

Penggunaan ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) sebagai imunostimulan untuk meningkatkan resistensi ikan mas (*Cyprinus carpio* L) terhadap infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*

(The use of baker's yeast as immunostimulant to enhance resistance of carp, *Cyprinus carpio* L, to *Aeromonas hydrophila* infection)

Henky Manoppo¹, Magdalena E.F. Kolopita²

¹⁾ Laboratorium Kesehatan Ikan, Lingkungan dan Toksikologi FPIK Unsrat Manado

Email: hmanoppo@yahoo.com

²⁾ Staf pengajar pada Falkutas Perikanan dan Ilmu Kelautan Unsrat Manado

Email: ida_kolopita@yahoo.co.id

Abstract

A research had been conducted to evaluate the use of baker's yeast as immunostimulant in enhancing the resistance of carp (*Cyprinus carpio* L) to *Aeromonas hydrophila* infection. Experimental fish were obtained from Freshwater Aquaculture Board in Talelu, Minahasa Regency, and transported to the Laboratory of Aquaculture Technology at the Faculty of Fisheries and Marine Science, Sam Ratulangi University. During two weeks of acclimatization process, fingerlings were fed with commercial feed (pellet) at 5% of body weight per day, twice a day. After acclimatization, fish was randomly distributed into 15 aquaria with a density of 25 fishes/aquarium. The doses of yeast cells as treatments included 5, 10, 15 and 20 g yeast/kg of pellet while control pellet not supplemented with yeast cell. Fish was fed with treatment pellets for four consecutive weeks at 5% of body weight per day, twice daily at 09.00 am and 16.00 pm. Afterward, the density of fish were adjusted to 10 fish/aquarium. Fish were then challenged with *A. hydrophila* through intraperitoneal injection of 0.2 mL of *A. hydrophila* suspension containing 1×10^7 cfu/mL. Research result showed that supplementation of yeast cells into fish pellet significantly influenced the resistance of fish to *A. hydrophila* infection ($p < 0,01$). The highest resistance were observed in fish fed pellet supplemented with 5 g yeast/kg of pellet. Thus, supplementation of baker's yeast cells into commercial fish feed was able to increase resistance of carp to *A. hydrophila* infection.

Keywords: baker's yeast, *Cyprinus carpio*, *A. hydrophila*, resistance, intraperitoneal injection

PENDAHULUAN

Usaha budi daya ikan mas telah lama dijalankan oleh masyarakat dan merupakan spesies budi daya unggulan di daerah Sulawesi Utara. Dengan semakin

berkembangnya usaha ini ke arah yang lebih intensif maka semakin banyak pula masalah yang dihadapi pembudidaya ikan dan pengusaha. Masalah utama yang teridentifikasi melalui wawancara dengan pembudidaya ikan adalah tingginya

serangan penyakit serta pertumbuhan ikan lambat.

Tingginya serangan penyakit terutama penyakit infeksius terjadi sebagai akibat dari intensifikasi usaha yang tidak disertai dengan penguasaan teknologi dan pengelolaan yang memadai. Penyakit yang sering menyerang ikan mas di daerah ini adalah penyakit bakterial yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Streptococcus iniae*. Selanjutnya sejak tahun 2006, muncul wabah penyakit Koi Herpes Virus (KHV) yang menyerang ikan mas dan dapat menyebabkan kematian masal dalam waktu singkat. Masalah penyakit ini telah menyebabkan banyak pembudidaya dan pengusaha budi daya menderita kerugian yang signifikan, bahkan banyak pembudidaya dan pengusaha sudah tidak mau lagi memelihara ikan mas sampai sekarang.

Peningkatan kesehatan ikan dan resistensi terhadap berbagai patogen merupakan tantangan utama yang dihadapi pembudidaya dan pengusaha budi daya. Saat ini, beberapa metode pencegahan dan kontrol penyakit yang sering digunakan adalah melalui penggunaan antibiotik/bahan kimia dan vaksin. Namun demikian, Biswas *et al.* (2012a) dan Babu *et al.* (2013) menyatakan bahwa penggunaan antibiotik atau bahan kimia secara intensif atau berulang telah menimbulkan berbagai masalah seperti bioakumulasi, polusi, resistensi patogen (*antibiotic-resistant pathogen*) serta penekanan terhadap sistem imun ikan (*immunosuppression*). Residu antibiotik dapat terakumulasi dalam tubuh ikan, lingkungan dan berbahaya bagi kesehatan manusia (Wu *et al.*, 2013). Penggunaan vaksin telah terbukti sangat efektif dalam

mencegah serangan penyakit pada ikan budi daya. Namun demikian, vaksin bekerja secara spesifik pada patogen tertentu saja sehingga efikasinya sangat terbatas. Vaksin juga belum banyak tersedia di pasaran sehingga harganya masih mahal.

Penggunaan imunostimulan merupakan alternatif bagi penggunaan antibiotik dan bahan kimia. Saat ini, penggunaan imunostimulan untuk mencegah munculnya wabah penyakit dalam usaha budi daya telah mendapat perhatian serius dari para peneliti (Galina *et al.*, 2009). Dibandingkan dengan vaksin yang bekerja secara spesifik pada patogen tertentu, imunostimulan bekerja secara simultan terhadap berbagai patogen dengan cara meningkatkan respon imun nonspesifik ikan maupun udang (Sakai, 1999; Raa, 2000). Imunostimulan juga tidak meninggalkan residu dalam tubuh ikan dan tidak berbahaya bagi lingkungan maupun kesehatan manusia. Imunostimulan bekerja dengan cara mengaktifkan mekanisme pertahanan nonspesifik yang menghasilkan peningkatan aktivitas fagositosis, aktivitas komplemen, lisosim, dan resistensi terhadap penyakit (Divyagnaneswari *et al.*, 2007).

Penggunaan imunostimulan telah menjadi populer dan dapat perhatian khusus selama dekade terakhir ini karena beberapa keunggulannya. Beberapa peneliti mengamati ikan yang diberi makan dengan imunostimulan alami mengalami peningkatan sistem kekebalan tubuh dan nafsu makan ikan meningkat. Dewasa ini terdapat banyak produk alami yang digunakan sebagai sumber imunostimulan seperti tanaman obat

(Kumar *et al.*, 2013; Bilen *et al.*, 2011; Awad and Austin, 2010; Punitha *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2006), rumput laut (Ganeshamurthy *et al.*, 2014), serta ragi (Reyes-Becerril *et al.*, 2008; Sarlin and Philip, 2011; Babu *et al.*, 2013; Sajeewan *et al.*, 2009). Salah satu jenis ragi yang mengandung imunostimulan adalah ragi roti (*S. cerevisiae*). Ragi roti meningkatkan pencernaan pakan dan protein sehingga menghasilkan pertumbuhan dan efisiensi pakan yang lebih baik (Wache' *et al.* 2006). Penambahan ragi roti per kg pakan dapat meningkatkan performa pertumbuhan dan pengambilan pakan serta meningkatkan respon imun non spesifik ikan nila (Abdel-Tawwab *et al.* 2008). serta ragi roti (*S. cerevisiae*) maupun produk samping dari industri ragi roti (*yeast-by product*) (Olivia-Teles and Goncalves 2001).

Hasil-hasil penelitian di atas menunjukkan bahwa penambahan ragi roti dalam pakan dapat meningkatkan imunitas organisme akuatik terhadap sejumlah antigen yang berbeda serta berperan dalam pertumbuhan. Ragi roti (*S. cerevisiae*) dapat menawarkan alternatif bagi pengguna antibiotik atau bahan-bahan kimia sebab bahan ini tidak meninggalkan residu dalam tubuh ikan serta tidak mengakibatkan kerusakan lingkungan. Oleh karena itu, penelitian terhadap penggunaan ragi roti dalam upaya mengontrol penyakit dalam aktivitas budidaya ikan dipandang penting untuk dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji penggunaan ragi roti sebagai imunostimulan untuk meningkatkan resistensi ikan mas terhadap infeksi *A. hydrophila*.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di kolam percobaan Program Studi Budidaya Perairan dan Laboratorium Rekayasa Akuakultur, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan (FPIK) Universitas Sam Ratulangi (UNSRAT).

Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan sebanyak 250 ekor ikan mas berukuran 5-8 cm. Ikan uji diambil dari Balai Besar Budidaya Air Tawar (BBAT) Tatelu, Provinsi Sulawesi Utara.

Bahan Uji

Bahan uji sebagai perlakuan yang digunakan adalah ragi roti komersil dengan merek dagang *Fermipan* sedangkan pakan yang digunakan adalah pakan tenggelam dengan merek dagang *Comfeed* yang memiliki komposisi protein 30%, lemak 6%, serat kasar 5%, abu 10% dan kandungan air 12%. Bakteri untuk ujiantang adalah *Aeromonas hydrophila* yang berasal dari Balai Budidaya Air Tawar (BBAT) Tatelu. Kultur bakteri menggunakan media agar *Trypticase Soy Agar* (TSA).

Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima perlakuan dimana tiap perlakuan memiliki tiga ulangan. Setiap unit percobaan ditempatkan secara acak. Perlakuan imunostimulan ragi roti yang digunakan adalah 0, 5, 10, 15, 20 g ragi roti /kg pakan).

Persiapan Pakan

Bahan uji diberikan pada ikan sebagai perlakuan secara oral yaitu dengan menambahkannya lebih dahulu ke dalam pakan. Caranya, ragi roti pertama-tama ditimbang sesuai dengan dosis yang dibutuhkan, kemudian ragi roti yang telah ditimbang disuspensikan ke dalam 100 ml (untuk pembuatan 1 kg pakan). Suspensi ragi roti selanjutnya dicampur pada pakan dengan cara disemprotkan secara merata, kemudian dikering-anginkan dalam suhu ruang. Setelah kering, pakan dimasukkan dalam kantong plastik kemudian disimpan dalam lemari pendingin (*kulkas*) sampai saat digunakan.

Penyediaan Suspensi Bakteri

Untuk mencegah terjadinya kontaminasi maka alat dan bahan yang digunakan dicuci terlebih dahulu kemudian disterilkan dengan menggunakan autoclave pada suhu $\pm 121^{\circ}\text{C}$ tekanan 2 atm selama 15 – 20 menit. Bakteri *A. hydrophila* selanjutnya dikultur menggunakan media *Triptacase Soy Agar* (TSA).

Prosedur Percobaan dan Pengambilan Data

Ikan yang diperoleh dari BBAT Tatelu dimasukkan ke dalam plastik beroksigen dan diangkut dengan transportasi darat ke kolam percobaan FPIK. Ikan selanjutnya dimasukkan ke dalam lima bak beton berukuran masing-masing $2 \times 1 \times 1 \text{ m}^3$ dengan kepadatan 50 ekor per bak. Sebelum ikan diberi perlakuan, ikan diaklimatisasi terlebih dahulu selama satu minggu. Selama proses aklimatisasi ikan diberi pakan komersil *Comfeed* yang belum ditambahkan ragi roti. Dosis pakan yang diberikan 5%/berat tubuh ikan dan diberikan dua kali sehari

(pagi jam 08.00 dan sore jam 16.00). Selama proses aklimatisasi, kualitas air dipertahankan stabil dengan mengganti air sebanyak 30% dari total air dalam bak. Setiap bak dilengkapi dengan sebuah pintu air masuk (kran), pipa pembuangan dan sebuah pompa air *submersible* yang mengatur resirkulasi air sekaligus berfungsi sebagai aerator.

Setelah proses aklimatisasi selesai, ikan selanjutnya dipindahkan ke dalam 15 akuarium masing-masing dengan kepadatan 25 ekor. Ikan diberi pakan perlakuan dengan dosis 5%/bb/hari dengan frekuensi dua kali sehari (jam 08.00 dan 16.00). Sebagaimana selama proses aklimatisasi, kualitas air selama masa percobaan juga dijaga agar tetap stabil. Pemberian pakan perlakuan berlangsung selama 4 minggu berturut-turut. Selama penelitian berlangsung, suhu air $28\text{-}30^{\circ}\text{C}$ dan pH 6,0-6,9.

Setelah pemberian pakan perlakuan selesai (4 minggu), kepadatan ikan diatur menjadi 10 ekor per akuarium. Ikan kemudian diuji tantang dengan bakteri *A. hydrophila* dengan metoda Injeksi Intraperitoneal (IP) sebanyak 0.2 mL suspensi bakteri mengandung 1×10^7 cfu/mL. Sebelum bakteri disuntikkan pada ikan, dilakukan uji LD-50 (Lethal Dosis) yakni dosis yang menyebabkan kematian pada 50% hewan percobaan. Uji ini dilakukan untuk mengetahui dosis atau konsentrasi bakteri *A. hydrophila* menyebabkan kematian 50 % ikan uji.

Penentuan uji LD-50 dilakukan dengan cara menyuntikan suspensi *A. hydrophila* pada ikan mas dengan konsentrasi 1×10^8 , 1×10^7 , 5×10^6 , 1×10^6 cfu/mL sebanyak 0,2 mL/ekor secara *intraperitoneal* (IP), masing-masing

sebanyak 10 ekor ikan tiap perlakuan. Pengamatan dilakukan selama 7 hari dengan menghitung jumlah ikan yang mati pada masing-masing konsentrasi. Konsentrasi yang menghasilkan mortalitas 50% (LD-50) akan digunakan sebagai konsentrasi untuk ujiantang. Pengamatan resistensi ikan dilakukan setiap hari selama 7 hari. Ikan yang mati dikeluarkan dan diidentifikasi untuk mengkonfirmasi bahwa kematian betul-betul terjadi akibat bakteri *A. hydrophila*.

Resistensi ikan diamati setelah ikan diuji-tantang dengan bakteri (*A. hydrophila*). Selama periode ujiantang ikan diberi pakan standar tanpa penambahan ragi roti sebanyak 3%/bb/hari dan diberikan dua kali sehari (jam 08.00 dan 16.00). Untuk mengukur resistensi ikan maka digunakan data kelangsungan hidup setelah ikan diujiantang dengan formula menurut Efendie (1997):

$$SR (\%) = Nt / No \times 100$$

Dimana:

SR = Kelangsungan Hidup,

Nt = Jumlah ikan hidup pada akhir penelitian

No = Jumlah ikan hidup pada awal penelitian

Analisis Data

Data yang diperoleh dinyatakan dalam bentuk nilai rata-rata \pm stdv. Untuk mengkaji pengaruh perlakuan ragi roti terhadap resistensi, maka dilakukan analisis ragam. Apabila pemberian ragi roti memberikan pengaruh yang nyata maka dilakukan uji lanjut Duncan untuk mengevaluasi perbedaan pengaruh antar perlakuan. Analisis ragam maupun uji lanjut Duncan dikerjakan dengan

menggunakan program *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) untuk windows.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian mendapatkan bahwa penambahan ragi roti dalam pakan benih ikan mas memberikan pengaruh sangat nyata terhadap kelangsungan hidup benih ikan ($p < 0,01$). Setelah 10 hari ikan diujiantang dengan bakteri *A. hydrophila*, kelangsungan hidup ikan tertinggi dicapai pada ikan yang diberi pakan dengan penambahan 5 g sel ragi roti/kg pakan yakni 86,6%. Kelangsungan hidup ikan yang diberi pakan dengan penambahan 10 g sel ragi roti/kg pakan sebesar 76,6%. Secara statistik, kelangsungan hidup ikan pada kedua dosis perlakuan ini berbeda nyata dibandingkan dengan kelangsungan hidup yang diberi pakan tanpa penambahan ragi roti. Pada dosis yang lebih tinggi, kelangsungan hidup nampak semakin menurun dengan bertambahnya dosis (Tabel 1).

Tabel 1. Resistensi ikan mas setelah diujiantang dengan *A. hydrophila*

Dosis ragi roti (g/kg pakan)	Resistensi (%)
0	46,6 \pm 5,7 ^a
5	86,6 \pm 5,7 ^d
10	76,6 \pm 5,7 ^{cd}
15	70 \pm 10 ^b
20	63,3 \pm 5,7 ^b

Superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata

Hasil ini mengindikasikan bahwa dalam aplikasi imunostimulan, dosis dan lama waktu pemberian perlu mendapat perhatian sebab pemberian yang terlalu

lama dengan dosis yang tinggi dapat menekan sistem imun (immunosuppression) ikan (Sakai, 1999). Dosis dan lama waktu pemberian imunostimulan sangat penting dalam manajemen kesehatan ikan (Sajeevan *et al.*, 2009).

Dalam penelitian ini ditemukan bahwa kelangsungan hidup ikan mas terbaik dicapai pada dosis 5-10 g ragi roti/kg pakan. Hasil yang sama juga ditemukan pada penelitian yang telah dilakukan sebelumnya dimana benih ikan nila yang diberi ragi roti 5-10 g/kg pakan memiliki kelangsungan hidup tertinggi setelah diuji tantang dengan bakteri *A. hydrophila* (Manurung *dkk.*, 2013; Manoppo *dkk.*, 2015). Abdel-Tawwab *et al.* (2008) juga menemukan bahwa ikan nila yang diberi pakan dengan penambahan ragi roti 5 g/kg pakan memiliki resistensi yang tinggi terhadap infeksi *A. hydrophila*. Pada ikan Striped bass (berat rata-rata 25,3 g), penambahan 2-4% sel ragi roti dalam pakan selama 9 minggu dan diuji tantang dengan bakteri *S. iniae* tidak mengalami mortalitas sedangkan ikan kontrol memiliki mortalitas 20%.

Ragi roti merupakan bahan pembuat kue yang banyak tersedia di pasar dan mudah diperoleh dengan harga murah. Selain itu, ragi roti kaya akan bahan-bahan imunostimulan terutama β -1-3 glucan (50–60%) dan nukleotida yang dapat merangsang peningkatan sistem kekebalan tubuh ikan dan krustase (Babu *et al.*, 2013; Abdel-Tawwab *et al.*, 2008; Li and Galtin, 2003, 2006).

β -glucan yang terkandung dalam ragi roti mampu meningkatkan respon imun, resistensi terhadap patogen serta

pertumbuhan ikan nila (Jamal, 2013), ikan mas (Sahan dan Duman, 2010), ikan koi (Lin *et al.*, 2011), *Labeo rohita* (Misra *et al.*, 2006). Nukleotida juga memberikan efek yang sama pada ikan. Nukleotida merupakan nutrisi semi esensial yang penting untuk fungsi fisiologi dan biokimia seperti penandaan, penerusan informasi genetik, energi metabolisme, *cell signaling* serta sebagai koenzim, *allosteric effectors* dan *cellular agonists* (Li and Galtin, 2006). Hasil-hasil penelitian memperlihatkan bahwa penambahan nukleotida dalam pakan dapat meningkatkan respon imun, resistensi dan pertumbuhan ikan salmon (Burrels *et al.*, 2001), ikan grouper (Lin *et al.*, 2009), ikan nila (Labora, 2012), ikan lele (Sukenda *dkk.*, 2010), udang vaname (Manoppo *dkk.*, 2009). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ikan nila yang diberi nukleotida memiliki pertumbuhan 35% lebih besar dibandingkan dengan ikan kontrol (Labora, 2012). Manoppo *dkk.* (2009) melaporkan udang vaname yang diberi nukleotida memiliki pertumbuhan sekitar 35% lebih besar dibandingkan dengan udang kontrol.

Penambahan sel utuh ragi roti dalam pakan ikan juga mampu meningkatkan respon imun dan pertumbuhan ikan nila (El-Boshy 2010; Manurung *dkk.*, 2013; Manoppo dan Kolopita, 2015; Rawung dan Manoppo, 2014, Abdel-Tawwab *et al.*, 2008) serta mampu meningkatkan resistensi ikan nila terhadap bakteri *A. hydrophila* (Manurung *dkk.*, 2013), ikan mas (Biswas *et al.* 2012a), ikan *Labeo rohita* (Tewary and Patra, 2011), udang *Marsupenaeus japonicus* (Biswas *et al.*, 2012). Manurung *dkk.* (2013) melaporkan bahwa ikan nila (berat rata-rata 10,57 g) yang diberi pakan

dengan penambahan 10 g sel ragi roti selama empat minggu memiliki berat akhir rata-rata 18,66 g atau 32% lebih berat dari ikan kontrol yang hanya mencapai berat 14 g. Rawung dan Manoppo (2014) juga mendapatkan ikan nila (berat rata-rata 9 g) yang diberi perlakuan 10 g sel ragi ragi memiliki berat tubuh 38% lebih besar dari ikan kontrol. Dalam penelitian

Ragi roti mampu meningkatkan resistensi ikan terhadap infeksi patogen karena sel ragi mengandung bahan-bahan imunostimulan seperti β -glucan, nukleotida, mannan, oligosaccharides dan chitin (Reyes-Becerril *et al.*, 2008; Li and Galtin, 2003; Biswas *et al.*, 2012a). Menurut Rumsey *et al.* (1992), sel ragi mengandung 0.9% purine dan pyrimidine, ekstrak ragi mengandung 2.3%. Bahan-bahan ini dapat meningkatkan respon imun non spesifik ikan sehingga ikan memiliki resistensi yang tinggi terhadap berbagai patogen (Sakai, 2001). Menurut Divyagnaseswari (2007), bahan-bahan imunostimulan akan meningkatkan aktivitas fagositosis, komplemen, lisosim, serum Ig dan menghasilkan peningkatan resistensi penyakit. Selvaraj *et al.* (2005) melaporkan bahwa ikan mas yang diberi 500 μ g of β -glucan dan diuji tantang dengan bakteri *A. hydrophila* memiliki kelangsungan hidup yang tinggi dibandingkan dengan ikan kontrol. Sahan *et al.* (2010) juga melaporkan ikan mas yang diberi ragi roti memiliki resistensi yang lebih tinggi dibandingkan dengan ikan kontrol yang diberi pakan tanpa penambahan ragi roti. Pada ikan koi, penambahan β -glucan dalam pakan selama 56 days memperlihatkan peningkatan respon imun, pertumbuhan dan kelangsungan hidup (Lin *et al.*, 2011).

Pada udang yang diberi ragi roti, kelangsungan hidup mencapai 66,6% sedangkan udang kontrol hanya 8,3% (Biswas *et al.*, 2012b).

KESIMPULAN

Hasil penelitian mendapatkan bahwa penambahan ragi roti dalam pakan mampu meningkatkan resistensi benih ikan mas terhadap infeksi bakteri *A. hydrophila*

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menghaturkan banyak terima kasih kepada Universitas Sam Ratulangi Manado-Indonesia atas dukungan dana penelitian. Penulis juga berterima kasih kepada Manajemen Laboratorium Teknologi Akuakultur atas penggunaan fasilitas laboratorium selama pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Tawwab M, Abdel-Rahman AM, Ismael NEM., 2008. Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for fry Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 280: 185-189.
- Awad E, Austin B. 2010. Use of *Lupinus perennis*, mango, *Mangifera indica*, and stinging nettle, *Urtica dioica*, as feed additive to prevent *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 33: 413-420

- Babu DT, Antony SP, Joseph SP, Bright AR, Philip R. 2013. Marine yeast *Candida aquatextoris* S527 as a potential immunostimulant in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 122: 243-252
- Bilen S, Bulut M, Bilen AM. 2011. Immunostimulant effects of *Cotinus coggyria* on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*. 30: 451-455
- Biswas G, Korenaga H, Takayama H, Kono T, Shimokawa H, Sakai M. 2012a. Cytokine responses in the common carp, *Cyprinus carpio* L. treated with baker's yeast extract 356-357: 169-175
- Biswas G, Korenaga H, Nagamine R, Kono T, Shimokawa H, Itami T, Sakai M., 2012b. Immune stimulant effects of a nucleotide-rich baker's yeast Extract in the kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Aquaculture*, 2012, 366-367: 40-45.
- Burrels C, Williams PD, Fomo PF. 2001. Dietary nucleotide: A novel supplement in fish feed effects on resistance to disease in salmonids. *Aquaculture* 199 : 159 – 169
- Divyagnaseswari M, Christyapita D, Michael RD. 2007. Enhancement of nonspecific immunity and disease resistance in *Oreochromis mossambicus* by *Solanum trilobatum* leaf fractions. *Fish & Shellfish Immunology* 23: 249-259
- El-Boshy ME. 2010. Immunomodulatory Effect of Dietary *Saccharomyces cerevisiae*, β -glucan and Laminaran in Merciric Chloride Treated Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* and Experimentally Infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* 28 : 802 - 808.
- Effendie MI. 1979. Metode Biologi Perikanan. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Ganeshamurthy R, Dhayanithi NB, Kumar TTA, Kumaresan S. 2014. Evaluation of antibacterial activity and immunostimulant of red seaweed *Chondrococcus hornemanni* (Kuetzing, 1847) against marine ornamental fish pathogen. *Journal of Coastal Life Medicine*. 2(1): 64-69
- Galina J, Yin G, Ardo L, Jeney Z. 2009. The use of immunostimulating herbs in fish. An overview of research. *Fish Physiol Biochem* 35:669-676
- Jamal IN. 2013. Penggunaan β -Glukan yang di Ekstrak Dari Ragi Roti *saccharomyces cerevisiae* Untuk Meningkatkan Sistem Imun Non Spesifik Ikan Nila (*Oreochromis Niloticus*). (Thesis). Pascasarjana Universitas Sam Ratulangi Manado-Indonesia
- Kumar S, Raman RP, Pandey PK, Mohanty S, Kumar A, Kumar K. 2013. Effect of orally administered azadirachtin on non-specific immune parameters of goldfish *Carassius auratus* (Linn. 1758) and resistance against *Aromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* 34 : 564-573

- Labora M. 2012. Peningkatan respon imun non-spesifik dan pertumbuhan ikan nila melalui pemberian nukleotida. Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan UNSRAT (Skripsi). Manado.
- Li P, Galtin DM. 2003. Evaluation of brewers' yeast. (*Saccharomyces cerevisiae*) as a feed supplement for hybrid striped bass (*Marone chrysops x M. saxatillis*). *Aquac* 219: 681-692
- Li P, Galtin DM. 2006. Nucleotide nutrition in fish: Current knowledge and future application. *Aquaculture* 251 : 141 – 152
- Lin YH, Wang H, Shiau SY. 2009. Dietary nucleotide supplementation enhance growth and immune response of grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquac Nut* 15: 117-122
- Lin S, Pan Y, Luo L. 2011. Effects of dietary β -glucan, chitosan or raffinose on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). *Fish & Shellfish Immunology* 31: 788-794
- Manoppo H, Kolopita MEF. 2015. Pengimbuhan ragi roti dalam pakan meningkatkan respons imun nonspesifik dan pertumbuhan ikan nila. *Jurnal Veteriner* Vol 16 No 2 (Terakreditasi DIKTI)
- Manoppo H, Sukenda, Djokosetyanto D, Fatuchri M, Harris E. 2009. Nukleotida meningkatkan respon imun dan performa pertumbuhan udang vaname, *Litopenaeus vannamei*. *Jurnal Aquacultura Indonesiana* Vol. 10 (2): 85-92
- Manoppo H, Tumbol RA, Manurung UN. Incorporation of baker's yeast cells as immunostimulant in feed enhance resistance of Nile tilapia to *Aeromonas hydrophila*. *International Journal of PharmTech Research*, 2015, 8 (5): 797-802
- Manurung UN, Manopoo H, Tumbol RA. 2013. Evaluasi ragi roti (*S. cerevisiae*) sebagai imunostimulan dalam meningkatkan respon imun non spesifik dan pertumbuhan ikan nila (*Oreochromis Niloticus*). *Jurnal Budi daya Perairan*. 1: 8-14
- Misra CK, Das BK, Mukherjee SC, Pattnaik P. 2006. Effect of multiple injections of β -glucan on non-specific immune response and disease resistance in Labeo rohita fingerlings. *Fish & Shellfish Immunology* 20: 305-319.
- Olivia-Teles A, Goncalves P. 2001. Partial replacement of fishmeal by brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, in diets for sea bass *Dicentrarchus labrax* juveniles. *Aquaculture* 202: 269-278
- Punitha SMJ, Babu MM, Sivaram V, Shankar VS, Dhas SA, Mahesh TC, Immanuel G, Citarasu T. 2008. Immunostimulating influence of herbal biomedicines on nonspecific immunity in Grouper *Epinephelus tauvina* juvenile against *Vibrio harveyi* infection. *Aquacult int* 16:511-523
- Raa J. 2000. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. University of Tromso Norway.

- Rawung ME, Manoppo H. 2014. Penggunaan ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) secara *in situ* untuk meningkatkan respon kebal non-spesifik ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Jurnal Budi daya Perairan Vol. 2 No. 2: 7-14
- Reyes-Becerril M, Tovar-Ramirez D, Ascensio-Valle F, Civera-Cerecedo R, Gracia-Lopez V, Barbosa-Solomieu V. 2008. Effects of dietary live yeast *Debaryomyces* on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress. *Aquaculture* 280: 39-44
- Rumsey GL, Winfree RA, Hughes SG. 1992. Nutritional value of dietary nucleic acid and purine bases to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 108: 97-110
- Sahan A, Duman S. 2010. Effect of β Glucan on Hematology of Common Carp (*Cyprinus Carpio*) Infected by Ectoparasites. *Mediterranean Aquaculture* (1): 1-7.
- Sajeevan TP, Philip R, Singh ISB. 2009. Dose/frequency: a critical factor in the administration of glucan as immunostimulant to Indian white shrimp *Fennerppenaeus indicus*. *Aquaculture* 287: 248-252
- Sakai, M., 1999. Current Research Status of Fish Immunostimulan. *Aquaculture* 172 : 63-92.
- Sakai M, Taniguchi K, Mamoto K, Ogawa H, Tabata M. 2001. Immunostimulant effects of nucleotide isolated from yeast RNA on carp, *Cyprinus carpio* L. *J Fish Dis* 24: 433-438
- Sarlin PJ, Philip R. 2011. Efficacy of marine yeast and baker's yeast as immunostimulants in *Fenneropenaeus indicus*: A comparative study. *Aquaculture* 321: 173-178
- Selvaraj V. 2005. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp *Cyprinus carpio* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* 19 : 293 - 306.
- Sukenda, Putri FE, Wahyuningrum D, Manoppo H. 2010. Penggunaan nukleotida untuk meningkatkan resistensi ikan lele terhadap infeksi *Aeromonas hydrophila*., 2010. *Jurnal Aquacultura Indonesiana* Vol 11 NO. 1: 41-47
- Tewary A, Patra BC. 2011. Oral administration of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) acts as a growth promoter and immunomodulator in *Labeo rohita* (Ham.). *Journal of Aquaculture Research and Development* 2:1-7
- Wache' Y, Auffray F, Gatesoupe FL, Zurrbonino J, Gayet V, Labbe' L, Quentel C. 2006. Cross effect of the strain dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing condition on the onset of intestinal micro biota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss* fry. *Aquaculture* 258:470-478

Wu YR, Gong QF, Fang H, Liang WW, Chen M, He RJ. 2013. Effect of *Sophora flavescens* on non-specific immune response of tilapia (GIFT *Oreochromis niloticus*) and disease resistance against *Streptococcus agalactiae*. *Fish & Shellfish Immunology* 34 : 220-227

Yin G, Jeney G, Racs T, Xu P, Jun X, Jeney Z. 2006. Effect of two Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) on nonspecific immune system of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 253:39-47.