

Evaluation of The Use of Garlic (*Allium sativum*) in Enhancing Nonspecific Immune Response and Growth of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Gercyana A. Marentek, Henky Manoppo, Sammy N. J. Longdong

ABSTRACT

The objective of this research was to examine the effect of garlic (*Allium sativum*) at different doses on nonspecific immune response and growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Experimental fish was Nile tilapia measuring 8-15 cm with an average weight of 10.4 g per individual. Before used in the experiment, fish were reared in fiber tank for two weeks for acclimatization. After acclimatization, the fish were moved into glass aquarium (50 cm x 30 cm x 30 cm) at the density of 15 fish/aquarium. Each aquarium was equipped with aerator. Five doses of garlic as treatments used in this research consisted of A= 0 g/kg diet, B= 10 g/kg, C= 20 g/kg, D= 30 g/kg and E= 40 g/kg. Fish was fed experimental diet at a dose of 5% of body weight per day, twice a day at 08.00 and 17.00. Data collected at the end of the experiment included immune parameters (TLC and phagocytosis activity) and growth of fish. ANOVA was used to evaluate the effect of treatments on immune response and growth of fish while Duncan Test was used to evaluate the different effect between treatments. Research result showed that after four weeks of feeding, TLC of fish fed diet supplemented with garlic significantly different ($p < 0,01$) as compared to that of control fish. The highest number of TLC was observed at treatment C (15.413×10^7 cell.ml⁻¹) followed by treatment B (15.39×10^7 cell.ml⁻¹), D ($13,920 \times 10^7$ cell.ml⁻¹), E ($13,582 \times 10^7$ cell.ml⁻¹) and A ($12,195 \times 10^7$ cell.ml⁻¹). TLC of fish in treatment C was different significantly compared to control as well as to other treatments. Phagocytosis activity of fish in treatment C also increased significantly ($p < 0,01$) compared to control. The highest PA was achieved in treatment C and then treatment B, D, E and A. Growth of fish in treatment C was different significantly compared to control fish as well as other treatments. As conclusion, oral administration of garlic at 20 g/kg diet could enhance nonspecific immune response and growth of Nile tilapia.

Key words: Garlic, Immune response, Total leukocyte count, Phagocytosis activity, Growth

PENDAHULUAN

Penyakit merupakan masalah utama dalam produksi akuakultur dan telah menyebabkan kerugian ekonomi. Pengendalian perluasan penyakit harus dilakukan sedini mungkin, agar tidak terjadi wabah penyakit yang menyebabkan kerugian. Beberapa metode yang telah diterapkan dalam mengontrol penyakit antara lain penggunaan antibiotik atau bahan kimia, vaksin, probiotik, penggunaan SPF/SPR, dan biosekuriti (Namikoshi *et al.* 2004; Witterveldt *et al.* 2003).

Fazlolahzadeh *et al.* (2011) menyatakan bahwa vaksinasi dapat mencegah terjadinya wabah penyakit, tetapi vaksin bersifat

spesifik, yaitu hanya melawan patogen tertentu. Pada udang, penggunaan vaksin (*formalin-inactivated WSSV*, *recombinant protein WSSV*) telah mulai diteliti dan memperlihatkan hasil yang menjanjikan meskipun udang tidak memiliki sistem imun spesifik (Namikoshi *et al.* 2004; Witterveldt *et al.* 2003).

Penggunaan antibiotik merupakan metoda kontrol penyakit yang telah lama dan paling banyak diterapkan dalam aktivitas budidaya. Namun demikian, pemberian antibiotik dalam kolam telah mengakibatkan munculnya patogen yang tahan terhadap penyakit (*antibiotic-resistant pathogen*). Metode pencegahan lain yaitu menggunakan imunostimulan. Imunostimulan banyak

digunakan baik pada ikan maupun udang sebagai alternatif bagi penggunaan bahan kimia atau obat-obatan sebab, tidak seperti antibiotik, imunostimulan tidak meninggalkan residu dalam tubuh ikan serta aman bagi lingkungan (Alifuddin, 2002).

Imunostimulan meningkatkan resistensi terhadap penyakit infeksius. Bukan dengan cara meningkatkan respon imun spesifik, tetapi dengan cara meningkatkan mekanisme pertahanan non-spesifik (Sakai, 1999). Imunostimulan bekerja dengan cara mengaktifkan sel-sel leukosit (Raa, 2000).

Penggunaan imunostimulan dalam budidaya dapat berasal dari bahan alami maupun sintetik. Bahan alami tidak menimbulkan efek samping negatif pada lingkungan dan juga pada manusia sebagai konsumen. Salah satu bahan alami yang dapat digunakan adalah bawang putih (*Allium sativum*). Bawang putih meningkatkan kelangsungan hidup ikan dan dapat membantu dalam mengendalikan patogen, terutama bakteri dan jamur (Corzo-Martinez *et al.* 2007 dalam Fazlolahzadeh *et al.* 2011).

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengkaji pengaruh penggunaan bawang putih dengan dosis berbeda terhadap respon imun non-spesifik dan pertumbuhan ikan nila.

BAHAN DAN METODE

Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah ikan nila berukuran 8 – 10 cm dengan berat rata-rata 10,4 g/ekor sebanyak 150 ekor. Ikan yang diuji diperoleh dari Balai Pengembangan dan Pembinaan Pembudidayaan Ikan Tateli, milik Dinas Kelautan dan Perikanan Provinsi Sulawesi Utara. Penelitian dilakukan di Balai Pengembangan dan Pembinaan Pembudidayaan Ikan, Balai Pengendalian Hama Penyakit Ikan dan Kesehatan Lingkungan Tateli, dan Laboratorium Patologi dan Klinik Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Sam Ratulangi.

Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan adalah bawang putih dalam bentuk bubuk yang diperoleh dari supermarket.

Persiapan Pakan

Bahan uji ditimbang sesuai dengan dosis yang ditentukan yaitu 10 g, 20 g, 30 g dan 40 g. Bahan yang telah ditimbang dilarutkan ke dalam 100 ml air (10 % /kg berat pakan) kemudian dicampurkan ke pakan pellet (Comfeed) dengan cara menyemprotkan bahan uji secara merata dengan menggunakan *sprayer*. Pakan kemudian dengan cara diangin-anginkan dan setelah kering, campuran pakan dan bahan uji *dicoating* (dilapisi) dengan menggunakan kuning telur dan dikering-anginkan kembali.

Prosedur Percobaan dan Pengambilan Data

Sebelum digunakan dalam penelitian, ikan uji dipelihara di dalam bak fiber selama 2 minggu untuk proses aklimatisasi. Selama proses aklimatisasi, ikan diberi pakan pellet yang sama dengan pakan yang akan diberi perlakuan akan tetapi belum diberi bahan uji. Pellet diberikan dengan dosis 5 % dari berat badan/hari dengan frekuensi 2 kali sehari yaitu pada pukul 08.00 dan pukul 17.00. Selama periode aklimatisasi, kualitas air dijaga agar tetap berada dalam kondisi yang baik. Pergantian air juga dilakukan setiap 2 – 3 hari sekali sebanyak 50% tergantung pada kondisi air.

Setelah proses aklimatisasi selesai, ikan uji dengan berat rata-rata $10,4 \pm 1,34$ g dipindahkan ke dalam wadah percobaan berupa akuarium kaca dengan ukuran 50 cm x 30 cm x 30 cm dengan kepadatan 15 ekor/akuarium. Setiap akuarium dilengkapi dengan aerator.

Selanjutnya, ikan diberi pakan yang telah ditambahkan dengan bawang putih sebagai perlakuan. Perlakuan yang digunakan adalah A= 0 g bawang putih/kg pakan, B= 10 g bawang putih/kg pakan, C= 20 g bawang putih/kg pakan, D= 30 g bawang putih/kg pakan, E= 40 g bawang putih/kg pakan. Pakan diberikan dengan dosis 5 % dari berat badan/hari dengan frekuensi 2 kali sehari yaitu pada pukul 08.00 dan pukul 17.00. Percobaan dilakukan selama empat minggu.

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah data parameter imun dan data pertumbuhan mutlak ikan nila.

1. Parameter Imun

Untuk kebutuhan pengamatan parameter imun, dilakukan pengambilan sampel darah ikan. Darah diambil dari 3 ekor ikan dari setiap akuarium dengan menggunakan spuit berukuran 1 ml. Sebelum digunakan, spuit dibilas terlebih dahulu dengan antikoagulan (heparin). Sampel darah sebanyak 0,5 ml diambil dari vena caudalis (*caudal vein*) yang berada di bawah tulang belakang. Darah yang telah diambil, dimasukkan ke dalam tabung eppendorf yang sebelumnya telah dibilas dengan heparin (Sigma-Aldrich #H4784) agar tidak terjadi penggumpalan.

a. Total Leukosit

Untuk menghitung TLC, maka pertama-tama diambil 50 μ l sampel darah kemudian ditambahkan larutan Turks sebanyak 500 μ l (perbandingan 1:10) di dalam tabung eppendorf. Campuran larutan kemudian dihomogenkan dengan cara diayun perlahan-lahan agar tidak merusak sel darah. Setelah itu campuran larutan diinkubasi selama 3 – 5 menit dalam suhu ruang. Selanjutnya dilakukan perhitungan total leukosit dengan menggunakan haemocytometer di bawah mikroskop binokuler dengan pembesaran 40 kali.

b. Aktivitas Fagositosis

Untuk mengukur aktivitas fagositosis, pertama-tama sampel darah diambil sebanyak 50 μ l lalu dimasukkan ke dalam tabung eppendorf dan ditambahkan suspensi zymosan dengan volume yang sama yaitu 50 μ l dengan menggunakan mikro pipet. Campuran darah dan zymosan kemudian dihomogenkan dengan cara digoyang secara perlahan-lahan. Selanjutnya diinkubasi selama 20 menit dalam suhu ruang. Setelah itu 5 μ l sampel darah diambil untuk dibuat menjadi sediaan ulas dan dikering-anginkan. Setelah kering dilakukan pewarnaan dengan larutan giemsa. Pengamatan fagositosis dilakukan dengan mengamati sediaan ulas di bawah mikroskop binokuler pada pembesaran 100 kali. Aktivitas fagositosis (AF) dihitung berdasarkan pengamatan pada 50 – 100 sel fagosit dan dihitung dengan formula:

Aktivitas Fagositosis (%) =

$$\left\{ \frac{(\text{Jumlah fagosit yang melakukan fagositosis})}{\text{Jumlah fagosit teramati}} \right\} \times 100$$

2. Pertumbuhan Mutlak

Pada awal dan akhir percobaan, ikan ditimbang terlebih dahulu menggunakan timbangan digital dengan ketelitian 1 g untuk mendapatkan berat awal dan berat akhir. Pertumbuhan mutlak ikan dihitung berdasarkan selisih berat ikan pada akhir percobaan (Wt) dan berat ikan pada awal (Wo) dengan formula (Effendie, 1979):

$$\Delta G = Wt - Wo$$

Analisis Data

Data yang diperoleh dinyatakan dalam bentuk nilai rata-rata \pm Stdv. Untuk melihat apakah perlakuan yang diberikan berpengaruh terhadap respon imun dan pertumbuhan ikan, maka dilakukan analisis ragam. Sedangkan untuk melihat pengaruh perbedaan antar perlakuan, maka dilakukan uji Duncan.

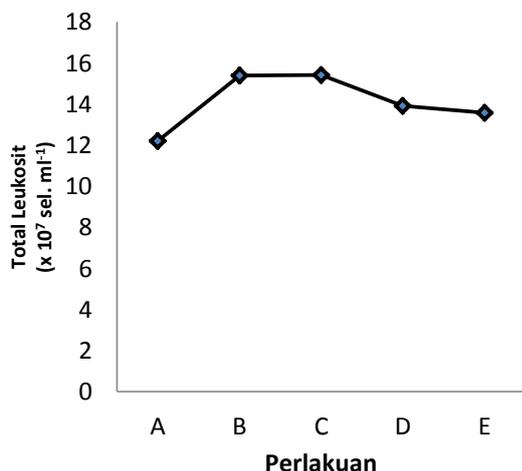
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil yang diperoleh dalam penelitian selama 4 minggu meliputi respon imun non spesifik (total leukosit dan aktifitas fagositosis) dan pertumbuhan mutlak. Adapun pH air selama penelitian berkisar antara 6,0 – 6,9 dengan kandungan DO berkisar antara 5,2 – 5,4 ppm dan suhu 28 – 30 °C.

1. Respon Imun Non Spesifik

a. Total Leukosit

Hasil penghitungan total leukosit ikan nila selama penelitian dengan pemberian perlakuan bawang putih ditunjukkan pada Gambar 1 berikut.



Gambar 1. Total Leukosit Rata-rata (x10⁷ sel.ml⁻¹) Ikan Nila Setelah diberi Pakan dengan enambahan Bawang Putih Setelah 4 Minggu

Hasil analisis ragam menunjukkan setelah diberikan pakan perlakuan selama 4 minggu, pemberian pakan perlakuan berpengaruh sangat nyata terhadap peningkatan total leukosit ikan nila (p<0,01).

Tabel 1. Analisis Ragam Pengaruh Pemberian Perlakuan Bawang Putih Terhadap Total Leukosit Ikan Nila

Sumber Keragaman	JK	db	KT	F	Sig.
Antar Perlakuan	21.989	4	5.497	20.996	.000
Dalam Perlakuan	2.618	10	.262		
Total	24.607	14			

Rata-rata total leukosit tertinggi dicapai pada perlakuan C (15,413 x 10⁷ sel.ml⁻¹), diikuti berturut-turut B (15,39 x 10⁷ sel.ml⁻¹), D (13,920 x 10⁷ sel.ml⁻¹), E (13,582 x 10⁷ sel.ml⁻¹) dan A (12,195 x 10⁷ sel.ml⁻¹).

Hasil uji lanjut Duncan memperlihatkan bahwa setelah diberikan selama 4 minggu perlakuan D dan E berbeda nyata dibandingkan dengan perlakuan A, tetapi antar perlakuan D dan E tidak berbeda nyata. Perlakuan C dan B berbeda nyata dibandingkan dengan perlakuan D, E dan A, namun demikian antar perlakuan C dan B tidak berbeda nyata. Meskipun perlakuan C dan B tidak berbeda nyata secara statistik, namun secara kuantitatif total leukosit ikan yang diberi perlakuan C lebih banyak dibandingkan dengan perlakuan B. Hasil Uji Lanjut Duncan dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 2. Uji Lanjut Duncan Total Leukosit Ikan Nila Setelah 4 Minggu Diberi Pakan Perlakuan

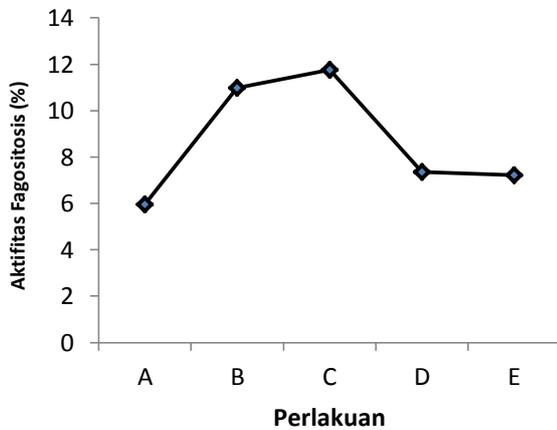
Perlakuan	N	α = 0.05		
		1	2	3
A	3	12.19567		
E	3		13.58233	
D	3		13.92000	
B	3			15.39533
C	3			15.41333

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan bawang putih dalam pakan ikan nila pada dosis 10 dan 20 g bawang putih/kg pakan dan diberikan selama 4 minggu mampu meningkatkan total leukosit ikan nila. Bawang putih dapat meningkatkan leukosit ikan sebab bahan ini mengandung allin. Menurut Kemper (2000), allin secara nyata meningkatkan perbanyakan sel leukosit. Selain itu, allin juga meningkatkan produksi IL-1-beta TNF alfa, dan meningkatkan kapasitas pemangsaan sel-sel fagosit.

Hasil yang sama dilaporkan oleh Nya dan Austin (2009), dimana ikan Rainbow Trout berukuran rata-rata 15 g/ekor yang diberi pakan dengan penambahan bawang putih 10 g/kg pakan selama 14 hari memiliki jumlah leukosit yang lebih banyak dibandingkan dengan ikan kontrol. Fazlolahzadeh *et al.* (2011) juga melaporkan bahwa penambahan bawang putih dalam pakan ikan dapat meningkatkan total leukosit. Ikan Rainbow Trout berukuran rata-rata 50±5 g yang diberi pakan dengan penambahan 0,6 g tepung bawang putih/kg pakan selama 58 hari memiliki total leukosit yang lebih tinggi dibandingkan dengan ikan yang diberi pakan tanpa penambahan bawang putih. Menurut Fazlolahzadeh *et al.* (2011), penambahan bawang putih pada ikan meningkatkan jumlah eritrosit, hemoglobin, leukosit dan trombosit. Bawang putih memiliki beberapa bagian yang mungkin memainkan peranan penting dalam merangsang sistem imun dan dalam fungsi organ yang berhubungan dengan pembentukan sel darah seperti *thymus*, *spleen* dan *bone marrow*.

b. Aktifitas Fagositosis

Hasil pengamatan aktifitas fagositosis ikan nila selama penelitian dengan perlakuan bawang putih ditunjukkan dalam Gambar 2 berikut.



Gambar 2. Aktifitas Fagositosis Sel (%) Ikan Nila Setelah diberi Pakan dengan Penambahan Bawang Putih Selama 4 Minggu

Hasil analisis ragam menunjukkan setelah diberikan pakan perlakuan selama 4 minggu, pemberian pakan perlakuan berpengaruh sangat nyata terhadap aktifitas fagositosis ikan nila ($p < 0,01$). Dari tabel di atas dapat dilihat aktifitas fagositosis tertinggi dicapai pada perlakuan C dengan aktifitas sebesar 11,763%, diikuti dengan perlakuan B sebesar 10,993%, perlakuan D sebesar 7,360%, perlakuan E sebesar 7,220% dan perlakuan A sebesar 5,950%.

Tabel 3. Analisis Ragam Pengaruh Pemberian Perlakuan Bawang Putih Terhadap Aktifitas Fagositosis Ikan Nila

Sumber Keragaman	JK	db	KT	F	Sig.
Antar Perlakuan	78.548	4	19.637	5.432	.014
Dalam Perlakuan	36.148	10	3.615		
Total	114.696	14			

Hasil uji lanjut Duncan menunjukkan bahwa setelah diberikan perlakuan selama 4 minggu, perlakuan C dan B berbeda nyata dengan perlakuan D, E dan A. Tetapi antar perlakuan D, E dan A tidak berbeda nyata. Meskipun perlakuan C dan B tidak berbeda nyata secara statistik, tetapi secara kuantitatif

ikan pada perlakuan C lebih tinggi aktifitas fagositosisnya dibandingkan dengan ikan pada perlakuan B. Hasil uji lanjut Duncan dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 4. Uji Lanjut Duncan Aktifitas Fagositosis Ikan Nila Setelah 4 Minggu Diberi Pakan Perlakuan

Perlakuan	N	$\alpha = 0.05$	
		1	2
A	3	5.95000	10.99333 11.76333
E	3	7.22000	
D	3	7.36000	
B	3		
C	3		

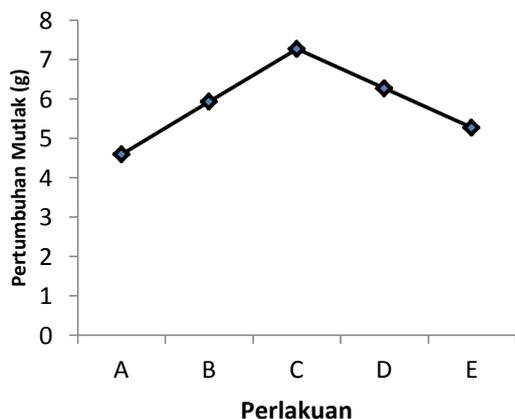
Dalam penelitian ini terlihat bahwa hasil terbaik dicapai pada perlakuan C yaitu 20 g bawang putih/kg pakan. Pada dosis ini, total leukosit ikan juga mencapai jumlah tertinggi dibandingkan dengan perlakuan lain (Gambar 1). Hal ini terjadi karena saat ikan dalam keadaan normal, jumlah leukosit berkorelasi positif dengan aktifitas fagositosis. Dengan kata lain, semakin tinggi jumlah leukosit semakin tinggi pula aktifitas fagositosisnya. Menurut Kemper (2000), selain meningkatkan perbanyakan sel dan produksi IL-1-beta TNF alfa, allin yang terdapat dalam bawang putih juga meningkatkan aktifitas fagositosis dari sel-sel fagosit.

Hasil penelitian Nya dan Austin (2009) menunjukkan bahwa aktifitas fagositosis sangat dipengaruhi oleh penambahan bawang putih ke dalam pakan ikan. Ikan Rainbow Trout berukuran rata-rata 15 g yang diberi pakan dengan penambahan bawang putih 10 g/kg pakan secara nyata memiliki aktifitas fagositosis yang lebih tinggi dibandingkan dengan ikan yang diberi tambahan 5 g bawang putih maupun dengan ikan kontrol.

Menurut Nya dan Austin (2009), mekanisme bawang putih dalam merangsang sistem imun ikan terjadi karena adanya rangsangan dari Lectin. Lectin merupakan protein yang banyak terdapat pada bawang putih dimana bahan ini akan mengikat pada sel bakteri dan selanjutnya merangsang fagositosis.

2. Pertumbuhan Mutlak

Penimbangan berat ikan untuk mendapatkan data pertumbuhan mutlak, dilakukan setiap 2 minggu sekali. Hasil penimbangan berat ikan uji dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 3. Pertumbuhan mutlak Ikan Nila Setelah diberi Pakan dengan Penambahan Bawang Putih Selama 4 Minggu

Hasil analisis ragam menunjukkan setelah 4 minggu pemberian perlakuan, penambahan bawang putih dalam pakan berpengaruh sangat nyata terhadap pertumbuhan ikan nila ($p < 0,01$). Dari tabel data pertumbuhan di atas dapat dilihat bahwa peningkatan pertumbuhan tertinggi dicapai oleh perlakuan C dengan perolehan berat 7,266 g, diikuti berturut-turut perlakuan D 6,266 g, perlakuan B 5,933 g, serta perlakuan E dan A masing-masing 5,266 g dan 4,600 g. Pada akhir minggu keempat, perolehan berat ikan pada perlakuan C mencapai 69,80% dari berat awal atau 25,57% lebih berat dari ikan yang tidak diberi perlakuan (A) bawang putih yang hanya mencapai 44,23% dari berat awal.

Tabel 5. Analisis Ragam Pengaruh Pemberian Perlakuan Bawang Putih Terhadap Pertumbuhan Ikan Nila

Sumber Keragaman	JK	Db	KT	F	Sig.
Antar Perlakuan	12.267	4	3.067	6.571	.007
Dalam Perlakuan	4.667	10	.467		
Total	16.933	14			

Hasil uji lanjut Duncan menunjukkan perlakuan C berbeda nyata dibandingkan dengan perlakuan B, E, dan A, namun tidak berbeda nyata jika dibandingkan dengan perlakuan D. Perlakuan D tidak berbeda nyata dibandingkan dengan perlakuan B dan E tetapi berbeda nyata jika dibandingkan dengan perlakuan A. Antar perlakuan E dan A tidak terdapat perbedaan nyata. Hasil penelitian ini mendapatkan bahwa pertumbuhan ikan terbaik dicapai pada perlakuan C. Meskipun secara statistik C dan D tidak berbeda nyata, tetapi secara kuantitatif perlakuan C memiliki perolehan berat yang lebih besar dibandingkan dengan perlakuan D. Hasil uji lanjut Duncan dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 6. Uji Lanjut Duncan Pertumbuhan Mutlak Ikan Nila Setelah 4 Minggu Diberi Pakan Perlakuan

Perlakuan	N	$\alpha = 0.05$		
		1	2	3
A	3	4.6000		
E	3	5.2667	5.2667	
B	3		5.9333	
D	3		6.2667	6.2667
C	3			7.2667

Shalaby *et al.* (2006) melakukan penelitian serupa pada ikan nila dengan menggunakan pakan dengan penambahan bawang putih 10, 20, 30 dan 40 g/kg pakan. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa ikan nila berukuran rata-rata 7 g yang diberi pakan dengan penambahan 30 g bawang putih/kg pakan memiliki performa pertumbuhan yang paling tinggi dengan FCR yang paling rendah. Ali *et al.* (2008) juga melaporkan bahwa penggunaan bawang putih dalam pakan ikan secara signifikan meningkatkan pertumbuhan. Bawang putih dapat meningkatkan pertumbuhan ikan sebab bawang putih memiliki bahan aktif antara lain allicin. Menurut Fazlolahzadeh *et al.* (2011), allicin memiliki pengaruh positif pada flora intestine sehingga memperbaiki pencernaan, suplai nutrient dan penggunaan energi sehingga mempengaruhi pertumbuhan ikan. Ali *et al.* (2008) juga menyatakan allicin yang terkandung dalam bawang putih mengatur performa mikroorganisme dalam usus

sehingga memperbaiki pencernaan makanan sehingga meningkatkan penggunaan energi yang selanjutnya meningkatkan pertumbuhan ikan.

KESIMPULAN

1. Penambahan bawang putih ke dalam pakan dapat meningkatkan respon imun non spesifik dan pertumbuhan ikan nila setelah diberikan selama 4 minggu.
2. Perlakuan C (20 g bawang putih/kg pakan) adalah dosis yang optimal dalam meningkatkan respon imun non spesifik dan pertumbuhan ikan nila.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, S. M., Nashwa, M. A. A., Mohamed, F. M. 2008. Effect of Garlic on The Survival, Growth, Resistance and Quality of *Oreochromis niloticus*. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture 2008
- Alifuddin, M. 2002. Imunostimulasi Pada Hewan Akuatik. Jurnal Akuakultur Indonesia, 1 (2): 87 – 92
- Effendie, M. I. 1979. Metode Biologi Perikanan. Yayasan Dewi Sri. Bogor
- Fazlolahzadeh, F., Keramati, K., Nazifi, S., Shirian, S., Seifi, S. 2011. Effect of Garlic (*Allium sativum*) on Hematological Parameters and Plasma Activities of ALT and AST of Rainbow trout in Temperature Stress. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 5(9): 84 – 90
- Kemper, K. J., 2000. Garlic (*Allium sativum*). The Longwood Herbal Task Force and The Center For Holistic Pediatric Education and Research
- Namikoshi, A., Wu, J. L., Yamashita, T., Nishizawa, T., Nishioka, T., Arimoto, M., Muroga, K. 2004. Vaccination Trials With *Penaeus japonicus* to Induce Resistance to White Spot Syndrome Virus. Aquac 229: 25 – 35
- Nya, E., J. dan B. Austin. 2009. Use of Garlic, *Allium sativum*, to control *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases 32: 963 – 970
- Raa, J. 2000. The Use of Immune-stimulants in Fish and Shellfish Feeds. In: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A., y Civera-Cerecedo, R., (Eds). Avances en Nutricion Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutricion Acuicola. 19 – 22 Noviembre, 2000. Merida, Yucatan, Mexico
- Sakai, M. 1999. Current Research Status of Fish Immunostimulants. Aquaculture 172 (1999) 63 – 92
- Shalaby, A. M., Khattab, Y., A., dan Abdel Rahman, A., M. 2006. Effects of Garlic (*Allium sativum*) and Chloramphenicol on Growth Performance, Physiological Parameters and Survival of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). J. Venom. ANim. Toxins incl. Trop. Dis. V.12, n.2, p. 172 – 201
- Witteveldt, J. A., Vlask, J. M., van Hulten, M. C. W. 2003. Protection of *Penaeus monodon* Against White Spot Syndrome Virus Using a WSSV subunit Vaccine. Fish Shellfish Immunol
- 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*. Aquac 253: 39 – 47