

PENGARUH PENAMBAHAN VITAMIN C (*Ascorbic Acid*) PADA PAKAN KOMERSIAL TERHADAP KETAHANAN BENIH LELE DUMBO (*Clarias* sp. Burchell) TERHADAP INFEKSI BAKTERI *Aeromonas hydrophila* Stainer

Taukhid¹⁾, Hambali Supriyadi²⁾, dan Nenden Dalis Asmaeni³⁾

ABSTRAK

Riset ini bertujuan untuk mengetahui jumlah optimal penambahan vitamin C ke dalam pakan ikan lele dumbo yang dapat memberikan ketahanan tubuh maksimal terhadap infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. Perlakuan yang diterapkan terdiri atas (A) pakan komersial tanpa penambahan vitamin C sebagai kontrol, (B) penambahan vitamin C sebanyak 250 mg/kg pakan, (C) penambahan vitamin C sebanyak 500 mg/kg pakan, (D) penambahan vitamin C sebanyak 750 mg/kg pakan, dan (E) penambahan vitamin C sebanyak 1.000 mg/kg pakan. Pakan diberikan selama 62 hari, dan pada hari ke-56 dilakukan ujiantang terhadap bakteri *A. hydrophila* konsentrasi $1,0 \times 10^6$ cfu/mL yang diberikan melalui penyuntikan intra muskular (IM) sebanyak 0,1 mL/ekor ikan uji. Pengamatan dilakukan terhadap kadar titer antibodi spesifik, gejala klinis, dan sintasan setelah ujiantang serta kadar vitamin C dalam hati ikan. Hasil riset menunjukkan bahwa penambahan vitamin C pada pakan dapat meningkatkan ketahanan tubuh ikan uji terhadap infeksi bakteri *A. hydrophila*, dan nilai titer antibodi spesifik mengalami peningkatan yang mulai terlihat pada minggu ke-IV. Pada akhir pengamatan diperoleh sintasan ikan uji sebesar 68%, 78%, 92%, 96%, dan 92% masing-masing untuk kelompok kontrol, perlakuan B, perlakuan C, perlakuan D, dan perlakuan E. Berdasarkan analisis regresi dapat didekati bahwa jumlah optimal vitamin C untuk memperoleh level proteksi yang cukup tinggi dengan sintasan 98,86% adalah sebesar 893 mg/kg pakan.

ABSTRACT: *The effect of vitamin C addition to commercial diet on the resistance of African catfish (Clarias sp.) against Aeromonas hydrophila infection. By: Taukhid, Hambali Supriyadi, and Nenden Dalis Asmaeni*

The experiment with the aim to know the amount of vitamin C added to commercial diet that could improved a maximum resistance of African catfish against Aeromonas hydrophila infection has been conducted. The treatments were (A) commercial diet without vitamin C as a control, (B) commercial diet with 250 mg/kg vitamin C, (C) 500 mg/kg, (D) 750 mg/kg, and (E) 1,000 mg/kg. The diet was given for 62 days, and at the 56th day the fish was challenged against A. hydrophila infection through intra muscular injection at the dose of 0.1 mL of 1.0×10^6 cfu bacterial suspensions. Specific antibody titer, clinical signs, survival rate, and vitamin C level on the liver of the fish were observed. The results indicated that addition of vitamin C to the diet was effective to increase the resistance of African catfish against A. hydrophila infection. Survival rates of fish test at the end of the experiment were 68%, 78%, 92%, 96%, and 92% for the group of A, B, C, D, and E respectively. Based on regression analysis, the optimum amount of vitamin C addition to the diet was 893 mg/kg with a survival rate of 98.86%.

KEYWORDS: *vitamin C, resistance, African catfish, Aeromonas*

¹⁾ Peneliti pada Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar, Bogor

²⁾ Peneliti pada Pusat Riset Perikanan Budidaya, Jakarta

³⁾ Fakultas Pertanian, Universitas Padjajaran, Bandung

PENDAHULUAN

Pembenihan ikan lele merupakan rangkaian usaha yang turut menentukan keberhasilan usaha budi dayanya. Kebutuhan benih ikan lele baik dalam jumlah maupun kualitas sering tidak dapat dipenuhi, dan salah satu faktor yang menjadi penyebabnya adalah akibat serangan jasad patogen. Nitimulyo (1992) menyatakan bahwa kendala serius yang selalu dihadapi dalam budi daya ikan lele dumbo adalah serangan penyakit terutama pada pembenihan.

Penyakit bakterial pada budi daya ikan air tawar umumnya disebabkan oleh infeksi *Aeromonas* sp. dan *Pseudomonas* sp. (Supriyadi, 1986; Arsyad & Hadirini, 1988). Kabata (1985) melaporkan bahwa bakteri *A. hydrophila* merupakan penyebab terjadinya wabah penyakit bercak merah atau "dropsy" pada ikan lele lokal di Pulau Jawa.

Penanggulangan penyakit bakterial pada budi daya ikan lele dengan menggunakan antibiotik dan bahan-bahan kimia lain telah banyak dilakukan, namun penggunaan material tersebut secara terus-menerus akan menimbulkan dampak yang kurang baik, antara lain resistensi patogen, serta harganya relatif mahal. Sejumlah materi biologis dan sintesis, atau lebih umum disebut "imunostimulan", telah diketahui memiliki potensi untuk meningkatkan ketahanan tubuh ikan. Vitamin C merupakan salah satu unsur yang berperan penting sebagai koenzim reaksi biokimia dalam tubuh, mencegah kelainan bentuk tulang, mencegah pengaruh negatif akibat gangguan lingkungan atau stres, meningkatkan ketahanan tubuh (imunitas) (Lim & Lovell, 1978; Lovell, 1982; Navarre & Halver, 1989; dan Ikeda, 1991), serta mempercepat proses penyembuhan luka (Jouncey *et al.*, 1985; Ikeda, 1991).

Ikeda (1991) melaporkan bahwa pemberian vitamin C hingga dosis tertentu akan meningkatkan kesehatan ikan mulai dari perkembangan telur hingga dewasa. Hasil penelitian Lovell (1973); Andrews & Murai (1975), Lim & Lovell (1978) menunjukkan bahwa vitamin C sangat berperan dalam pertumbuhan ikan *Ictalurus* sp. Lebih lanjut Ikeda (1991) melaporkan bahwa pada ikan rainbow trout (*Salmo gairdneri*), kekurangan vitamin C dalam makanan menyebabkan kemampuan mensintesis kolagen menurun, sehingga mempengaruhi proses penyembuhan luka pada ikan tersebut.

Durve & Lovell (1982) melaporkan bahwa diperlukan vitamin C pada dosis yang lebih tinggi dari kebutuhan normal untuk meningkatkan daya tahan tubuh terhadap infeksi bakteri pada channel catfish (*Ictalurus punctatus*), jika ikan diberi pakan tanpa penambahan vitamin C, akan menjadi lebih peka terhadap infeksi patogen dan mudah stres (Navarre & Halver, 1989). Robinson (1991) menyarankan bahwa vitamin C dosis tinggi untuk kelompok *catfish* adalah pada kisaran 500-1.000 mg/kg pakan. Sedangkan menurut Nuranto (1991), kebutuhan optimum vitamin C untuk pertumbuhan ikan lele (*C. batrachus*) dalam kondisi normal adalah 25-100 mg/kg pakan. Namun karena vitamin C tidak dapat disintesis di dalam tubuh oleh beberapa jenis ikan seperti *Ictalurus* sp. (Lovell, 1973; Wilson & Poe, 1973; Lim & Lovel, 1978); salmon dan trout (Yamamoto *et al.*, 1978), sehingga dibutuhkan vitamin C dari luar untuk sintasan dan pertumbuhan normal.

Riset ini bertujuan untuk mengetahui jumlah penambahan vitamin C yang optimum pada pakan komersial yang dapat memberikan ketahanan maksimum terhadap infeksi bakteri *A. hydrophila* bagi sintasan benih ikan lele dumbo.

BAHAN DAN METODE

Ikan lele dumbo yang digunakan sebagai ikan uji berasal dari satu "batch" yang diperoleh dari petani ikan di daerah Parung, Bogor. Selama proses transportasi dari petani pembenih ke laboratorium percobaan, media transportasi ditambah garam dapur tanpa yodium sebanyak 30 mg/L yang bertujuan untuk mengurangi stres serta merontokkan ekto-parasit yang mungkin menginfeksi. Benih-benih ikan tersebut kemudian diadaptasikan dalam wadah percobaan selama 5 hari agar teraklimatisasi dengan lingkungan laboratorium serta terbiasa mengkonsumsi pakan buatan.

Wadah riset yang digunakan adalah bak fiber glass volume 50 liter sebanyak 25 buah. Masing-masing wadah berisi air sebanyak 35 liter dan diisi ikan uji ukuran 5-7 cm sebanyak 70 ekor/wadah. Bagian atas wadah ditutup dengan kain kasa dan plastik hitam yang bertujuan untuk mencegah keluarnya ikan uji serta mengurangi fluktuasi suhu air yang terlalu tinggi. Penggantian air pemeliharaan dilakukan setiap hari sebanyak 10% dari total volume air. Perlakuan yang diterapkan pada penelitian ini adalah penambahan vitamin C jenis CVC F-90

(*microencapsulated vitamin C*) pada pakan komersial (diasumsikan kandungan vitamin C pada pakan tersebut adalah 0 mg/kg) pada berbagai dosis penambahan, yaitu:

- (A) Pakan komersial tanpa penambahan vitamin C,
- (B) Pakan komersial dengan penambahan vitamin C sebanyak 250 mg/kg,
- (C) Pakan komersial dengan penambahan vitamin C sebanyak 500 mg/kg,
- (D) Pakan komersial dengan penambahan vitamin C sebanyak 750 mg/kg,
- (E) Pakan komersial dengan penambahan vitamin C sebanyak 1.000 mg/kg.

Rancangan percobaan yang diterapkan pada riset ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 faktor utama (A, B, C, D, dan E) sebagai perlakuan, dan masing-masing perlakuan diulang sebanyak 5 (lima) kali. Untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh perlakuan terhadap sintasan ikan uji, digunakan uji F. Apabila dari hasil uji tersebut menunjukkan adanya perbedaan yang nyata, maka dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan. Untuk menentukan korelasi antara dosis vitamin C optimum terhadap rata-rata sintasan ikan uji secara matematis, dilakukan analisis regresi.

Penambahan vitamin C ke dalam pakan dilakukan dengan cara menghancurkan pelet komersial terlebih dahulu ke dalam bentuk remah, kemudian vitamin C yang berbentuk serbuk (*powder*) dicampur sesuai dosis yang hendak diterapkan hingga homogen. Pakan yang sudah homogen dengan vitamin C dibentuk adonan dengan menambahkan air sedikit demi sedikit melalui bantuan alat semprot (*sprayer*). Selanjutnya adonan tersebut dibentuk pelet dengan alat giling yang dioperasikan secara manual. Pellet yang sudah terbentuk, dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C--56°C selama 6--8 jam dan selanjutnya dikemas dalam kantong plastik berwarna gelap untuk disimpan dalam tempat yang sejuk dan kering.

Jumlah pakan yang diberikan kepada ikan uji sebanyak 5% bobot biomassa per hari yang diberikan sebanyak empat kali/hari yaitu pada pukul 08.00, 11.00, 15.00, dan pukul 19.00. Sedangkan penyesuaian jumlah pakan yang diberikan dilakukan setiap 10 hari.

Uji tantangan dilakukan dalam akuarium ukuran 30 x 35 x 60 cm³ yang diisi air sebanyak

25 liter dan diisi ikan sebanyak 50 ekor/akuarium. Infeksi buatan terhadap bakteri *A. hydrophila* dilakukan melalui teknik penyuntikan secara intraperitoneal (IP) sebanyak 0,1 mL/ekor ikan dengan larutan bakterin konsentrasi $1,0 \times 10^6$ cfu/mL. Pengamatan dilakukan setiap 12 jam terhadap gejala klinis dan sintasan ikan uji hingga hari ke-7 setelah proses infeksi.

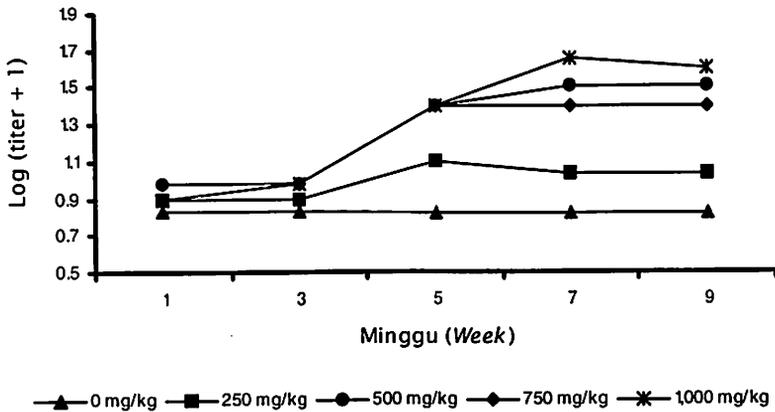
Titer antibodi terhadap bakteri *A. hydrophila* pada serum darah ikan uji dilakukan setiap dua minggu hingga akhir percobaan. Untuk memudahkan proses tabulasi, maka nilai titer antibodi ditransformasi ke dalam log (titer + 1) sesuai dengan teknik yang digunakan oleh Carpenter (1975). Pengambilan darah dilakukan secara acak terhadap seekor ikan uji dari masing-masing wadah, kemudian disatukan (*pooling*) menjadi satu dari perlakuan yang sama. Proses untuk mendapatkan serum serta teknik pengamatan adanya titer antibodi terhadap *A. hydrophila* dilakukan menurut teknik yang dikembangkan oleh Adam (1998).

Pada akhir percobaan, dilakukan analisis kandungan vitamin C pada hati ikan uji dengan teknik *High Performance Liquid Chromatograph* (HPLC). Sebanyak 2 (dua) ekor dari tiap wadah, diambil organ hati secara aseptik, kemudian disatukan menjadi satu dari perlakuan yang sama.

HASIL DAN BAHASAN

Hasil pengamatan titer antibodi hingga minggu ke-3 menunjukkan bahwa pada semua perlakuan diperoleh nilai titer antibodi pada *level* yang sama, yaitu masih terdeteksi hingga pengenceran ke-8. Hal ini sangat mungkin bahwa selama 2 minggu pertama, fungsi vitamin C sebagai unsur modulator pada proses induksi kekebalan spesifik belum memperlihatkan peran yang signifikan. Hal ini juga terjadi pada hasil penelitian Navarre & Halver (1989) pada ikan *rainbow trout* yang diberi pakan bervitamin C sebanyak 5--10 kali kebutuhan untuk pertumbuhan normal (100 mg/kg pakan), kemudian diuji tantangan dengan bakteri *Vibrio anguillarum* memperlihatkan bahwa peningkatan produksi antibodi spesifik baru terlihat pada minggu ke-3 & 4 setelah perlakuan. Hasil nilai titer antibodi terhadap antigen *A. hydrophila* selengkapnya disajikan pada Gambar 1.

Mekanisme pembentukan antibodi spesifik dapat berlangsung apabila sel penghasil limfosit telah berfungsi dengan baik dan adanya rangsangan antigen penginfeksi baik melalui



Gambar 1. Rataan nilai titer antibodi lele dumbo yang diberi pakan dengan kandungan vitamin C berbeda selama pemeliharaan pada minggu ke-1, 3, 5, 7, dan 9

Figure 1. Mean of antibody titre of African cat fish fed by different level of vitamin C in its diet at the first to ninth week after application

proses alamiah maupun buatan. Antigen yang masuk ke dalam tubuh organisme akan difagosit secara aktif oleh populasi sel yang berinti bundar (makrofag). Makrofag tersebut kemudian mengirim signal kepada sel limfosit untuk aktif (membesar dan berpolimerisasi) yang akhirnya akan menghasilkan antibodi spesifik sesuai dengan antigen yang memberi rangsangan (Tizard, 1988). Untuk optimalisasi proses tersebut, vitamin C sangat berperan sebagai koenzim modulator melalui aktivasi "cell mediated immunity", yaitu memelihara fungsi sel fagosit dengan cara meningkatkan kegiatan kemotaktik neutrofil dan makrofag serta mobilitas fagositosis (Beisel, 1982 dalam Satyabudhy *et al.*, 1990).

Sintasan tertinggi ikan lele dumbo selama proses ujiantang terhadap infeksi bakteri patogen yang berlangsung selama satu minggu diperoleh pada perlakuan D (pakan komersial dengan penambahan vitamin C sebanyak 750 mg/kg) yaitu sebesar 96,00%; sedangkan sintasan terendah ditunjukkan pada perlakuan A (pakan komersial tanpa penambahan vitamin C) yaitu sebesar 68,00%; seperti terlihat pada Tabel 1.

Pada Tabel 1 terlihat bahwa rata-rata sintasan menurut uji jarak berganda Duncan pada taraf 5% menunjukkan bahwa pada perlakuan B Perlakuan C, D, dan E berbeda nyata ($P < 0,05$) terhadap A dan B, sedangkan antara perlakuan

C, D, dan E tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) terhadap masing-masing perlakuan. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa pemberian vitamin C hingga batas 500 mg dalam pakan ikan berpengaruh terhadap tingkat sintasan.

Rataan kandungan vitamin C yang terdeteksi dalam hati ikan uji pada penambahan sebanyak 0 mg/kg (kontrol), 250 mg/kg, 500 mg/kg, 750 mg/kg dan 1.000 mg/kg masing-masing sampel mempunyai kandungan sebanyak 156,77 mg/g; 190,19 mg/g; 214,40 mg/g; 244,67 mg/g; dan 268,73 mg/g (Tabel 2).

Navarre & Halver (1989) menyatakan bahwa kandungan vitamin C dalam tubuh ikan meningkat sejalan dengan peningkatan kadar yang terdapat dalam pakan hingga dosis tertentu. Selanjutnya diterangkan bahwa kadar vitamin C tertinggi diperoleh pada penambahan vitamin C sebanyak 2.000 mg/kg dengan laju pertumbuhan dan sintasan yang tidak berbeda nyata dengan penambahan vitamin C sebanyak 500 dan 1.000 mg/kg pakan. Satyabudhy *et al.* (1990); Winarno (1991) menyatakan adanya korelasi yang linier antara kadar asam askorbat (vitamin C) yang terkandung di dalam pakan dengan hati ikan trout. Selanjutnya Ikeda (1991); Robinson (1991) mengemukakan bahwa kandungan vitamin C dalam hati ikan meningkat secara proporsional dengan tingkat penambahan vitamin C pada pakan. Lebih lanjut Robinson

Tabel 2. Sintasan ikan lele dumbo (*Clarias sp.*) dengan penambahan vitamin C yang berbeda

Table 2. Survival rate of African cat fish (*Clarias sp.*) fed by different doses of vitamin C

Perlakuan (mg/kg pakan) <i>Treatment (mg/kg feed)</i>	Sintasan (%) <i>Survival rate (%)</i>
A (0)	68.00 ^a
B (250)	78.00 ^b
C (500)	92.00 ^c
D (750)	96.00 ^c
E (1,000)	92.00 ^c

Keterangan (Note):

Nilai rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut uji jarak berganda Duncan pada taraf uji lima persen (Numbers followed by the same character indicated that there was no significant different at ninety five percent limit confidence)

Tabel 2. Kandungan vitamin C (mg/g) pada hati ikan lele dumbo pada akhir perlakuan yang dianalisis dengan teknik HPLC (*High Performance Liquid Chromatograph*)

Table 2. Content of vitamin C (mg/g) in the liver of cat fish at the end of the experiment analysed by High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) technique

Ulangan <i>Replication</i>	Dosis penambahan vitamin C (mg/kg pakan) <i>Dosage of vitamin C added (mg/kg feed)</i>				
	0	250	500	750	1,000
1	167.18	219.68	180.02	239.79	251.22
2	146.81	194.57	249.87	251.83	289.99
3	156.31	157.33	213.32	242.4	264.98
Rataan (Mean)	156.77	190.19	214.4	244.67	268.73

(1991) menyatakan bahwa kandungan vitamin C di dalam hati relatif konstan dan merupakan indikator terbaik keberadaan vitamin C, karena pada hati tersebut tidak banyak faktor peubah yang mengakibatkan tidak konstannya keberadaan vitamin C. Sedangkan penambahan vitamin C yang berlebihan tidak akan membahayakan ikan, karena kelebihan vitamin C akan terbuang melalui urine.

Navarre & Halver (1989) menyatakan bahwa diperlukan dosis vitamin C lebih tinggi dari kebutuhan normal untuk meningkatkan daya tahan terhadap infeksi bakteri pada *rainbow trout*. Lebih lanjut Satyabudhy *et al.* (1990) menjelaskan bahwa dengan penambahan vitamin C yang berbeda dalam pakan ikan *trout*

yang diserang "Infectious Hematopoietic Necrosis (IHN)" dihasilkan angka kematian dan tingkat sintasan yang berbeda pada setiap penambahan vitamin C yang berbeda.

Dari hasil analisis kandungan vitamin C (Tabel 2), pada perlakuan C, D, dan E dengan masing-masing kandungannya yang berbeda menghasilkan sintasan yang tidak berbeda nyata. Hal ini mengindikasikan bahwa vitamin C yang terserap oleh organ tubuh lele dumbo antar perlakuan tidak jauh berbeda dalam memacu sistem pertahanan tubuh. Di dalam tubuh, berbagai zat makanan diolah dalam reaksi biokimia, dan proses pengolahan ini hanya terjadi apabila terdapat pengatur khusus yang terdapat di dalam sel-sel dan cairan tubuh yang

disebut enzim. Enzim hanya dapat berfungsi optimal apabila terdapat vitamin yang merupakan penggiatnya, dan vitamin C merupakan salah satu zat penggiat yang berupa koenzim. Menurut Navarre & Halver (1989); Ikeda (1991); Robinson (1991), vitamin C sampai dosis tertentu dapat meningkatkan sistem pertahanan tubuh, di mana mekanismenya diduga adalah sebagai koenzim modulator melalui aktivasi "cell mediated immunity". Selanjutnya Beisel (1982) dalam Satyabudhy *et al.* (1990) menyatakan bahwa asam askorbat (vitamin C) berperan penting dalam pemeliharaan sistem kekebalan yaitu membantu memelihara fungsi sel fagosit melalui peningkatan kegiatan kemotaktik netrofil dan makrofag serta mobilitas fagosit; dan kegiatan tersebut berpengaruh langsung terhadap pembentukan sel-sel fagosit.

Dari hasil analisis regresi diperoleh bahwa pengaruh penambahan vitamin C ke dalam pakan dapat meningkatkan sintasan benih ikan lele dumbo sesudah diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophila* patogen. Secara umum, hasil percobaan ini diperoleh respon yang berpola kuadrat dengan formula $Y = 67,61 + 0,07x - 3,92 \cdot 10^{-5}x^2$. Berdasarkan persamaan kuadrat tersebut didapatkan nilai optimum yang memberikan proteksi cukup baik pada benih lele dumbo dicapai dengan penambahan vitamin C pada pakan komersial sebanyak 893 mg/kg pakan dengan tingkat sintasan 98,86 persen.

KESIMPULAN

- ❖ Penambahan vitamin C pada pakan komersial sebanyak 250, 500, 750, dan 1.000 mg/kg pakan dapat meningkatkan ketahanan tubuh benih ikan lele dumbo terhadap infeksi bakteri *A. hydrophila*, dengan tingkat sintasan masing-masing sebesar 78%, 92%, 96%, dan 92%; dibandingkan dengan kelompok kontrol sebesar 68%.
- ❖ Peningkatan kekebalan tubuh spesifik dari pengaruh penambahan vitamin C dalam pakan mulai terlihat nyata setelah minggu ke IV, dan ketahanan benih lele dumbo terhadap infeksi bakteri *A. hydrophila* memiliki pola yang cenderung meningkat sejalan dengan jumlah penambahan vitamin C dalam pakan hingga dosis 750 mg/kg pakan.
- ❖ Dosis vitamin C yang optimal berdasarkan analisis regresi untuk mendapatkan tingkat

sintasan benih lele dumbo tertinggi yaitu 98,86% adalah sebanyak 893 mg/kg pakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Adam, A. 1998. Application of Rapid Diagnostic in Fish and Shrimp Disease. Laboratory Manual for Rapid Diagnostic Method Workshop Held at Aquatic Animal Health Research Institute, Bangkok Thailand 9-13 March 1998, 34 pp.
- Andrews, J.W. and T. Murai. 1975. Studies on the vitamin C requirement of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). J. Nutr., 105: 557--561.
- Arsyad, H. dan R.E. Hadirini. 1988. Penuntun praktis budi daya perikanan. PD. Mahkota. Jakarta, 144 pp.
- Carpenter, P.L. 1975. Immunology and serology. Third Ed. W.B. Saunder Co. Philadelphia, 345 pp.
- Durve, V.S. and R.T. Lovell. 1982. Vitamin C and disease resistance in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Can. J. Fish Aquaculture Sci., 39: 139--149.
- Ikeda, S. 1991. The crucial role of vitamin C in fish farming. Bulletin Gold Coin Aquaculture, 13(12): 1--13.
- Jouncey, K., A.K. Soliman, and R.J. Roberts. 1985. Ascorbic acid requirements in relation to wound healing in the cultured tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture Fish Manage, 16: 139--149.
- Kabata, Z. 1985. Parasites and diseases of fish cultured in the tropics. Taylor dan Francis. London and Philadelphia, 318 pp.
- Lim, C. and T.R. Lovell. 1978. Pathology of the vitamin C deficiency syndrome in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). J. Nutr, 108: 1,137--1,148.
- Lovell, T.R. 1973. Essentiality of vitamin C in feed for intensively fed caged channel catfish. J. Nutr, 103: 134--138.
- Lovell, T.R. 1982. Elevated levels of vitamin C increase disease resistance in channel catfish. Reprinted from Highlights of Agricultural Research, 29(1): 17--21.
- Navarre, O. and J.E. Halver. 1989. Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. Aquaculture, 79: 207--221.
- Nitimulyo, K.H. 1992. Vaksinasi induk lele dumbo (*Clarias gariepinus*) untuk meningkatkan ketahanan benih terhadap *Aeromonas hydrophila*. Majalah Primadona, Jakarta. Edisi April, 14 pp.

- Nuranto, S. 1991. Pengaruh vitamin C terhadap pertumbuhan ikan lele (*Clarias batrachus* Linnaeus). Tesis Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor, 73 pp.
- Robinson, H. 1991. Deficiency sign and dietary requirement. Bulletin Gold Coin Aquaculture, 13: 12/91, p. 16--22.
- Satyabudhy, A.M.A., B.F. Gtant, and J.E. Halver. 1990. Pengaruh L-ascorbyl-2-phosphatase (AsPP) pada pertumbuhan dan ketahanan ikan rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) terhadap infeksi virus. Prosiding Seminar Nasional II Penyakit Ikan dan Udang 16 - 18 Januari 1990. Bogor, p. 71--82.
- Supriyadi, H. 1986. The susceptibility of various fish species to infection by the bacterium *Aeromonas hydrophila*. Research Institute for Freshwater Fisheries, Bogor, p. 241--242.
- Tizard, I. 1988. An introduction to veterinary immunology. Penerjemah P. Masduki dan S. Hardjosworo. Pengantar Imunologi Veteriner. Universitas Airlangga, 197 pp.
- Wilson, R.P. and W.E. Poe. 1973. Impaired collagen formation in the scorbutic channel catfish. J. Nutr, 103: 1,359--1,365.
- Winarno, F.G. 1991. Kimia pangan dan gizi. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta, 251 pp.
- Yamamoto, Y., M. Sato, and S. Ikeda. 1978. Existence of L-gulonolactone oksidase in some teleosts. Bull. of Japanese Soc. of Sci. Fish, 44 (7): 775--779.