity. Analysis of Variance Data test is followed by Duncan's Multiple Distance Test to find out the results of treatment of microcapsules polyvalent vaccine *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* of the best.

The results showed that microcapsules polyvalent vaccines *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* with different doses gave a difference ($p < 0.05$) to the level of survival rate fry humpback grouper. The average percentage survival rate highest in treatment C (82.5%) were not significantly different with treatment A (75%) and treatment B (77.5%). Antibody titers at the end of study treatment K (kontrol) of 32, in the treatment A of 256, whereas in treatment B and C of 512. Antibody titers increasing 4 times.

KEYWORDS : microcapsules polyvalent vaccine, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, humpback grouper

Pendahuluan

Ikan kerapu tikus merupakan komoditas andalan untuk dibudidayakan karena memiliki nilai jual yang tinggi (Aslianti dkk., 2002) baik sebagai ikan hias

(pada ukuran juvenil 3-5 cm) maupun sebagai ikan konsumsi (pada ukuran 400-800 gram) (Aslianti, 1996). Salah satu kendala utama budidaya ikan kerapu tikus

adalah angka kematian benih yang tinggi yang disebabkan oleh adanya infeksi patogen. Sebagian besar infeksi patogen pada benih ikan kerapu tikus disebabkan oleh bakteri dari genus *Vibrio* sp. dan penyakit yang ditimbulkan dinamakan *vibriosis* (Murdjani, 2002). *V. alginolyticus* dan *V. parahaemolyticus* merupakan bakteri penyebab kematian pada ikan kerapu yang dapat menyebabkan mortalitas sampai dengan 80-90% khususnya pada stadia benih (Taslihan dkk., 2000).

Penggunaan bahan kimia seperti obat dan antibiotik masih dilakukan dalam usaha pencegahan penyakit bakterial pada kegiatan budidaya ikan (Novriadi dkk., 2010). Residu dari antibiotik dapat mengakibatkan terjadinya pencemaran lingkungan perairan sehingga kualitas air menjadi turun (Rinawati, 2011). Salah satu solusi yang dapat dilakukan adalah dengan cara pemberian vaksin (Novriadi dkk., 2010). Vaksin berasal dari suatu jasad patogen yang telah dilemahkan atau dimatikan yang bertujuan untuk meningkatkan pertahanan ikan atau untuk menimbulkan kekebalan terhadap suatu penyakit tertentu (spesifik) (Utomo, 2001). Vaksin yang diberikan secara oral harus tidak rusak selama melewati lambung atau sistem pencernaan ikan (Suprpto, 2009).

Mikroenkapsulasi didefinisikan sebagai proses membungkus sel mikroorganisme dengan cara melapisi sel mikroorganisme tersebut dengan hidrokoloid yang tepat untuk melindungi sel dari pengaruh lingkungan (Sultana, 2000). Bahan yang dapat digunakan pada proses enkapsulasi suatu senyawa aktif adalah bahan yang bersifat tidak memiliki efek toksik (*biocompatible*) dan dapat terurai dalam tubuh (*biodegradable*). Hal ini dikarenakan mikrokapsul yang dihasilkan akan dimasukkan ke dalam tubuh. Salah satu

bahan yang digunakan dalam proses mikroenkapsulasi sel bakteri adalah alginat (Ain *et al.*, 2003).

Materi dan Metode

A. Persiapan Ikan Uji

Ikan kerapu tikus (*C. altivelis*) dengan umur 2-3 bulan dimasukan ke dalam akuarium. Tiap akuarium diisi ikan sebanyak 10 ekor. Ikan diaklimatisasi selama tujuh hari sebelum diberi perlakuan untuk memberikan waktu pada ikan beradaptasi dengan lingkungan yang baru.

B. Kultur Bakteri *V. alginolyticus* dan *V. parahaemolyticus*

Kultur bakteri dilakukan dengan menggunakan media TSB yang dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer. Pembuatan media kultur dibutuhkan 15 g TSB dan 10 g NaCl yang kemudian dimasukkan ke dalam 500 ml *aquadest* dan diaduk hingga larut. Selanjutnya, labu erlenmeyer ditutup dengan *aluminium foil* dan di*autoclave* dengan suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit supaya media steril dari patogen yang lain. Isolat bakteri *V. alginolyticus* dan *V. parahaemolyticus* dimasukkan masing-masing sebanyak 1 ml setelah media dingin. Labu erlenmeyer ditutup kembali dengan *aluminium foil* dan diinkubasi pada suhu kamar dalam waktu 24-48 jam (Suprpto, 2009).

C. Pembuatan *Formalin Killed Cell* (FKC) bakteri *V. alginolyticus* dan *V. parahaemolyticus*

Media TSB akan terlihat keruh setelah 24-48 jam. Hal ini menandakan bakteri telah berkembang biak dan siap untuk dilakukan pemanenan. Pemanenan dilakukan dengan cara disentrifus. Media TSB dituang dalam *centrifuge tube* lalu disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang

kemudian ditambahkan PBS sebanyak 40 ml dan disentrifus lagi pada kecepatan yang sama. Proses pembuangan supernatan dan penambahan PBS ini dilakukan sebanyak tiga kali supaya didapatkan endapan bakteri yang bersih dari media TSB (Suprpto, 2005).

Bakteri yang telah bersih dari media TSB kemudian ditambah PBS sebanyak 25 ml dan diinaktifkan selama 18-24 jam dengan menggunakan formalin sebanyak 2% (Suprpto, 2009). Bakteri diinaktifkan dengan menggunakan formalin untuk mematikan sel bakteri (Ellis, 1989). Bakteri yang telah diformalin diinkubasi pada suhu 25°C selama 72 jam kemudian bakteri dicuci menggunakan PBS sebanyak satu kali dengan cara disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit dan disimpan pada suhu 4°C (Suprpto, 2005).

D. Pembuatan Vaksin Mikrokapsul

Proses pembuatan vaksin mikrokapsul dilakukan dengan cara menyemprotkan suspensi FKC dan alginat ke dalam larutan CaCl_2 . Perbandingan FKC dan alginat yang digunakan adalah 1 : 6. Penyemprotan dilakukan dengan menggunakan *air gun* dan *compressor*.

Mikrokapsul yang terbentuk kemudian dicuci menggunakan *aquadest*. Tahap pencucian yang dilakukan adalah mikrokapsul alginat dalam larutan CaCl_2 dimasukan ke dalam *centrifuge tube* lalu disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk ditampung di dalam botol, kemudian ditambah *aquadest* dan disentrifus lagi dengan kecepatan dan waktu yang sama. Pencucian dilakukan sebanyak tiga kali hingga mikrokapsul bersih dari larutan CaCl_2 . Setelah proses pencucian, mikrokapsul dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dalam suhu ruang selama

kurang lebih 3-7 hari. Mikrokapsul yang telah kering kemudian disimpan dalam botol steril (Ain *et al.*, 2003).

E. Pemberian Vaksin

Pemberian vaksin dilakukan dengan tiga dosis berbeda, yaitu pada perlakuan A (0,0125 mg/5 g BB ikan/hari), B (0,025 mg/5 g BB ikan/hari) dan C (0,05 mg/5 g BB ikan/hari). Pemberian vaksin dilakukan selama tujuh hari. Pencampuran vaksin dalam pakan dilakukan dengan penambahan bahan perekat, yaitu progol dengan dosis 3-5 g/kg pakan, selanjutnya pakan diberikan 5% dari biomassa ikan per hari. Pemberian pakan dilakukan 2 kali sehari.

F. Uji Tantang Benih Ikan Kerapu Tikus

Benih ikan kerapu tikus (*C. altivelis*) yang telah diberi vaksin, kemudian diuji tantang dengan cara menginfeksi bakteri sebanyak 10^8 CFU/ml dengan metode perendaman (Suprpto, 2009). Uji tantang dilakukan selama 24 jam. Penghitungan kepadatan dilakukan dengan cara menyesuaikan kekeruhan suspensi bakteri dengan standart Mc Farland no 1. Jumlah bakteri pada standart Mc Farland 1 setara dengan 10^8 sel/ml. Bakteri yang digunakan saat uji tantang adalah *V. alginolyticus* dan *V. parahaemolyticus*.

G. Pengamatan Setelah Uji Tantang

Pengamatan yang dilakukan yaitu pengamatan gejala klinis akibat infeksi bakteri serta tingkat kelulushidupan ikan selama tujuh hari dan dilanjutkan dengan perhitungan titer antibodi.

Hasil dan Pembahasan

Hasil dari penelitian pemberian vaksin mikrokapsul polivalen *V. alginolyticus* dan *V. parahaemolyticus* terhadap tingkat kelulushidupan benih ikan kerapu tikus (*C. altivelis*) menunjukkan

adanya perbedaan nyata pada tiap perlakuan yang dapat dilihat dari peningkatan rata-rata persentase tingkat kelulushidupan. Data rata-rata persentase tingkat kelulushidupan (*Survival Rate*) benih ikan kerapu tikus (*C. altivelis*) dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Data tingkat kelulushidupan (*Survival Rate*) benih ikan kerapu tikus (*C. altivelis*) setelah ujiantang

Perlakuan	Tingkat Kelulushidupan (%)
K (kontrol)	52,5 ^b
A (dosis 0,0125 mg/5 g BB ikan/hari)	75 ^a
B (dosis 0,025 mg/5 g BB ikan/hari)	77,5 ^a
C (dosis 0,05 mg/5 g BB ikan/hari)	82,5 ^a
<i>Survival Rate Riil</i>	22,5
<i>Survival Rate Riil</i>	25
<i>Survival Rate Riil</i>	30

^{a,b} : Superskrip yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($p < 0,05$).

Pada perlakuan K (kontrol) rata-rata persentase tingkat kelulushidupan benih ikan kerapu tikus (*C. altivelis*), yaitu 52,5%. Pada perlakuan A rata-rata persentase tingkat kelulushidupan benih ikan kerapu tikus (*C. altivelis*) meningkat menjadi 75% dengan pemberian vaksin mikrokapsul polivalen *V. alginolyticus* dan *V. parahaemolyticus* sebanyak 0,0125 mg/5 g BB ikan/hari. Rata-rata tingkat kelulushidupan benih ikan kerapu tikus (*C. altivelis*) tertinggi pada perlakuan C, yaitu 82,5% dengan dosis

vaksin mikrokapsul polivalen *V. alginolyticus* dan *V. parahaemolyticus* sebanyak 0,05 mg/5 g BB ikan/hari. Secara umum, perlakuan ikan yang divaksin memiliki tingkat kelulushidupan yang lebih baik dibandingkan dengan kontrol (Nitimulyo, dkk. 2005). Hal ini disebabkan karena benih ikan kerapu tikus (*C. altivelis*) yang divaksin memiliki antibodi yang lebih banyak daripada benih ikan kerapu tikus (*C. altivelis*) yang tidak divaksin. Pada saat ujiantang, benih ikan kerapu tikus (*C. altivelis*) yang memiliki antibodi lebih mampu membantu tubuh untuk mengeliminasi patogen yang menginfeksi sehingga mortalitas dapat ditekan (Hardi, 2011). Rata-rata persentase tingkat kelulushidupan benih ikan kerapu tikus (*C. altivelis*) pada perlakuan A, B dan C termasuk dalam tingkatan baik. Hal ini sesuai dengan pernyataan Suprpto (2009), vaksinasi yang berhasil minimal SR pada ikan yang divaksin adalah 60 persen.

Relative Percent Survival (RPS) merupakan tingkat perlindungan relatif vaksin terhadap benih ikan kerapu tikus (*C. altivelis*). Data rata-rata nilai RPS pada tiap perlakuan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Data rata-rata nilai *Relative Percent Survival* (RPS) pada tiap perlakuan

Perlakuan	<i>Relative Percent Survival</i> (RPS)
A (dosis 0,0125 mg/5 g BB ikan/hari)	47,37%
B (dosis 0,025 mg/5 g BB ikan/hari)	52,63%
C (dosis 0,05 mg/5 g BB ikan/hari)	63,16%

Berdasarkan penghitungan *Relative Percent Survival* (RPS), pada perlakuan A dengan dosis 0,0125 mg/5 g BB ikan/hari didapat nilai RPS sebesar 47,37%, perlakuan B dengan dosis 0,025 mg/5 g BB ikan/hari sebesar 52,63%, dan perlakuan C dengan dosis 0,05 mg/5 g BB ikan/hari sebesar 63,16%. Menurut Grisez and Tan (2005), vaksinasi yang berhasil minimal nilai RPS pada ikan adalah 60 persen. Berdasarkan hasil tersebut perlakuan C termasuk dalam kisaran lebih dari 60% sehingga layak untuk dijadikan vaksin.

Pengukuran titer antibodi dilakukan bertujuan untuk mengetahui pengaruh vaksinasi terhadap jumlah antibodi dalam serum benih ikan kerapu tikus. Berdasarkan pengukuran titer antibodi ikan kerapu tikus (*C. altivelis*) diperoleh hasil seperti yang tertera dalam Tabel 3.

Tabel 3. Hasil pengukuran titer antibodi ikan kerapu tikus (*C. altivelis*)

Perlakuan	Sebelum Vaksinasi	Setelah Vaksinasi	Setelah Uji Tantang
K (kontrol)	16	16	32
A (dosis 0,0125 mg/5 g BB ikan/hari)	16	64	256
B (dosis 0,025 mg/5 g BB ikan/hari)	16	128	512
C (dosis 0,05 mg/5 g BB ikan/hari)	16	256	512

Hasil pengukuran titer antibodi pada awal penelitian menunjukkan nilai yang sama, yaitu 16. Hal ini terjadi karena kemungkinan ikan tersebut pernah terserang bakteri sejenis sehingga antibodi dapat terbentuk (Lusiastuti dan Hadle, 2010). Menurut Grindstaff *et al.* (2003) menjelaskan bahwa sistem pertahanan humoral kemungkinan dapat diturunkan dari induk ke anakan.

Titer antibodi setelah vaksinasi mengalami peningkatan, yaitu pada perlakuan A sebesar 64, perlakuan B sebesar 128 dan perlakuan C sebesar 256. Hal ini menunjukkan respon positif benih ikan kerapu tikus (*C. altivelis*) terhadap antigen yang diberikan. Perbedaan titer pada perlakuan A, B dan C menunjukkan bahwa pemberian dosis yang berbeda menunjukkan pengaruh terhadap peningkatan titer antibodi. Titer antibodi setelah uji tantang mengalami peningkatan pada benih ikan yang divaksin. Pada perlakuan A meningkat dari 64 menjadi 256, perlakuan B dan C menjadi 512. Peningkatan titer ini disebabkan karena pada saat terpapar antigen yang sama pada saat uji tantang, respon imun akan terjadi lebih cepat dengan produksi antibodi lebih tinggi daripada infeksi pertama (Verma and Agarwal, 2005).

Parameter kualitas air dalam akuarium pemeliharaan selama penelitian berturut-turut, yaitu suhu berkisar antara 29,75-30,75°C, derajat keasaman (pH) 7, salinitas 35 ppt dan oksigen terlarut 5,44-6,1 ppm. Hal ini sesuai dengan Wu (2009) yang menyatakan kondisi lingkungan yang sesuai untuk pertumbuhan ikan kerapu tikus, yaitu suhu antara 28-31°C, kandungan oksigen terlarut >4 ppm dan pH antara 7,8-8,3.

Pemberian vaksin mikrokapsul polivalen *V. alginolyticus* dan *V. parahaemolyticus* dapat meningkatkan

kelulushidupan (*Survival Rate*) benih ikan kerapu tikus (*C. altivelis*) pada masing-masing perlakuan (A, B dan C), yaitu sebesar 22,5%, 25% dan 30%. Pemberian vaksin mikrokapsul polivalen *V. alginolyticus* dan *V. parahaemolyticus* dapat meningkatkan titer antibodi benih ikan kerapu tikus (*C. altivelis*). Titer antibodi pada masing-masing perlakuan (A, B, C) mengalami peningkatan sebanyak 4 kali.

Daftar Pustaka

- Ain, Q., S. Sharma, G. K. Khuller and S. K. Garg. 2003. Alginate-based Oral Drug Delivery System for Tuberculosis: Pharmacokinetics and Therapeutic Effects. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51 : 931–938.
- Aslianti, T., B. Slamet dan G. S. Prasetya. 2002. Aplikasi Budidaya Kerapu Bebek, *Cromileptes altivelis* Di Teluk Ekas Kabupaten Lombok Timur. Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol, Bali dan Badan Riset Kelautan dan Perikanan. Jakarta. 6 hal.
- Aslianti, T. 1996. Pemeliharaan Larva Kerapu Bebek, *Cromileptes altivelis* Dengan Padat Tebar Berbeda. Edisi Khusus. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*, II (2) : 6-12.
- Ellis, 1989. Fish Vaccination. Departement of Agriculture and Fisheries for Scotland. Marine Laboratory. 6 pp.
- Grindstaff, J. L., E. D. Brodie III and E. D. Ketterson. 2003. Immune Function Across Generations: Integrating Mechanism and Evolutionary Process In Maternal Antibody Transmission. Department of Biology and Center for the Integrative Study of Animal Behavior. Indiana University. USA.
- Proceeding The Royal of Society. Biological Science, 270: 2309-2319.
- Grisez, L. and Z. Tan. 2005. Vaccine Development for Asian Aquaculture. *Disease In Asian Aquaculture*, 5 : 483-439.
- Hardi, E. H. 2011. Kandidat Vaksin Potensial *Streptococcus agalactiae* untuk Pencegahan Penyakit *Streptococcosis* Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). Disertasi. Program Studi Ilmu Akuakultur. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 182 hal.
- Lusiastuti, A. M. dan W. Hadle. 2010. Penggunaan Vaksin *Aeromonas hydrophila*: Pengaruhnya Terhadap Sintasan dan Imunitas Larva Ikan Patin (*Pangasionodon hypophthalmus*). *Berita Biologi*, 10 (2) : 151-158.
- Murdjani, M. 2002. Identifikasi dan Patologi Bakteri *Vibrio alginolyticus* Pada Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*). Disertasi. Program Pasca Sarjana. Universitas Brawijaya. Malang. 117 hal.
- Nitimulyo, K. H., A. Isnansetyo, Triyanto, M. Murdjani dan L. Sholichah. 2005. Efektivitas Vaksin Polivalen untuk Pengendalian *Vibriosis* Pada Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*). *Jurnal Perikanan*, VII (2) : 95-100.
- Novriadi, R., Haryono, M. Kadari dan A. Darmawan. 2010. Aplikasi Vaksinasi *Vibrio* Polivalen Melalui Pakan Pada Ikan Kakap Putih Untuk Meningkatkan Imunitas Pada Laju Pertumbuhan. Kementerian Kelautan

- dan Perikanan Jenderal Perikanan Budidaya Balai Budidaya Laut Batam. 22 hal.
- Rinawati, N. D. 2011. Daya Antibakteri Tumbuhan Majapahit (*Crescentia cujete* L.) Terhadap Bakteri *Vibrio alginolyticus*. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Surabaya. 13 hal.
- Sultana, K., G. Godward, N. Reynolds, R. Arumugaswamy, P. Peiris and K. Kailasapathy. 2000. Encapsulation of Probiotic Bacteria with Alginate–starch And Evaluation of Survival In Simulated Gastrointestinal Conditions And In Yoghurt. International Journal of Food Microbiology, 62 : 47–55.
- Suprpto, H. 2005. The Administration of Mixture *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* Bacterin and Their Components To Enhance The Survival Rate of Shrimp *Penaeus monodon*. J. Sain Vet. I : 35-41.
- Suprpto, H. 2009. Evaluasi Uji Lapangan Vaksin Oral *Vibriosis* Mono dan Polyvalent Dengan Pelapisan Chitosan dan Feed Additive Untuk Mencegah Tingginya Kematian Ikan Kerapu Macan (*Ephinephelus fuscoguttatus*). Proposal Tahun III. Insentif Riset Terapan. Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat. Universitas Airlangga. 60 hal.
- Taslihan, A., M. Murdjani, C. Purbomartono dan E. Kusnendar. 2000. Bakteri Patogen Penyebab Penyakit Mulut Merah Pada Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*). Jurnal Perikanan UGM, II (2) : 57-62.
- Utomo, Y. E. 2001. Uji Lapang Vaksin *Aeromonas hydrophila* Terhadap Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Melalui Pakan Pelet Bervaksin. Program Studi Budidaya Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 56 hal.
- Verma, P. S. and V. K. Agarwal. 2005. Cell Biology, Genetics, Molecular Biology: Evolution and Ecology. S. Chand and Company Ltd. New Delhi. 126-144 pp.
- Wu, M. 2009. Study on The Feasibility of Setting Up a Fish Fry Hatchery in Hong Kong. Dissertation. Master of Science in Environmental Management. The University of Hong Kong. 101 pp.