

PROSIDING

SEMINAR NASIONAL

ISBN 978-602-9372-63-2

Surabaya, 10 - 11 Desember 2013

Di Selenggarakan oleh LPPM UPN "Veteran" Jawa Timur

**PENGEMBANGAN LUARAN PENELITIAN
MENDUKUNG DUNIA INDUSTRI**



**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS PEMBANGUNAN NASIONAL "VETERAN" JAWA TIMUR**

Jl. Raya Rungkut Madya Gunung Anyar Surabaya
Telp./Fax. 031-8781400, Email : lppm_upn@yahoo.com



BIDANG PERTANIAN

- Evaluasi Sumber Daya Lahan di Desa Wringinpitu dan Catak Gayam (2-1) Pertanian 1
Kecamatan Mojowarno, Jombang
Oleh : Kemal Wijaya, Purnomo Edi Sasongko, Wanti Mindari, Agus Fahmi
- Kajian Potensi Banjir Akibat Perubahan Pada Berbagai Penggunaan (2-2) Pertanian 14
Lahan Di Wilayah Kota Surabaya
Oleh : Ir. Moch. Arifin, MT.
- Karakteristik Dan Keterampilan Hidup Menjadi Wirausaha Pada (2-3) Pertanian 24
Mahasiswa Upn "Veteran" Jawa Timur
Oleh : Supanrih, Maroeto, Yuliatin, Moch Arifin, Abdullah Fadil
- Implementasi Intelligent and Technology Internet Mobile System (2-4) Pertanian 30
(InTIMS) pada Purwarupa Sistem Peringatan Dini Kekeringan dan
Pengaturan Pola Tanam
Oleh : Purnomo Edi Sasongko, Akhmad Fauzi, Susrama
- Kajian Introduksi Rhizobakteria *Pseudomonad Fluorescens* (2-5) Pertanian 37
Terhadap Pertumbuhan Dan Produksi Cabai Di Lapang
Oleh : Yenny Wuryandari, Sri Wiyatiningsih, Agus Sulistyono
- A Study of forming cell suspension culture *Camelia sinensis* and the (2-6) Pertanian 44
detection of secondary metabolite Epicatechin Gallate
Oleh : Sutini, Nana Dyah Siswati, M. Rasjad Indra, Djoko Agus P.
- Substitusi Media Tanam Serbuk Gergaji Kayu Dengan Sampah (2-7) Pertanian 49
Organik Terhadap Pertumbuhan Dan Hasil Jamur Tiram
Oleh : Guniarti, Widiwurjani, Djarwatiningsih, Hadi Suhardjono
- Potensi Pemberian Jus Kulit Buah Manggis (*Garcinia Mangostana* (2-8) Pertanian 56
L.) Dan Pengaruhnya Terhadap Kadar Gula Darah Dan Gambaran
Histologi Pankreas Tikus Yang Diinduksi Streptozotocin
Oleh : Maris Kurniawati
- ✓ Alginat Mikroenkapsulasi Fke *Vibrio Sp* Untuk Vaksin Oral Benih (2-9) Pertanian 62
Kerapu Tikus Menghadapi Vibriosis
Oleh : Sumaryam, Dwirini Kartikasari



ALGINAT MIKROENKAPSULASI FKC *Vibrio* sp
UNTUK VAKSIN ORAL BENIH KERAPU TIKUS
MENGHADAPI VIBRIOSIS

ALGINATE MICROENCAPSULATION OF *Vibrio* sp FKC
FOR GROUPEE SEED VACCINE AGAINST VIBRIOSIS

Sumaryam, Dwirini Kartikasari

Budidaya Perairan, Jurusan Perikanan, Fakultas Pertanian
Universitas Dr. Soetomo, Surabaya, Telp. 031-5941969
rini.kartikasari@hotmail.com

ABSTRACT

Humpback grouper (*Chromyleptes altivelis*) is a commercial fish of high economic value of fish production and mainstay of exports in Indonesia. Increased production of grouper needs to be accompanied by the beginning of the cultivation of improved seed production. There are obstacles that can hinder the development of cultivation, especially diseases caused by parasites, bacteria, viruses and fungi.

Vibriosis is a disease caused by bacterial infection of the most attacking in the hatchery, is caused by bacteria of the genus *Vibrio*, among others *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. Vibriosis in fish grouper resulted in a low survival rate ranged from 1.2 to 2.9%, that can even lead to death of grouper seed to 100% at the peak of the outbreak.

It needs an effort of prevention to overcome these obstacles, because prevention will result in the use of antibiotic resistance in bacteria, the occurrence of residues in fish body and environment pollution. Countermeasures after fish infection will not be much help because of the quickly time of death. Prevention that can be done is by administering the vaccine.

Vaccination is believed to provide a specific immunity against certain diseases in fish. Vaccinations can be given by injections, immersion or orally through feed. For fish with the seed size, oral vaccination is considered the most appropriate way. Constraints oral vaccination is antigen solubility in water before they could enter the fish body and damage antigen as it passes through the digestive tract due to the low pH, so the vaccine must be given a coating that protects it while the vaccine was in the water and prevent damage during passing through the digestive system of fish.

Microencapsulation process is one way of protecting the antigen from the media and the solubility of the damage as it passes through the digestive tract of fish, so that the antigen can enter the fish body and will cause the immune response of the fish, which in turn can stimulate the formation of antibodies, characterized by increasing antibody titers. If the antibody has been formed, then the fish will be resistant when exposed to antigen, thus increasing the survival rate of the fish.

This study aim is to coat the *Vibrio* sp Formaline Killed Cells with alginate microencapsulation process, so we can get the appropriate vaccine that suit for the grouper seed and provides effective protection against vibriosis, so as to improve the quality and quantity of grouper seed.

Key words : Grouper seed, Vibriosis, alginate microencapsulation process, *Vibrio* sp FKC



RINGKASAN

Ikan kerapu tikus (*Chromyleptes altivelis*) merupakan ikan komersial bernilai ekonomis tinggi yang menjadi andalan produksi ikan ekspor di Indonesia. Peningkatan kebutuhan produksi kerapu tikus harus diiringi dengan usaha budidaya yang dimulai dari peningkatan produksi benih. Hanya saja terdapat kendala pengganggu yang dapat menghambat perkembangan usaha budidaya, terutama adanya serangan penyakit yang disebabkan oleh parasit, bakteri, virus maupun jamur.

Vibriosis adalah penyakit akibat infeksi bakterial yang paling banyak menyerang di panti pembudidayaan, disebabkan oleh bakteri dari genus *Vibrio* antara lain *Vibrio alginolyticus* dan *Vibrio parahaemolyticus*. Vibriosis pada ikan kerapu tikus mengakibatkan rendahnya *survival rate* berkisar antara 1,2 - 2,9 %, bahkan dapat menyebabkan kematian benih kerapu tikus hingga 100% di puncak wabah.

Untuk menanggulangi kendala tersebut diperlukan suatu upaya pencegahan, karena penanggulangan menggunakan antibiotik akan berakibat adanya resistensi pada bakteri, terjadinya residu pada tubuh ikan dan dapat mencemari lingkungan. Juga penanggulangan setelah terjadinya infeksi pada ikan tidak akan banyak membantu karena waktu kematian ikan yang relatif cepat. Pencegahan yang dapat dilakukan adalah dengan pemberian vaksin.

Vaksinasi diyakini dapat memberikan kekebalan spesifik pada ikan terhadap penyakit tertentu. Vaksinasi dapat diberikan dengan cara penyuntikan, perendaman maupun secara oral melalui pakan. Untuk ikan seukuran benih, vaksinasi yang dianggap paling tepat adalah secara oral. Kendala vaksinasi secara oral adalah larutnya antigen dalam air sebelum sempat masuk ke dalam tubuh ikan dan rusaknya antigen saat melewati saluran pencernaan karena pH yang rendah, sehingga vaksin harus diberi suatu lapisan yang dapat melindungi antigen saat berada dalam air dan mencegah kerusakan selama melewati sistem pencernaan ikan.

Proses mikrokapsulasi merupakan salah satu cara melindungi antigen dari kelarutan pada media dan kerusakan saat melewati saluran pencernaan ikan, sehingga antigen dapat masuk ke dalam tubuh ikan dan akan menimbulkan respon imun ikan tersebut yang pada akhirnya mampu merangsang pembentukan antibodi, ditandai dengan meningkatnya titer antibodi. Apabila antibodi telah terbentuk, maka ikan akan resisten pada saat terpapar antigen, sehingga dapat meningkatkan sintasan ikan tersebut.

Penelitian ini bertujuan untuk membuat vaksin mikrokapsul *Formalin Killed Cells* bakteri *Vibrio sp* untuk pakan benih kerapu tikus dalam upaya penanggulangan penyakit Vibriosis.



PENDAHULUAN

Ikan kerapu tikus (*Chromyleptes altivelis*) merupakan salah satu komoditas ikan air laut yang mempunyai prospek cerah, selain banyak digemari untuk dikonsumsi karena rasa dagingnya yang lezat, ikan kerapu tikus yang masih kecil dapat dijadikan ikan hias (Akbar dan Sudaryanto, 2001). Ikan kerapu tikus adalah ikan karang yang hanya hidup dan tumbuh cepat di daerah tropis. Permintaan pasar ikan kerapu tikus meningkat terutama pasar ekspor, seperti Hongkong, Singapura, Taiwan, China dan Jepang. Departemen Kelautan dan Perikanan (2006) mencatat, pasar ikan kerapu tikus dalam kondisi hidup yang paling utama di dunia adalah pasar Asia Timur, khususnya Hongkong dengan total impor sebesar 30.000 ton selama dua dekade terakhir. Selanjutnya ditambahkan bahwa sepanjang periode sembilan bulan pertama tahun 2005 ekspor ikan kerapu hidup naik sebanyak 5,7 % yaitu 9.434,3 ton dengan nilai 508,945 milyar rupiah dibandingkan dengan periode yang sama pada tahun 2004 yaitu mencapai 8.295,5 ton dengan nilai sekitar 481,5 milyar rupiah.

Ikan kerapu tikus menempati pasar kelas atas yang memiliki harga sangat mahal yaitu Rp. 360.000,- per kg dalam kondisi hidup dan jika stok ikan kerapu tikus langka maka harga ikan kerapu tikus hidup bisa mencapai Rp. 450.000,- sedangkan harga ikan kerapu tikus dalam kondisi mati mencapai Rp. 90.000,- per kg (Harianto, 2005).

Indonesia adalah negara produsen ikan kerapu terbesar di dunia dengan produksi 13,94 % dan 90 % hasil tersebut dari tangkapan di alam. Melihat kenyataan tersebut, sudah selayaknya Indonesia bisa melakukan pembenihan dengan SR yang tinggi, karena tidak boleh selamanya hanya bergantung pada penangkapan alami. Sekarang ikan kerapu telah diekspor sehingga kelangsungan pengiriman ikan harus dijaga, oleh sebab itu kegagalan budidaya yang disebabkan oleh penyakit harus dicegah.

Usaha budidaya ikan kerapu tikus sekarang ini masih dihadapkan pada berbagai kendala. Kendala utama yang sering ditemui di lapangan adalah kematian pada benih ikan kerapu tikus di *hatchery* (panti pembenihan) dalam jumlah besar, disebabkan karena adanya infeksi patogen yang disebabkan oleh virus, bakteri, parasit maupun jamur. Salah satunya adalah penyakit vibriosis yang ditimbulkan oleh bakteri dari genus *Vibrio* yang menyebabkan kematian benih sampai 80 - 90% (Taslihan, 2000).

Gejala klinis ikan yang terserang vibriosis antara lain ikan kelihatan lemah, sering berenang ke permukaan, kehilangan nafsu makan, berperilaku berputar-putar (*whirling*), warna tubuh menjadi gelap, adanya pembengkakan pada kulit yang mengakibatkan luka, terjadi pendarahan pada dinding perut dan permukaan jantung, jika dilakukan pembedahan akan terlihat pembengkakan dan kerusakan pada ginjal, hati dan limpa (Murdjani, 2002). Ikan yang telah terinfeksi vibriosis sulit untuk diobati dan waktu kematian setelah terinfeksi relatif cepat.

Dalam usaha untuk untuk menanggulangi kematian benih kerapu tikus tersebut masih banyak dilakukan pencegahan melalui penggunaan bahan kimia dan antibiotika, akan tetapi apabila penggunaan ini dilakukan terus menerus, akan berakibat timbulnya resistensi pada bakteri, terjadinya residu obat pada tubuh ikan dan juga mencemari lingkungan perairan dan menyebabkan penurunan kualitas air (Rinawati, 2011). Salah satu cara yang dapat menjadi pilihan adalah dengan metode vaksinasi yang dapat meningkatkan kekebalan ikan (Novriadi dkk, 2010).

Vaksinasi dapat dilakukan dengan cara suntikan, perendaman, atau oral. Vaksinasi yang tepat untuk benih kerapu tikus adalah secara oral melalui pakan, karena cara suntikan dan perendaman mudah menimbulkan stress bagi benih ikan yang dapat memicu kematian. Hanya saja vaksinasi secara oral memiliki kendala yaitu dapat mengalami kerusakan saat memasuki sistem pencernaan akibat pH yang terlalu rendah, juga cepat larut dalam air sehingga antigen yang terkandung di dalamnya tidak sempat masuk ke dalam tubuh ikan (Suprpto, 2009). Untuk itu diperlukan metode pelapisan yang dapat melindungi antigen tersebut selama melewati sistem pencernaan.

Salah satu metode pelapisan yang dapat diterapkan adalah mikrokapsulasi, yang merupakan teknologi melapisi suatu zat inti dengan suatu lapisan dinding polimer sehingga menjadi partikel-partikel kecil berukuran mikro yang terlindungi dari pengaruh lingkungan luar (Sultana *et al.*, 2000). Gel alginat dapat menyusut ketika berada dalam kondisi asam, dan terkikis pada kondisi basa sehingga dapat melindungi antigen pada saat terpapar asam pada lambung ikan, serta melepaskan antigen pada saat berada dalam pencernaan ikan. Gel alginat ini juga mukoadesif yang dapat melekat pada mukosa usus sehingga antigen tidak segera dikeluarkan dari tubuh ikan melalui feses. Mikrokapsulasi dari FKC *Vibrio alginolyticus* dan *Vibrio para haemolyticus* yang berada dalam usus akan melepaskan antigen sedikit demi sedikit sehingga mampu merangsang sistem imun ikan kerapu tikus dan dapat menimbulkan kekebalan alami ikan terhadap vibriosis.



MATERI DAN METODE PENELITIAN

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Breeding dan Reproduksi Universitas Dr. Soetomo Surabaya, di Balai Budidaya Air Payau Situbondo, dan Institute of Tropical Disease Universitas Airlangga Surabaya mulai bulan April sampai Juli 2013.

Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : *Beaker glass*, *Erlenmeyer*, *aluminium foil*, *Eppendorf*, akuarium, *centrifuge tube*, *micropipette*, mikroskop, multiscan *spectrofotometri*, magnetik stirer, *refrigerator centrifuge* dan autoclave.

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaCl , CaCl_2 , *Akuas*, *Aquahidest*, alginat, etanol, formalin, TSB, dan TCBS.

Kultur Bakteri *Vibrio alginolyticus*

Vibrio alginolyticus diisolasi dari larva ikan yang mati kemudian disimpan dengan *glycerol* pada suhu -20°C sampai digunakan untuk penelitian. Bakteri dikultur pada TCBS (pH 7.0), dipanen, dicuci dengan *physiological saline/PS* (0,85% NaCl) dengan sentrifugasi pada 6000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C .

Kultur bakteri dilakukan dalam labu *erlenmeyer* dengan media TSB. Untuk membuat 500 ml media kultur dibutuhkan 15 g TSB dan 10 g NaCl . TSB dan NaCl yang telah ditimbang beratnya dicampur ke dalam 500 ml *aquadest*. Kemudian diaduk dengan cara labu digoyang-goyang hingga larut sempurna. Setelah larut sempurna labu *erlenmeyer* ditutup dengan *aluminium foil* dan diautoclave dengan suhu 121°C , tekanan 1 atm selama 15 menit supaya media steril dari patogen yang lain.

Setelah media berada pada suhu ruang selama 24 jam dan tidak ada kontaminan yang tumbuh, sebanyak 1 ml isolat bakteri *V. alginolyticus* dan *V. parahaemolyticus* dimasukkan dalam media, lalu labu *erlenmeyer* ditutup kembali dengan *aluminium foil*. Setelah ditanam bakteri diinkubasi selama 24 - 48 jam pada suhu ruang. Diperkirakan bakteri yang tumbuh sebanyak $\pm 9 \times 10^7$ CFU/ml. (penghitungan kepadatan bakteri dilakukan di Balai Karantina Ikan Juanda).

Pembuatan Formalin Killed Cell (FKC) Bakteri *Vibrio alginolyticus*

Setelah 24 - 48 jam media TSB akan terlihat keruh, hal ini menandakan bakteri telah berkembang biak dan siap untuk dilakukan pemanenan. Pemanenan dilakukan dengan cara sentrifugasi. Media TSB dituang dalam *centrifuge tube* lalu dicentrifuge pada kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang lalu endapannya ditambahkan PBS sebanyak 40 ml dan dicentrifuge lagi pada kecepatan dan waktu yang sama. Proses pembuangan supernatan dan penambahan PBS ini dilakukan sebanyak 3x supaya didapatkan endapan bakteri yang bersih dari media TSB. Proses ini disebut juga dengan proses pencucian bakteri (Suprpto, 2005).

Bakteri yang telah selesai dicuci ditambah PBS sebanyak 25 ml dan dinaktifkan selama 18 - 24 jam dengan ditambah formalin sebanyak 0,5%. Fungsi formalin ini untuk mematikan bakteri supaya tidak virulen lagi dan mengawetkannya. Bakteri yang telah



diformalin disimpan pada suhu 4°C selama 72 jam. Setelah 72 jam bakteri dicuci kembali sebanyak satu kali dengan cara *dicentrifuge* pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Hasil pencucian ini dinamakan *formalin killed cell* (FKC). Vaksin disimpan dalam *refrigerator* selama belum digunakan (Suprpto, 2009).

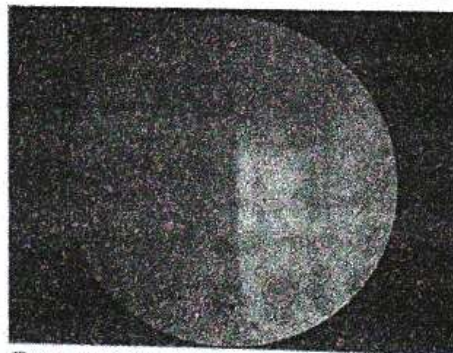
Pembuatan Mikrokapsul FKC Bakteri

Tahap terakhir pembuatan vaksin yaitu pembuatan mikrokapsul FKC bakteri. Metode mikroenkapsulasi mengacu pada penelitian Ain *et al.* (2003), dibuat dengan cara menyemprotkan suspensi FKC dengan alginat ke dalam larutan pengeras (CaCl₂). Perbandingan FKC dengan alginat yang digunakan adalah 1 : 6 v/v. Penyemprotan dilakukan dengan menggunakan *air gun* dan *compressor*.

Mikroenkapsulasi yang terbentuk kemudian dicuci menggunakan *aquadest*. Tahap pencucian yang dilakukan adalah mikrokapsul alginat dalam larutan CaCl₂ dimasukkan ke dalam *centrifuge tube* lalu *dicentrifuge* pada kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk ditampung di dalam botol. Kemudian mikrokapsul ditambah *aquadest* dan *dicentrifuge* lagi dengan kecepatan dan waktu yang sama. Pencucian dilakukan sebanyak tiga kali hingga mikrokapsul bersih dari larutan CaCl₂. Setelah proses pencucian, mikrokapsul dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dalam suhu ruang ± 3 – 7 hari. Mikrokapsul yang telah kering kemudian disimpan dalam botol steril.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sesudah proses mikroenkapsulasi FKC *Vibrio* sp dengan menggunakan alginat, didapatkan hasil berupa serbuk vaksin berwarna putih. Dan setelah diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10 x 40 didapatkan hasil pengamatan sebagai berikut :



Gambar 1. Pengamatan mikrokapsul dengan mikroskop

Pada saat proses mikroenkapsulasi, pelet FKC *Vibrio* sp harus benar-benar homogen dengan larutan alginat 2%, sebab campuran yang kurang homogen akan menyebabkan terjadinya penggumpalan yang bisa menyebabkan penyumbatan pada proses penyemprotan ke dalam CaCl₂ dengan *air gun* dan mengakibatkan mikrokapsul yang terbentuk menjadi kurang bagus.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini, dapat diambil kesimpulan bahwa pembuatan vaksin dari FKC *Vibrio* sp dengan proses mikroenkapsulasi menggunakan alginat, dapat dilakukan dengan metode penyemprotan ke dalam larutan pengeras CaCl₂. Dan hasil yang didapatkan mudah untuk dihaluskan dan disimpan dalam bentuk serbuk kering untuk pemakaian sebagai vaksin selanjutnya.



Disarankan untuk menyaring FKC bakteri sebelum dicampur dengan alginat, untuk menghindari penyumbatan mulut *air gun* agar penyemprotan dapat berjalan dengan lancar.
Perlu dilanjutkan dengan penelitian berikutnya untuk mengetahui pengaruh vaksin yang telah dibuat dalam memberikan perlindungan pada benih kerapu tikus terhadap vibriosis.

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 Effect. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 8 pp.
- Akbar, S. dan Sudaryanto, 2001. Pembenuhan dan Pembesaran Ikan Kerapu Bebek. Penerbit Swadaya. Jakarta. Hal. 1 - 68.
- Departemen Kelautan dan Perikanan, 2006. Analisa Pasar Perikanan Luar Negeri Periode Januari 2006. <http://www.departemenkelautandanperikanan.org.co.id>. Diakses 23 Nopember 2011.
- Harianto, 2005. Kajian Kelayakan Usaha Ekspor Ikan Kerapu dengan Penerapan Alat Angkut Darat dan Teknik Kemasan Pengiriman Udara. *Jurnal Sain dan Teknologi BPPT*. www.ipteknetcom. Diakses 24 Nopember 2011.
- Murdjani, M. 2002. Identifikasi dan Patologi Bakteri *Vibrio alginolyticus* pada Pakan Ikan Kerapu Tikus (*Chromileptes altivelis*). Disertasi. Program Studi Ilmu-ilmu Pertanian Kekhususan Perlindungan Tanaman. Universitas Brawijaya. Malang. 117 hal.
- 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. Kementrian 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 dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Surabaya. 13 hal.
- Sultana, K., G. Godward, N. Reynolds, R. Arumugaswamy, P. Peiris dan K. Kailasapathy. 2000. Encapsulation of Probiotic Bacteria with Alginate-starch and Evaluation of Survival in Stimulates Gastrointestinal Conditions and in Yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*. 62 : 47 - 55.
- Suprpto, H. 2005. Pemberian Campuran Bakterin dan Turunannya dari *Vibrio parahaemolyticus* dan *Vibrio alginolyticus* untuk Menguatkan Sintasan Udang *Penaeus monodon*. *J. Sain Vet*. 1 : 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 (*Epinephelus fuscoguttatus*). Proposal Tahun III. Insentif Riset Terapan. Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat. Universitas Airlangga. Surabaya. 60 hal.
- Taslihan, 2000. Bakteri Patogen Penyebab Penyakit Mulut Merah pada Ikan Kerapu Tikus (*Chromileptes altivelis*). *Jurnal Perikanan Universitas Gajah Mada* II (2) : 57 - 62. Yogyakarta. 6 hal.

