

**POTENSI TUMBUHAN BANGKAL (*Nauclea Orientalis*)
UNTUK PENGENDALIAN BAKTERI *Aeromonas Hydrophila***

**POTENTIAL PLANT BANGKAL (*Nauclea orientalis*)
FOR CONTROL *Aeromonas Hydrophila***

¹⁾Siti Aisiah

¹⁾Jurusan Budidaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru
E-Mail : siahbams@yahoo.co.id

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah didapatkan metode pengendalian penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* pada budi daya ikan yang ramah lingkungan. Dalam penelitian ini dilakukan uji sensitivitas terhadap bakteri *A. hydrophila*, uji minimal konsentrasi menghambat bakteri *A. hydrophila* (uji MIC) dan uji toksisitas terhadap ikan nila. Rancangan yang digunakan untuk uji toksisitas adalah rancangan acak lengkap (RAL), dengan 4 perlakuan yaitu A = Ikan disuntik dengan ekstrak bangkal konsentrasi 20%, B = Ikan disuntik dengan ekstrak bangkal konsentrasi 40%, C = Ikan disuntik dengan ekstrak bangkal konsentrasi 80%, dan D = Kontrol (ikan tidak disuntik), diulang sebanyak 3 kali. Perlakuan ini didapat dari hasil uji sensitivitas antibakteri bangkal yang mempunyai daya hambat dan daya bunuh paling besar terhadap bakteri *A. hydrophila* yaitu ekstrak daun bangkal dengan pelarut akuades. Pengujian MIC menunjukkan bahwa ekstrak bangkal-akuades memiliki daya hambat minimal 20 % terhadap aktivitas bakteri *A. hydrophila*. Hasil uji toksisitas yang dilakukan terhadap ikan nila dengan konsentrasi 20%, 40% dan 80% mortalitas ikan nila dibawah 50 %. Pengamatan hematologis yaitu eretrosit, leokosit, plasma darah, hematokrit dan leokokrit pada masing-masing perlakuan sebagian besar masih berada dalam kisaran yang normal. Parameter kualitas air yaitu, kadar oksigen terlarut, pH, amoniak, CO₂ dan suhu masih dapat mendukung kehidupan normal ikan nila.

Kata kunci : *Nauclea sp*, *A. hydrophila*, *Tilapia*, MIC

ABSTRACT

The purpose of this study was obtained method of controlling diseases caused by *Aeromonas hydrophila* in fish farming is environmentally friendly. In this study the sensitivity of the test *A. hydrophila*, a minimum test konsentari inhibiting *A. hydrophila* (MIC test) and toxicity test on tilapia. The design used for toxicity tests is completely randomized design with 4 treatments it A = Fish injected with extracts bangkal concentration of 20 %, B = Fish injected with extracts bangkal concentration

of 40 %, C = Fish injected with extracts of 80 % concentration bangkal, and D = Control (fish not injected), repeated 3 times. This treatment was obtained from the results of the sensitivity test antibacterial bangkal inhibition and has the power to kill most of the bacteria against *A. hydrophila* is bangkal leaf extract with distilled water solvent. MIC testing showed that the extract bangkal - distilled water has a minimum of 20 % inhibition of the bacterial activity *A. hydrophila*. Results of toxicity tests conducted on tilapia with a concentration of 20 %, 40 % and 80 % mortality of tilapia under 50 %. Haematological observation that eretrosit, leokosit, blood plasm, hematocrit and lekokrit in each treatment is still in the normal range. The water quality parameters, dissolved oxygen, pH, ammonia, CO₂ and temperature can still support the normal life of tilapia.

Key word : *Nauclea sp*, *A. hydrophila*, *Tilapia*, MIC

PENDAHULUAN

Salah satu jenis penyakit infeksi yang merupakan masalah serius dalam budi daya ikan nila di kolam dan keramba jaring apung serta panti benih di Kalimantan Selatan adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila*. Erawati dan Marsoedi (2004) menyatakan bahwa serangan bakteri ini bersifat patogenik, menyebar secara cepat pada padat penebaran tinggi dan dapat mengakibatkan kematian benih sampai 90 %. Cara yang umum dilakukan untuk pengendalian penyakit ini biasanya dengan menggunakan bahan kimia maupun antibiotik, tetapi hasilnya kurang efektif karena tingkat keberhasilannya masih sangat rendah

serta dapat menimbulkan resistensi bakteri terhadap obat-obatan tersebut. Untuk itu perlu dicari metode lain yang lebih aman, dan efektif serta berwawasan lingkungan untuk pengendalian populasi *Aeromonas hydrophila* sampai batas aman.

Salah satu upaya pengendalian yang dapat dilakukan untuk menanggulangi *A. hydrophila* dengan aman dan ramah lingkungan adalah pengendalian secara kimiawi dengan memanfaatkan tumbuhan yang mengandung bahan aktif alami. Tumbuhan Bangkal *Nauclea orientalis* merupakan salah satu tanaman yang potensial dikembangkan untuk menekan perkembangan bakteri patogen. Dimana bangkal pada umumnya menghasilkan senyawa metabolit sekunder seperti tannin dan senyawa alkaloid, yang berfungsi

sebagai antibiotik alami ramah lingkungan.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Metode

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Hama dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan Universitas Lambung Mangkurat selama 3 bulan, bahan yang digunakan antara lain isolat bakteri *A. hydrophila* berasal dari koleksi Laboratorium Hama dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan Universitas Lambung Mangkurat. Media kultur yang digunakan adalah media selektif *Aeromonas-Pseudomonas* (GSP Agar), medium *stock culture* dan uji sensitivitas *A. hydrophila* yaitu TSA (*Tryptone Soya Agar*), medium untuk kultur cair bakteri *A. hydrophila* yaitu TSB (*Tryptone Soya Broth*), medium agar murni (*Bacto Agar*) dan akuades. Sebelum percobaan dimulai dilaksanakan persiapan alat dan bahan. Peralatan yang digunakan dicuci hingga bersih dan kemudian dilakukan sterilisasi terhadap alat dan media kultur bakteri yang digunakan, ekstraksi tanaman bangkal, kultur isolat bakteri dan aklimatisasi ikan

Uji Sensitivitas *Aeromonas hydrophila* terhadap Tumbuhan Bangkal

Medium Bacto Agar disiapkan sebagai lapisan bawah untuk uji sensitivitas. Suspensi bakteri *A. hydrophila* dengan kepadatan 10^8 cfu dari medium TSB dikultur ke dalam medium TSA semi solid (70%) pada suhu $\pm 40 - 50$ °C lalu divortek. Medium yang mengandung suspensi bakteri ini dituangkan ke dalam medium Bacto Agar, sehingga terdapat dua lapisan pada cawan petri dan medium dibiarkan hingga membeku.

Kertas cakram ditetesi 20 μ l supernatan, hasil dari ekstraksi daun, batang, dan kulit bangkal dengan menggunakan pelarut metanol maupun akuades. Selain itu, kontrol terdiri dari kontrol positif (*oxytetracyclin*) ditempelkan pada medium dan diinkubasi pada suhu kamar selama 18-24 jam. Zona penghambat bakteri (*bakteristatik*) yang berwarna keruh dan zona pembunuh (*bakterisidal*) yang berwarna bening diukur diameternya. Selanjutnya, bagian tumbuhan bangkal yang memiliki zona penghambat dan zona pembunuh paling besar digunakan dalam penelitian selanjutnya.

Uji Minimal Inhibitor Concentration (MIC)

Uji MIC dilakukan untuk mengetahui konsentrasi minimal dari ekstrak daun bangkal-akuades yang dapat menghambat atau membunuh bakteri sebanyak-banyaknya. Uji MIC dilakukan dengan metode difusi cakram, kertas cakram ditetesi 20 µl ekstrak daun bangkal dengan konsentrasi 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 dan 90%. Sedangkan untuk kontrol positif ditetesi 20 µl oxytetracyclin dan akuades. Selanjutnya kertas cakram yang telah ditetesi dibiarkan sebentar supaya ekstraknya meresap kedalam kertas cakram. Kertas cakram perlakuan tersebut selanjutnya ditempelkan pada medium TSA semi solid (70 %) yang telah diinokulasi bakteri sebanyak 10⁸ cfu. Kemudian diinkubasi selama 18-24 jam. Setelah itu, zona hambat yang ditimbulkan oleh pengaruh dari ekstrak daun bangkal di amati dan diukur setiap 3 jam.

Uji Toksisitas

Uji toksisitas dilakukan untuk mengetahui dampak keracunan yang tidak disengaja dari ekstrak bangkal pada ikan nila. Ikan nila yang telah diaklimatisasi disuntik dengan dosis sebanyak 0,1 ml supernatan

mengkudu dari hasil uji MIC. Sedangkan untuk kontrol negatif ikan nila tidak disuntik (Lu, 1995). Kemudian ikan nila tersebut dipelihara dalam bak plastik selama 2 minggu pengaruh penyuntikan diamati pada ikan nila. Apabila ada ikan yang terluka dan mati, maka dilakukan pengamatan gejala eksternal yang ditimbulkannya dan jumlah ikan yang mati. Uji toksisitas dilakukan dengan 4 perlakuan 3 ulangan, yaitu:

- A = Ikan disuntik dengan ekstrak daun bangkal dosis 20 %
- B = Ikan disuntik dengan ekstrak daun bangkal dosis 40%
- C = Ikan disuntik dengan ekstrak daun bangkal dosis 80 %
- D = Kontrol (ikan tidak disuntik)

Pengamatan

Pengamatan dilakukan terhadap zona penghambat dan zona pembunuh dalam uji sensitivitas bakteri *A. hydrophila* terhadap bagian tumbuhan bangkal (daun, batang, kulit dan buah) yang diamati dengan metode deskriptif (Nazir, 1985). Ditemukan bahwa bagian daun yang memiliki daya hambat terbesar. Konsentrasi ekstrak daun bangkal yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri dalam uji MIC diamati dengan metode deskriptif. Uji toksisitas dengan melakukan pengamatan terhadap jumlah ikan

yang mati melebihi 50% (Lu, 1995). Gejala yang ditimbulkan ikan nila akibat uji toksisitas ekstrak daun bangkal diamati dengan metode deskriptif (Nazir, 1985).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Sensitivitas bakteri *A. hydrophila* terhadap tumbuhan bangkal yang dilakukan untuk mengetahui daya hambat aktivitas antibakteri dapat dilihat pada Tabel 1

Tabel 1. Hasil Uji Sensitivitas Pada Ekstrak Daun, Batang, Buah dan Biji Bangkal (*N. orientalis*) Dalam Metanol dan Akuades Terhadap Pertumbuhan Bakteri *A. hydrophila*.

No	Sampel	Waktu	Zona Hambat (mm)	
			Bakterisidal	Bakteristatik
1	Daun bangkal-akuades	3 jam	-	-
		6 jam	4	-
		9 jam	4	-
		12 jam	5	-
		15 jam	6	-
		18 jam	6	-
		21 jam	12	-
		24 jam	12	-
2	Daun bangkal-metanol	3 jam	-	-
		6 jam	2	-
		9 jam	2	-
		12 jam	4	-
		15 jam	4	-
		18 jam	6	-
		21 jam	8	-
		24 jam	10	-
3	Kulit bangkal-akuades	3 jam	-	-
		6 jam	2	-
		9 jam	2	-
		12 jam	4	-
		15 jam	4	-
		18 jam	4	-
		21 jam	6	-
		24 jam	6	-

4	Kulit bangkal-metanol	3 jam	-	-
		6 jam	2	-
		9 jam	2	-
		12 jam	4	-
		15 jam	4	-
		18 jam	4	-
		21 jam	6	-
		24 jam	6	-
5.	Batang bangkal- akuades	3 jam	-	-
		6 jam	-	3
		9 jam	1	3
		12 jam	1	4
		15 jam	2	4
		18 jam	2	5
		21 jam	2,5	5
		24 jam	2,5	5
6.	Batang bangkal- metanol	3 jam	-	-
		6 jam	-	-
		9 jam	-	3
		12 jam	-	4
		15 jam	0,	4
		18 jam	0,5	5
		21 jam	1	5
		24 jam	1	5
7.	Kontrol Positif (Oxytetracyclin)	3 jam	-	-
		6 jam	-	6
		9 jam	2	6
		12 jam		6
		15 jam	4	6
		18 jam		6
		21 jam	4	6
		24 jam	6	6
		8		
		10		
8.	Kontrol Negatif (Kertas cakram kosong)	3 jam	-	-
		6 jam	-	-
		9 jam	-	-
		12 jam	-	-
		15 jam	-	-
		18 jam	-	-
		21 jam	-	-
		24 jam	-	-

Keterangan : (-) tidak ada pertumbuhan

Kertas cakram yang telah dibasahi ekstrak daun bangkal-akuades mempunyai daya hambat lebih besar terhadap pertumbuhan bakteri setelah 24 jam pengamatan yaitu bakterisidal 12 mm, disusul oleh

daun bangkal-metanol bakterisidal 10 mm, kulit bangkal-akuades dan kulit bangkal-mehanol masing-masing bakterisidal 6 mm dan batang bangkal-akuades bakterisidal 2,5 mm dan bakteristatik 5 mm dan batang bangkal-metanol bakterisidal 1 mm dan bakteristatik 5 mm. Dalam penelitian utama hanya digunakan ekstrak daun bangkal-akuades yang terbukti mempunyai daya bunuh dan menghambat lebih tinggi terhadap *A. hydrophila*. Ekstrak daun bangkal diduga mengandung bahan aktif yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* karena akuades dapat melarutkan bahan aktif yang terkandung di dalam daun bangkal tersebut.

Pengujian MIC (*Minimal Inhibitor Concentration*) antibakteri dengan metode difusi cakram menunjukkan bahwa ekstrak daun bangkal-akuades memiliki daya hambat terhadap bakteri *A. hydrophila*. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak daun bangkal-akuades minimal yang mampu menghambat aktivitas bakteri adalah 20 %. Konsentrasi 40%, 80%, dan kontrol positif (oxytetracyclin) diketahui juga mempunyai kemampuan sebagai bakterisidal terhadap bakteri *A. hydrophila* yang lebih besar

dibandingkan konsentrasi 20 %. Kemampuan suatu bahan antimikroba dalam meniadakan kemampuan hidup mikroorganisme tergantung pada konsentrasi bahan antimikroba itu (Schlegel, 1994 di dalam Ajizah, 1998). Artinya jumlah bahan antimikroba dalam suatu lingkungan mikroorganisme sangat menentukan kehidupan dari *A. Hydrophila* yang terpapar antimikroba dari ekstrak daun bangkal.

Ekstrak daun bangkal-akuades memiliki kemampuan sebagai bakterisidal artinya dapat mematikan atau menghentikan pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun bangkal semakin sedikit jumlah bakteri yang mampu bertahan hidup. Ini menunjukkan bahwa dengan meningkatnya konsentrasi semakin besar kadar bahan aktif yang berfungsi sebagai antibakteri pada ekstrak daun bangkal tersebut.

Uji toksisitas bangkal pada ikan nila dapat diketahui berdasarkan jumlah ikan yang mati melebihi 50% dalam uji kesehatan ikan. Berdasarkan hasil uji toksisitas yang dilakukan terhadap ikan nila dengan menggunakan ekstrak daun bangkal dengan konsentrasi 20%, 40% dan 80% menunjukkan tingkat kematian

masih di bawah 50% setelah dilakukan penyuntikan. Mortalitas yang terjadi berkisar 9 – 21 %, berarti kandungan bahan alami pada bangkal tidak toksik terhadap ikan nila. Menurut Soemirat, 2003 Toksisitas terhadap organisme tertentu dinyatakan dalam nilai *Lethal Dose* (LD_{50}), yaitu menunjukkan dosis racun yang dapat mematikan 50% dari populasi hewan percobaan.

Penyuntikkan dengan konsentrasi ekstrak daun bangkal-akuades konsentrasi sebanyak 80%, 40% dan 20% tidak menunjukkan gejala eksternal yang berarti pada ikan uji. Hasil ini lebih baik dari yang didapatkan pada penelitian dengan ekstrak daun mengkudu, dimana ditemukan gejala klinis yang ditimbulkan akibat penyuntikkan ekstrak mengkudu-akuades dapat mempengaruhi kesehatan ikan, yakni

ikan berenang lemah, insang pucat, dan ada bekas suntikan berwarna hitam pada bagian intramuskular (Aisiah, 2012). Bangkal mengandung bahan aktif memiliki metabolit sekunder seperti steroid, karoten, substansi biokatif anti bakteri/jamur/virus/kanker (Anonim, 2012).

Pengamatan hematologis dilakukan berdasarkan modifikasi dari metoda Klontz (1994). Peubah yang diamati adalah pola gambaran hematologis yang meliputi : nilai hematokrit, leukokrit, eritrosit, plasma darah dan leukosit. Pengamatan hematologis ikan dilakukan dengan pengambilan darah ikan uji. Pengamatan hematologis ikan nila sebelum perlakuan adalah leukosit 1 mm^3 , eritrosit 22 mm^3 , plasma darah 45 mm^3 , hematokrit 32,35% dan leukokrit 1,47 %.

Tabel 2. Jumlah Leukosit, Eritrosit, Plasma Darah, Hematokrit dan Leukokrit Setelah Diberi Perlakuan

Perlakuan	Ulangan	Jumlah Leukosit (mm^3)	Jumlah Eritrosit (mm^3)	Jumlah Plasma Darah (mm^3)	Total Darah (mm^3)	Jumlah Hematokrit (%)	Jumlah Leukokrit (%)
A	1	1,5	26	41	69,5		
	2	1	28	39	69		
	3	2	27	40	69		
Rata-rata		1,5	27	40	69,16	39,09	2,16
B	1	1,5	27,5	38,5	67,5		

	2	1	27	38	66		
	3	1	26,5	38	66		
	Rata-rata	1,16	27	38,16	66,83	40,40	1,74
C	1	1	31	36	68		
	2	1,5	29	38	68,5		
	3	2	30,5	36	68,5		
	Rata-rata	1,5	30,16	37,33	68,33	44,13	2,19
D	1	1	25	43	69		
	2	2	24	41,5	67,5		
	3	1,5	26	42	69,5		
	Rata-rata	1,5	25	42,16	68,66	36,41	2,18

Keterangan:

- A= Disuntik dengan menggunakan ekstrak daun bangkal- akuades dengan konsentrasi 20%
 B= Disuntik dengan menggunakan ekstrak daun bangkal- akuades dengan konsentrasi 40%
 C= Disuntik dengan menggunakan ekstrak daun bangkal- akuades dengan konsentrasi 80%
 D= Ikan tanpa penyuntikan

Hematokrit juga disebut sebagai *Packed Cell Volume* (PCV). Nilai PCV adalah volume yang diisi oleh eritrosit, dinyatakan sebagai persen terhadap volume total darah. Nilai hematokrit adalah volume sel-sel darah yang didapat setelah sentrifugasi dan dikeluarkannya plasma darah. Parameter hematokrit berpengaruh terhadap pengukuran eritrosit dan merupakan perbandingan dengan volume eritrosit (Schalm, Jain, and Carroll., 1975).

Persentase darah merah (hematokrit) dalam darah ikan dapat menggambarkan kesehatan ikan. Ikan yang mengalami anemia mempunyai presentase serendah-rendahnya 10% (Anderson dan Siwicki, 1994). Rata-rata jumlah hematokrit ikan uji pada

penelitian ini berkisar antara 36,41% - 44,13 %, hematokrit pada sejumlah ikan teleostei berkisar antara 20 – 40% (Fange, 1992). Rendahnya hematokrit juga dapat menunjukkan terjadinya kontaminasi, ikan kekurangan makan, kandungan protein pakan yang rendah, kekurangan vitamin atau terjadi infeksi. Hematokrit yang tinggi juga dapat menunjukkan adanya kontaminan, adanya masalah osmolaritas dan stres (Anderson dan Siwicki, 1994), pada penelitian ini terdapat kadar hematokrit diatas 40% yaitu pada perlakuan C 44,13% ini diduga karena dosis yang diberikan terlalu besar sehingga menyebabkan ikan menjadi stress sehingga kadar hematokritnya meningkat.

Rerata jumlah leukokrit ikan uji pada penelitian ini berkisar antara 1,74 – 2,19%. Menurut Anderson dan Siwicki (1994), persentase darah putih (leukokrit) dapat menunjukkan status kesehatan ikan. Leukokrit pada rainbow trout normal berkisar 1-2% (Anderson dan Siwicki, 1994), selanjutnya dijelaskan bahwa leukokrit yang rendah disebabkan oleh infeksi kronis, kualitas nutrisi yang rendah, kekurangan vitamin dan adanya kontaminan infeksi awal dan stres.

Rerata jumlah plasma darah ikan uji pada penelitian ini berkisar antara 37,33 – 42,16%. Warna plasma darah pada perlakuan C konsentrasi 80% terlihat kemerah-merahan, ini menunjukkan terjadinya hemolisis pada eritrosit yang disebabkan oleh kerapuhan sel (Anderson dan Siwicki, 1994). Diduga kandungan bahan anti bakteri dalam bangkal dengan konsentrasi yang tinggi (80%) dapat menyebabkan hemolisis pada eritrosit. Plasma darah pada ikan sehat berwarna bening dan agak sedikit kekuningan (Anderson, 1974).

Pengukuran kualitas air dilakukan dengan pengambilan sampel air kolam pada saat awal dan akhir uji toksisitas. Rerata oksigen terlarut pada penelitian ini adalah 5,6-5,7 ppm, karbondioksida 1,1-5,15

ppm, pH 6,5-7,63, kadar amoniak 0,05-0,8 ppm dan suhu pada penelitian ini berkisar 29,5-30°C. Secara keseluruhan kualitas air selama penelitian masih dalam kisaran yang baik untuk kehidupan normal ikan nila (Zonneveld, 1991).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Simpulan dari hasil penelitian ini adalah sensitivitas bakteri *A. hydrophila* terhadap tanaman bangkal (*Nauclea* sp) menunjukkan bahwa ekstrak daun bangkal-akuades memiliki aktivitas lebih besar dibandingkan dengan yang lain. Berdasarkan uji MIC ekstrak daun bangkal-akuades menunjukkan bahwa konsentrasi hambat minimal 20 % terhadap bakteri *A. hydrophila*. Hasil uji toksisitas dengan dosis 20, 40 dan 80% ekstrak daun bangkal menunjukkan tidak toksik terhadap ikan nila. Pengamatan hematologis yaitu eritrosit, leukosit, plasma darah, hematokrit, dan leukokrit pada masing-masing perlakuan menunjukkan hasil kisaran normal pada ikan nila. Ini menunjukkan bahwa ekstrak daun bangkal-akuades dapat dipergunakan untuk pengobatan pada ikan nila.

Parameter kualitas air selama penelitian masih berada dalam kisaran yang cukup layak untuk kehidupan normal ikan nila.

Saran

Saran dari penelitian ini adalah perlu dilakukan penelitian untuk Mencari isolat murni senyawa bioaktif *Nauclea orientalis* yang bersifat antibakteri yang dapat dijadikan bakterisida alami dalam pengendalian penyakit *A. hydrophila* pada budi daya ikan nila.

DAFTAR PUSTAKA

- Ajizah, A., 1998. Sensitivitas Enteropathogenic *Escherichia coli* terhadap Daun *Psidium guajava* L. Secara in vitro. FKIP Unlam Banjarmasin. (http://bioscientiae.tripod.com/v1n1/v1_n1_ajizah) (Diakses tanggal 16 November 2006).
- Aisiah, S 2012. Efikasi Ekstrak Mengkudu (*Morinda citrifolia*) terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila* Dan Toksisitasnya Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*), Jurnal Ilmiah Sains Akuatik , Volume 14 Nomor 1, Mei 2012 UMP, Purwokerto : 55- 63.
- Anderson, D.P. 1974. Fish Immunology.T.F.H Publication Inc. Ltd. U.S.A. P: 66-73.
- Anderson, D. P dan A. K. Siwicki., 1994. Simplited Assay For Measuring Nonspecific Depense Mechanism In Fish. Rough Draft For Presentation at The Fish Healt Section / American Fisheries Society Meetings, Seatle Woshington. 239 pp.
- Anonim 2012, (<http://E:/Bangkal.html>). Dikutip tanggal 12 Nopember 2012.
- Efendie, M.I., 1992. Metodologi Biologi Perikanan. Fakultas Perikanan IPB. Bogor. 75 Halaman.

- Erawati, C.I dan Marsoedi. 2004. Pengaruh pemberian Perasan Kasar Daun pepaya (*Carica papaya*) dengan Dosis Yang Berbeda terhadap Ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang Terinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. Jurnal Penelitian Perikanan Volume 7 nomor 2. Universitas Brawijaya, Malang.
- Fange, R., 1992. Fish Blood Cells. *In*: Fish Physiology. Volume XII, Part B. The cardiovascular system. W.S. Hoar, D.J. Randall. A. P. Farrell (Eds). Academic Press, Inc. San Diego. 1-54 pages.
- Klontz, G. W., 1994. Fish Hematology. Stolen *et al.* (Eds.). Techniques in Fish Immunology-3. Sos Publications, Fair Haven, NJ 07704-3303. *In* USA. p.121-131
- Lu, F. C., 1995. Toksikologi Dasar. Asas, Organ Sasaran, dan Penilaian Resiko Edisi Kedua. UI- Press. Jakarta. 428 halaman.
- Nazir, M., 1985. Metode Penelitian. Ghalia Indonesia. Jakarta. 597 halaman.
- Schalm, O.W., N.C. Jain, and E.J. Carroll. 1975. Veterinary Hematology. 3rd Edition. Lea & Fehiger. Philadelphia. 807 pp.
- Soemirat, Juli. 2003. Toksikologi Lingkungan. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 220 halaman.
- Zonneveld, N., Huisman, E.A dan Boon, J.H. 1991. Prinsip-Prinsip Budidaya Ikan. Penerbit PT. Gramedia Pustaka utama. Jakarta.