

Peningkatan imunitas nonspesifik ikan mas, *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) yang diinfeksi *Aeromonas hydrophilla* dengan pemberian asam humat tanah gambut

[Enhancement of nonspecific immunity in *Aeromonas hydrophilla* infected carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) by the administration of peat's humic acid]

Diah Wulandari Rousdy¹✉, Nastiti Wijayanti²

¹Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Tanjungpura Jl. Prof. Dr. H. Hadari Nawawi Pontianak 78111

²Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Bulaksumur, Yogyakarta

Diterima: 7 Maret 2016; Disetujui: 27 September 2016

Abstrak

Tanah gambut diketahui mempunyai kandungan humus yang tinggi. Salah satu komponen humus dalam gambut adalah asam humat. Senyawa asam humat mempunyai struktur yang kompleks dan berbeda untuk tiap jenis tanah, sehingga memungkinkan asam humat memiliki potensi biologis, salah satunya menstimulus sistem imunitas nonspesifik. Penelitian ini bertujuan menentukan pengaruh pemberian asam humat dalam pakan ikan terhadap aktivitas fagosit makrofag dan produksi radikal oksidatif sel neutrofil ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) yang telah diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophilla*. Ikan yang digunakan berukuran 10-15 cm. Perlakuan pada penelitian ini yaitu dosis asam humat diberikan melalui pakan selama 21 hari. Perlakuan yang diberikan mencakup kelompok kontrol dan perlakuan asam humat (1; 3; 5% bobot pakan). Penambahan asam humat dalam pakan ikan mas cenderung meningkatkan aktivitas fagositik dan produksi *radical oxidative species* (ROS) meski tidak berbeda dengan kontrol ($P>0,05$). Peningkatan indeks fagositik tertinggi ditunjukkan oleh perlakuan asam humat 3% dan peningkatan ROS diberikan oleh perlakuan asam humat 1%. Hasil uji tantang dengan bakteri *A. hydrophilla* secara intraperitoneal menunjukkan bahwa asam humat konsentrasi 1% mampu menghasilkan nilai sintasan terbaik.

Kata penting: asam humat, gambut, imunitas non-spesifik, ikan mas

Abstract

Peat soils are known to have a high humus content. One of the humus compounds is humic acid. Humic acid has a complex and a different chemical structure for each type of soil. Therefore humic acid has the biological potency, one of them is stimulating the nonspecific immune system. The aim of this study was to determine the effect of humic acid to the phagocytic activity of macrophages and production of neutrophils radical oxidative species (ROS) in carp (*Cyprinus carpio* L.) that have been infected by the bacteria *Aeromonas hydrophilla*. In this experiment, we used carp with body length ranged from 10-15 cm. Humic acid treatment was given through the feed for 21 days. Treatments include control groups and the humic acid groups (i.e. 1, 3, 5% weight of the feed). The addition of humic acid in carp's feed was able to increase phagocytic activity. The highest phagocytic index was shown at 3% humic acid treatment and radical oxidative species (ROS) was increased in 1% humic acid treatment. The result of challenge test with *A. hydrophilla* injected by intraperitoneal route showed the highest survival rate was found in the 1% humic acid treatment.

Keywords: carp, humic acid, nonspecific immunity, peat

Pendahuluan

Ikan mas (*Cyprinus carpio* Linn.) adalah jenis ikan air tawar yang banyak dikonsumsi masyarakat. Peningkatan produksi ikan mas kerap menghadapi kendala, salah satunya adalah penyakit ikan yang disebabkan bakteri *Aeromonas hydrophilla*. (Jasmanindar 2011). Upaya untuk mengendalikan kasus penyakit ikan dapat dilakukan dengan menggunakan imunostimulan. Salah

satu bahan alam yang mempunyai potensi meningkatkan sistem imun adalah senyawa asam humat yang terkandung dalam tanah gambut.

Gambut merupakan jenis tanah yang berasal dari materi organik yang terdegradasi secara lambat. Laju pembentukan gambut di Indonesia cukup tinggi karena dipengaruhi oleh tingginya curah hujan dan topografi wilayah berupa cekungan. Oleh sebab itu, Indonesia tercatat sebagai negara dengan luas lahan gambut terbesar nomor empat di dunia. Tanah gambut diketahui

✉ Penulis korespondensi

Alamat surel: diah.w.rousdy@gmail.com

mempunyai kandungan humus yang tinggi. Salah satu komponen humus dalam gambut adalah asam humat.

Manfaat humus dan asam humat yang telah diketahui adalah meningkatkan kesuburan tanah. Namun beberapa penelitian mengungkap manfaat lain asam humat di bidang kesehatan. Kompleksitas struktur asam humat memungkinkan senyawa ini memiliki berbagai aktivitas biologis dalam tubuh organisme (Stevenson 1994). Asam humat mempunyai potensi antioksidan atau kemampuan menangkap radikal bebas disebabkan oleh banyaknya gugus oksigen reaktif seperti karboksil, hidroksil, dan keton (Vetvicka *et al.* 2010). Nakagawa *et al.* (2009) melaporkan asam humat 10% dapat meningkatkan daya tahan hidup ikan ayu (*Plecoglossus altivelis*) yang diinfeksi *Flavobacterium psychrophilum*. Selain itu, penelitian lain yang dilakukan oleh Joone *et al.* (2003) dan Junek *et al.* (2009) melaporkan konsentrasi asam humat 10-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dapat meningkatkan pelepasan TNF- α dan produksi sitokin pada konsentrasi asam humat 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Berdasarkan hal tersebut maka besar potensi asam humat untuk dikembangkan menjadi salah satu imunostimulant alami. Tujuan penelitian ini adalah menentukan pengaruh pemberian asam humat dalam pakan ikan terhadap aktivitas fagosit makrofag dan produksi radikal oksidatif sel neutrofil ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) yang telah diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophilla*.

Bahan dan metode

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei 2013. Tahapan penelitian meliputi: ekstraksi asam humat dari tanah gambut, pemberian asam humat melalui pakan kepada ikan mas selama 21 hari, dan uji tantang dengan bakteri *A. hydrophilla*. Bakteri ini diperoleh dari Laboratorium Pe-

nyakit Ikan, Departemen Perikanan Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada.

Bahan yang digunakan yaitu metanol, Giemsa 3%, larutan HCl, larutan NaOH, NaEDTA, media *Tryptone Soy Broth* (TSB), *Tryptone Soy Agar* (TSA), *Glutamate Starch Phenol Red Agar* (GSP), larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS), nitro blue tetrazolium (*Sigma*), n-metil formamide (Merck), levamisole, dan isolat bakteri *A. hydrophilla*.

Hewan uji adalah ikan mas (*Cyprinus carpio* Linn.) strain merah Cangkriangan yang diperoleh dari kolam budi daya Balai Pembinaan dan Budidaya Ikan Air Tawar, Muntilan, Magelang. Ikan mas yang digunakan berumur sekitar dua bulan dengan panjang 10-15 cm.

Rancangan percobaan

Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap dengan lima perlakuan dan tiga ulangan. Setiap ulangan terdiri atas 20 ekor ikan. Perlakuan yang diberikan yaitu: kontrol normal (ikan tidak diberi asam humat dan tanpa uji tantang), kontrol negatif (ikan tidak diberi asam humat tapi dilakukan uji tantang), kontrol positif (ikan diberi imunostimulant levamisole), dan perlakuan asam humat (konsentrasi 1; 3; 5% bobot pakan).

Sebelum perlakuan, ikan diaklimasi selama dua minggu dalam wadah berkapasitas 25 L. Wadah dibersihkan dengan cara direndam dengan KMnO_4 20 ppm selama 24 jam dan dibilas dengan air bersih. Selama aklimasi, ikan diberi pakan pellet 2% dari bobot badan per hari. Air diganti 25% setiap hari.

Parameter fisik dan kimiawi air diukur dan dipantau setiap minggu. Kadar oksigen terlarut diukur dengan metode titrasi Winkler, pengukuran pH dengan pH meter, suhu menggunakan termometer, dan kadar amonia menggunakan kit Sera test.

Ekstraksi asam humat

Ekstraksi asam humat mengacu pada metode IHSS (*International Humic Substance Society*) dengan modifikasi (IHSS 2012). Tanah gambut diambil pada kedalaman 30 cm dari permukaan tanah, kemudian dibersihkan dari kerikil dan sisa akar tumbuhan. Tanah 50 g diekstrak dengan 0,1 M NaOH 500 mL selama empat jam sambil diaduk. Campuran didiamkan satu malam. Filtrat disaring beberapa kali dengan kapas dan kertas saring. Fraksi humin yang tidak larut dihilangkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 20 menit. Kemudian asam humat diendapkan dengan asam kuat 6 M HCl sebanyak 1/3 volume. Campuran didiamkan selama ± 15 jam. Endapan asam humat yang terbentuk disentrifugasi kembali hingga pemisahan sempurna.

Ekstrak asam humat dibuat dalam konsentrasi yang telah ditentukan. Larutan dinetralkan dengan NaOH, dicampur dengan pellet (protein 38%) dan dikeringkan dalam inkubator 50°C. Jumlah pellet yang diberikan setiap hari adalah 2% dari bobot badan ikan.

*Biakan bakteri *Aeromonas hydrophila**

Patogenitas *A. hydrophila* diaktifkan dengan cara direinfeksi kembali pada ikan. Bakteri diisolasi dari organ ginjal dan hepar dan ditanam pada media selektif GSP. Setelah 24 jam koloni yang berwarna kuning ditanam ke media TSA hingga diperoleh koloni yang seragam. Biakan murni *A. hydrophilla* dilakukan subkultur pada media TSB. Biakan disentrifugasi selama 10 menit kecepatan 10.000 rpm. Bakteri yang mengendap dicuci dan diresuspensi dengan PBS. Kepadatan bakteri yang digunakan untuk ujiantang adalah 1×10^7 sel mL^{-1} yang diukur menggunakan spektrofotometer (El-Boshy *et al.* 2010).

Pengukuran indeks fagositik

Pengukuran indeks fagositik dilakukan pada hari ke-7, 14, 21, dan setelah ujiantang. Sampel darah 20 μL dicampur dengan 20 μL suspensi *A. hydrophila* (sebagai antigen dengan kepadatan 10^7 sel mL^{-1}). Campuran diinkubasi selama 20 menit kemudian dibuat preparat apus. Apusan campuran di atas gelas objek difiksasi dengan metanol dan dikeringkan. Apusan diwarnai dengan Giemsa 5 menit dan dicuci dengan akuades. Indeks fagositik dihitung berdasarkan persentase sel fagosit yang menunjukkan proses fagositosis dari jumlah total sel fagosit yang terhitung (Ispir & Dorucu 2005).

Produksi radikal oksidatif neutrofil

Pengukuran produksi radikal oksidatif (ROS) neutrofil dilakukan pada hari ke-7, 14, 21, dan setelah ujiantang. Produksi ROS oleh sel neutrofil selama *respiratory burst* dilakukan dengan reduksi NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*) membentuk formazan. Satu tetes NBT 0,2% diberikan di atas kaca objek dan kaca penutup diletakkan di atasnya, diinkubasi kembali selama 30 menit. Sel neutrofil yang aktif mengandung granula kebiruan. Sel neutrofil aktif dihitung pada perbesaran 400x dan ditampilkan dalam jumlah sel per lapangan pandang (Ispir & Dorucu 2005).

Ujiantang (challenge test)

Setelah 21 hari imunostimulasi semua kelompok, kecuali kontrol normal, dilakukan ujiantang (*challenge test*) masing-masing dengan 10 ekor ikan. Ikan diinjeksi secara intraperitoneal dengan bakteri *A. hydrophila* (1×10^7 sel mL^{-1}) dosis 0,1 mL per ikan. Setelah ujiantang dilakukan pengamatan mortalitas ikan selama 10 hari dan dihitung persentase sintasan (Mulia 2003).

Analisis data

Data dianalisis secara statistik dengan ANOVA satu jalur dan uji lanjut Duncan's Multiple Range Test (DMRT) menggunakan perangkat lunak SPSS versi 15.

Hasil

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian pakan yang mengandung asam humat selama 21 hari mampu meningkatkan aktivitas fagositik sel monosit menjadi 23-28% (Tabel 1). Setelah diinfeksi bakteri *A. hydrophilla*, indeks fagositik semua kelompok perlakuan meningkat, kecuali kontrol negatif yang mengalami penurunan. Peningkatan aktivitas fagositik tertinggi pascainfeksi diberikan oleh perlakuan asam humat 3%.

Penelitian menunjukkan pemberian asam humat 3% meningkatkan produksi ROS pada hari

ke-21 tertinggi sebesar 0,26 lebih baik dibandingkan kelompok perlakuan lainnya, meski tidak berbeda nyata secara statistik ($P > 0,05$). Setelah ikan mas diinfeksi *A. hydrophilla* terjadi kenaikan produksi ROS pada kelompok kontrol normal, kontrol negatif, levamisol, dan asam humat 1%; sedangkan penurunan ROS terjadi pada perlakuan asam humat 3% dan 5% (Tabel 2). Setelah dilakukan ujiantang diperoleh nilai sintasan terbaik hingga pengamatan terakhir yakni pada perlakuan asam humat 1% sebesar 83% (Gambar 1).

Data kualitas air selama penelitian diperhatikan pada Tabel 3. Kualitas air dalam wadah pengujian diperoleh kisaran suhu air (26-29°C), pH (6,8-7,0), oksigen terlarut (5,0-6,9 mg L⁻¹) dan amonia (0,5-1,0 mg L⁻¹).

Tabel 1. Indeks fagositik ikan mas selama pemberian asam humat dan setelah ujiantang

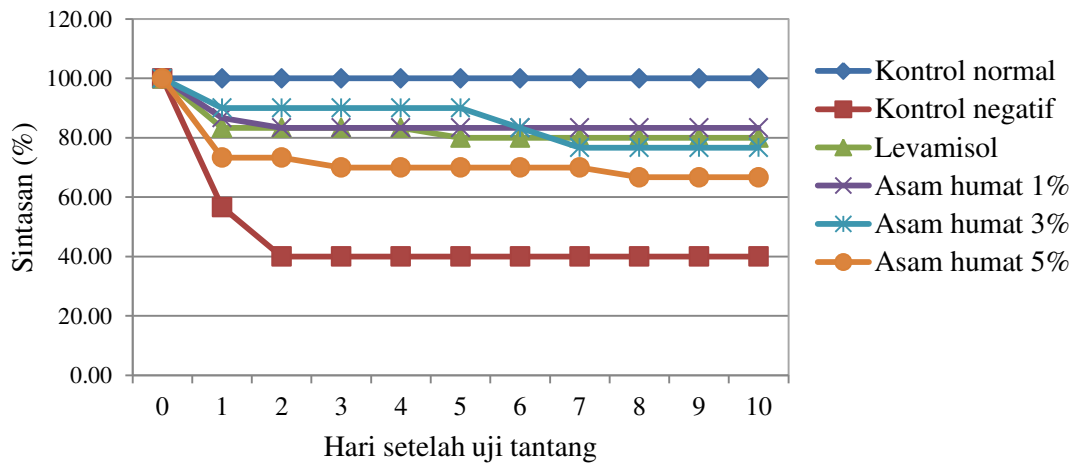
Perlakuan	Indeks Fagositik (%)			
	Hari ke-7	Hari ke-14	Hari ke-21	Hari ke-25 (4 hari setelah infeksi)
Kontrol normal	17,33 ± 2,30 ^a	18,67 ± 4,62 ^a	18,67 ± 2,31 ^a	20,00 ± 0,00 ^a
Kontrol negatif	19,33 ± 4,16 ^{ab}	17,17 ± 1,04 ^{ab}	21,33 ± 2,31 ^a	19,67 ± 3,75 ^a
Levamisol	22,00 ± 4,00 ^{ab}	26,33 ± 4,04 ^c	29,33 ± 14,04 ^a	31,33 ± 13,01 ^a
Asam humat 1%	23,33 ± 5,03 ^{ab}	24,00 ± 4,00 ^{ab}	23,67 ± 8,50 ^a	27,67 ± 2,52 ^a
Asam humat 3%	24,67 ± 1,15 ^b	25,33 ± 4,62 ^{ab}	24,00 ± 4,00 ^a	32,00 ± 17,44 ^a
Asam humat 5%	22,67 ± 4,16 ^{ab}	25,33 ± 2,31 ^{ab}	28,00 ± 4,00 ^a	31,67 ± 4,73 ^a

Data ditampilkan dalam nilai rata-rata ± simpangan baku. Huruf yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$).

Tabel 2. Produksi ROS dengan metode NBT selama pemberian asam humat dan setelah ujiantang pada ikan mas

Perlakuan	Produksi ROS O.D 540 nm (A)			
	Hari ke-7	Hari ke-14	Hari ke-21	Hari ke-25 (4 hari setelah infeksi)
Kontrol normal	0,37 ± 0,12 ^a	0,35 ± 0,19 ^b	0,15 ± 0,02 ^a	0,17 ± 0,04 ^a
Kontrol negatif	0,32 ± 0,11 ^a	0,24 ± 0,10 ^{ab}	0,13 ± 0,03 ^a	0,19 ± 0,06 ^a
Levamisol	0,30 ± 0,12 ^a	0,11 ± 0,17 ^a	0,15 ± 0,05 ^a	0,22 ± 0,16 ^a
Asam humat 1%	0,32 ± 0,11 ^a	0,12 ± 0,10 ^a	0,14 ± 0,07 ^a	0,29 ± 0,20 ^a
Asam humat 3%	0,14 ± 0,79 ^a	0,18 ± 0,10 ^{ab}	0,26 ± 0,19 ^a	0,16 ± 0,05 ^a
Asam humat 5%	0,21 ± 0,20 ^a	0,17 ± 0,08 ^{ab}	0,19 ± 0,05 ^a	0,17 ± 0,04 ^a

ROS= radical oxidative species, NBT= Nitro Blue Tetrazolium. Data ditampilkan dalam nilai rata-rata ± simpangan baku. Huruf yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$).



Gambar 1. Persentase sintasan kumulatif setelah uji tantangan dengan bakteri *A. hydrophila* melalui injeksi intraperitoneal

Tabel 3. Kisaran parameter kualitas air selama pemberian asam humat

Perlakuan	Suhu (°C)	pH	Oksigen terlarut (mg L ⁻¹)	Amonia (mg L ⁻¹)
Kontrol normal	26-27	6,8-7,0	5,5-6,2	0,6-1,0
Kontrol negatif	26-27	6,8-7,0	5,7-7,0	0,6-1,0
Levamisol	27-28	6,8-7,0	5,4-7,2	0,7-1,0
Asam humat 1%	26-28	6,8-7,0	6,0-7,8	0,5-1,0
Asam humat 3%	28-29	6,8-7,0	5,0-6,6	0,5-1,0
Asam humat 5%	27-28	6,8-7,0	6,6-6,9	0,5-1,0

Pembahasan

Pemberian asam humat konsentrasi 1-5% selama 21 hari memberikan hasil peningkatan indeks fagositik sel monosit. Aktivitas fagositosis tertinggi diberikan oleh kelompok asam humat 5% sebesar 28,0%, tidak berbeda jauh dengan kontrol positif levamisol sebesar 29,3% (Tabel 1). Peningkatan aktivitas fagositik tertinggi pascainfeksi diberikan oleh perlakuan asam humat 3%.

Peningkatan aktivitas fagositosis oleh pemberian asam humat 3% diduga disebabkan asam humat mampu menstimulasi produksi sitokin selama proses kemotaksis sel fagosit menuju partikel asing. Partikel asing kemudian menempel pada reseptor di sel fagosit. Proses ini kemudian diikuti dengan ingestasi partikel dan pembentukan fagosom. Partikel dalam fagosom kemudian dihancurkan dengan pembentukan radikal ok-

sidatif (ROS), radikal nitrogen (RNS) atau dengan bantuan lisozim (Iwama & Nakanishi 1996).

Sekresi sitokin yang berperan dalam kemotaksis dapat distimulus oleh pemberian asam humat. Junek *et al.* (2009) menyatakan bahwa senyawa polianionik dari asam humat bersifat menstimulus sekresi sitokin selama proses inflamasi dan fagositosis. Selain itu peningkatan fagositosis juga disebabkan oleh sifat polianionik asam humat yang secara baik dikenali oleh reseptor SR pada membran sel fagosit atau makrofag. Reseptor ini termasuk ke dalam *pattern recognition receptors* (PRRs) yang merespon berbagai variasi ligand terutama untuk makromolekul polianionik (Platt & Gardon 1998).

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Schepetkin *et al.* (2003) yang menyatakan bahwa pemberian fraksi fulvat dari substansi

asam humat pegunungan Tajikistan meningkatkan fagositosis secara *in vitro* disebabkan oleh polisakarida yang terikat pada substansi asam humat. Keberadaan polisakarida terikat telah dibuktikan oleh penelitian Lasmi (2013) yang menunjukkan hasil spektrum inframerah asam humat dari tanah gambut Kalimantan memiliki polisakarida terikat. Polisakarida yang terikat oleh asam humat diduga bekerja pada reseptor SR leukosit dan mengaktifasi NF- κ B (*necrosis factor-kappa B*)

Hasil pengukuran ROS yang diproduksi neutrofil menunjukkan penurunan setelah pemberian asam humat 21 hari (Tabel 2). Asam humat 1% menunjukkan kadar ROS terendah sebesar 0,14 demikian pula untuk kontrol positif levamisol dengan kadar ROS 0,15. Penurunan nilai ROS pada beberapa kelompok perlakuan kemungkinan disebabkan suplai oksigen dalam tubuh ikan tidak mengimbangi konsumsi oksigen oleh sel neutrofil. Sel neutrofil menggunakan oksigen untuk memproduksi ROS.

Perbedaan terjadi setelah ikan diinfeksi bakteri *A. hydrophilla*, perlakuan asam humat 1% memberikan kenaikan ROS tertinggi hingga 107% dan diikuti dengan kontrol positif levamisol sebesar 46%. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa peningkatan aktivitas fagositosis pada kelompok asam humat 1% dan levamisol terjadi karena peningkatan produksi ROS. Produksi senyawa ROS oleh neutrofil dengan pemberian asam humat 1% merupakan salah satu mekanisme dalam sistem imunitas nonspesifik. Saat neutrofil memakan partikel asing akan terjadi peningkatan konsumsi oksigen. Oksigen direduksi menjadi $O_2^{\bullet-}$ (anion superoksida) oleh NADPH oksidase, suatu kompleks enzim yang ditemukan pada membran plasma sel fagosit (Iwama & Nakanishi 1996).

Beberapa penelitian imunostimulan menunjukkan peningkatan aktivitas fagositosis tidak selalu diiringi dengan peningkatan produksi ROS. Inhibisi produksi ROS oleh sel fagosit terjadi pada pemberian imunostimulan radix *Scutellaria* pada ikan nila dengan konsentrasi 0,5-1% selama empat minggu (Yin *et al.* 2006). Namun pemberian imunostimulan tersebut memberikan peningkatan sekresi lisozim dalam darah. Hal ini menunjukkan bahwa mekanisme penghancuran partikel asing (bakteri) tidak hanya dilakukan dengan mekanisme produksi ROS namun dapat juga dengan bantuan enzim antibakteri, lisozim yang dihasilkan oleh sel fagosit.

Asam humat diketahui mempunyai potensi antioksidan atau kemampuan menangkap radikal bebas yang disebabkan oleh banyaknya gugus oksigen reaktif seperti karboksil, hidroksil, dan keton. Hasil penelitian Vašková *et al.* (2011) membuktikan bahwa asam humat mampu menangkap radikal hidroksil dan tidak mencetuskan produksi radikal oksidatif lain pada konsentrasi 0,1% secara *in vitro*. Potensi imunostimulan yang dimiliki oleh senyawa antioksidan dilaporkan oleh Kumari & Sahoo (2006), suplementasi vitamin C 500 mg kg⁻¹ dalam pakan ikan lele (*Clarias batrachus*) selama satu bulan tidak memberikan peningkatan produksi ROS (aktivitas *respiratory burst*) namun secara signifikan meningkatkan aktivitas fagositosis hingga 70%.

Pemberian asam humat konsentrasi 1% memberikan nilai sintasan lebih tinggi dibandingkan konsentrasi asam humat yang lebih besar. Asam humat 1% dinilai mampu menstimulus sistem imunitas nonspesifik melalui mekanisme peningkatan aktivitas fagositosis. Hasil penelitian ini lebih baik dibanding penelitian Kodama *et al.* (2007) yang menggunakan ekstrak humat 5% dari gambut subtropis untuk meningkatkan nilai

sintasan ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang terinfeksi bakteri *Aeromonas salmonicida*.

Kualitas air selama pengujian diperoleh suhu air (26-29°C), pH (6,8-7,0), oksigen terlarut (5,0-6,9 mg L⁻¹) dan amonia (0,5-1,0 mg L⁻¹). Peningkatan kadar amoniak terjadi pada penelitian ini yakni sekitar 1 mg L⁻¹. Kisaran kualitas air selama perlakuan asam humat masih berada pada kisaran normal, kecuali nilai amonia yang sedikit lebih tinggi. Menurut Yin *et al.* (1995), kisaran kadar oksigen terlarut untuk ikan mas sebesar 6-7,9 mg L⁻¹; pH 6,8-7,4; kadar amonia 0,5-1,1 mg L⁻¹ dan suhu 23-29 °C. Kadar amoniak yang lebih tinggi selama pengujian kemungkinan disebabkan oleh terlarutnya butiran pelet yang mengandung asam humat ke dalam air. Oleh karena itu diperlukan metode suplementasi asam humat dalam pakan secara lebih baik.

Simpulan

Penambahan asam humat 1-5% dalam pakan mampu memodulasi sistem imunitas nonspesifik pada ikan mas dengan meningkatkan aktivitas fagositik dan produksi ROS oleh sel neutrofil. Asam humat konsentrasi 1% menghasilkan nilai sintasan terbaik pasca infeksi *A. hydrophilla*.

Daftar pustaka

El-Boshy M, El-Ashramb AM, Abdelhamid FM, Gadalla HA. 2010. Immunomodulatory effect of dietary *Saccharomyces cerevisiae*, b-glucan and laminaran in mercuric chloride treated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*, 28(4): 802-808

IHHS (International Humic Substances Society). 2012. *Isolation of IHSS soil fulvic and humic acids*. (www.humicsubstances.org)

Ispir U, Dorucu M. 2005. A study on the effects of levamisole on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), *Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences*, 29(5): 1169-1176

Iwama G, Nakanishi T. 1996. *The Fish Immune System, Organism, Pathogen and Environment*. Academic Press. California. 380 p

Jasmanindar Y. 2011. Prevalensi parasit dan penyakit ikan air tawar yang dibudidayakan di Kota/Kabupaten Kupang. *Bionatura*, 13(1): 25-30

Joone KT, Dekker J, van Rensburg CEJ. 2003. Investigation of immunostimulatory properties of oxihumate. *Naturforsch*, 58(3): 263-267

Junek R, Morrow R, Schoenherr J, Schubert R, Kallmeyer R, Phul S, Klocking R. 2009. Bimodal effect of humic acids on the LPS-induced TNF- α release from differentiated U937 cells. *Phytomedicine*, 16(5): 470-476

Kodama K, Denso, Nakagawa, J. 2007. Protection against atypical *Aeromonas salmonicida* infection in carp (*Cyprinus carpio*) by oral administration of humus extract. *Journal of Veterinary Medical Science*, 69(4): 405-408

Kumari J, Sahoo PK. 2006. Non-specific immune response of healthy and immunocompromised Asian catfish (*Clarias batrachus*) to several immunostimulants. *Aquaculture*, 255(4): 133-141

Lasmi L. 2013. Studi adsorpsi kompetitif logam Ag(I), Cu(II) dan Cr (III) pada asam humat. *Tesis*. Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Gadjah Mada. 64 hlm

Mulia DS. 2003. Pengaruh cara booster terhadap efikasi vaksinasi oral dengan deebri sel *Aeromonas hydrophilla* pada lele dumbo (*Clarias sp.*). *Jurnal Perikanan*, 8(1): 34-43

Nakagawa J, Iwasaki T, Kodama H. 2009. Protection against *Flavobacterium psychrophilum* infection (cold water disease) in ayu fish (*Plecoglossus altivelis*) by oral administration of humus extract. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71(11): 1487-1491

Platt N, Gordon S. 1998. Scavenger receptor: Diverse activities and promiscuous binding of polyanionic ligands. *Chemistry & Biology*, 5(8): 193-203

Schepetkin IA, Khlenbikov AI, Ah SH, Woo SB, Jeong C, Klubachuk ON, Kwon BS. 2003. Characterization and biological activities of humic substances from mumie *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18): 5245-5254

- Stevenson FJ. 1994. *Humus Chemistry, Genesis, Composition, Reaction*. John Willey & Sons Inc. New York. 512 p.
- Vašková J, Veliká B, Pilátová M, Kron I, Vaško L. 2011. Effects of humic acids in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 47(5-6): 376–382
- Vetvicka V, Baigorri R, Zamarreio AM, Garcia-Mina JM, Yvin J. 2010. Glucan and humic acid: synergistic effects on the immune system. *Journal of Medicine Food*, 13(4): 863-869
- Yin G, Jeney G, Racz T, Xu P, Jun X, Jeney Z. 2006. Effect of two chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) on non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 253(4): 39-47
- Yin Z, Lam TJ, Sin YM. 1995. The effects of crowding stress on the non-specific immune response in fancy carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 5(7): 519-529