

Pengaruh Ekstrak Etanol Terhadap Peningkatan Konsentrasi Hemoglobin dan Nilai Hematokrit Ikan Kerapu Tikus

Saparuddin

Program Studi Pendidikan Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Sembilanbelas November Kolaka
e-mail: Saparuddin_pbio@usn.ac.id

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektifitas penggunaan ekstrak daun *M. tanarius* yang dicampur dengan pakan ikan komersil yang menginaktivkan VNN yang diukur berdasarkan kadar hemoglobin dan nilai hematokrit ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*). Dalam penelitian ini digunakan Desain Rancangan Acak Kelompok. Dua puluh lima ekor ikan kerapu tikus yang terinfeksi VNN dengan berat badan rata-rata 824,4 \pm 156,23 g dibagi dalam 5 kelompok keramba jaring apung, masing-masing kelompok berisi 5 ekor ikan. Perlakuan 1, 2, 3 dan 4 masing-masing diberikan ekstrak daun *M. tanarius* dicampur dengan pakan ikan komersil berturut-turut 2 g, 3 g, 4 g, 5 g dan ikan kontrol hanya diberikan pakan ikan komersil. Masing-masing ikan dari semua kelompok diambil darahnya melalui vena caudalis. Hasil penelitian antara ikan perlakuan dan kontrol menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun *M. tanarius* efektif secara signifikan menaikkan kadar hemoglobin dan nilai hematokrit serta memberikan perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol. Jumlah kadar hemoglobin tertinggi diperoleh pada perlakuan ke-3 (11,96 gr%), sedangkan nilai hematokrit tertinggi pada perlakuan ke-3 (38,12%). Dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun *M. tanarius* melalui pemberian pakan dapat menginaktivasi VNN pada ikan kerapu tikus ditandai dengan meningkatkan kadar hemoglobin dan nilai hematokrit ikan kerapu tikus.

Kata kunci : Ikan kerapu tikus, kadar hemoglobin, nilai hematokrit, *M. tanarius* dan VNN

1. PENDAHULUAN

Budidaya ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) dewasa ini berkembang dengan pesat mengingat tingginya permintaan konsumen terhadap ikan tersebut. Namun, yang menjadi kendala bagi para petani budidaya ikan kerapu tikus adalah munculnya Viral Nervous Necrosis (VNN). Hal ini disebabkan karena pakan yang digunakan oleh para petani budidaya masih menggunakan ikan rucah. Rizka et al. (2013) menyatakan bahwa pemberian pakan dengan ikan rucah pada usaha budidaya ikan kerapu tikus menyebabkan terinfeksi VNN. Jenis virus ini adalah jenis Nodaviridae yang dapat menyebabkan kematian massal hingga 100% dalam budidaya.

Infeksi VNN pada organ otak ikan kerapu tikus berlangsung dengan cepat dan langsung menyerang reseptor sel saraf ikan, karena VNN adalah virus yang tidak mempunyai envelope, kemudian virus menyebar ke seluruh tubuh dan otak melalui sirkulasi darah. Chi (2006) menyatakan bahwa VNN menyerang otak melalui sirkulasi darah.

Gejala-gejala ikan yang terinfeksi VNN antara lain berenang tidak normal (berputar-putar), gerakan lemah, nafsu makan berkurang, pembesaran gelembung renang pada beberapa species ikan, warna tubuh menjadi kehitaman, tubuh ikan menukil kebawa, ikan menabrak dinding kolam, penutupan selaput mata, mengalami buta dan pelemahan syaraf dan akhirnya ikan mati dalam Chi (2006) dan Yanuhar (2009).

Lagler et al (1977) menyatakan bahwa Sel dan cairan darah (plasma darah) merupakan aspek diagnosa yang penting untuk dikaji, karena aspek tersebut mempunyai peran fisiologis yang sangat penting serta mampu menggambarkan kondisi kesehatan ikan. Ikan yang terinfeksi VNN akan ada perbedaan pada konsentrasi hemoglobin dan nilai hematokrit.

Pemeriksaan darah ikan merupakan faktor penting dalam membantu diagnosis, prognosis, dan terapi Irianto (2005). Sejauh ini pemeriksaan darah ikan kerapu tikus dari aspek hematologi belum banyak yang melaporkan. Sehingga untuk mengetahui status ikan terinfeksi, maka perlu dilakukan pemeriksaan karakteristik darah, yang nantinya dapat digunakan sebagai solusi penanganan VNN pada ikan kerapu tikus.

Berdasarkan studi literatur bahwa Sampai saat ini belum ditemukan suatu cara yang dapat menekan infeksi VNN pada budidaya ikan kerapu tikus. Oleh sebab itu, diperlukan suatu upaya alternatif yang dapat mengatasi infeksi VNN tersebut. Ekstrak etanol daun *M. tanarius* diketahui mengandung senyawa flavonoid, tannin, terpenoid dan lignan Yana dkk (2007). Senyawa flavonoid (quercetin, morin, rutin, dan hesperidin) memiliki kemampuan secara *in vitro* untuk menghambat siklus replikasi virus yaitu pada tahap adsorpsi dan penetrasi dalam Calvalho, dkk (2013). Senyawa tanin adalah polimer ditunjukkan untuk menghambat pertumbuhan virus immunodeciency human (HIV) dan virus herpes simpleks (HSV) dalam Lee dkk (2000). Senyawa-senyawa tersebut merupakan senyawa bioaktif yang telah teruji secara *in vitro* bersifat sebagai anti virus. Namun, secara *in vivo* peran senyawa bioaktif ini belum pernah diteliti khususnya pada ikan kerapu tikus.

Berdasarkan uraian di atas maka perlu dilakukan penelitian mengenai peran senyawa ekstrak etanol daun *M. tanarius* yang dapat menginaktifasi virus VNN pada ikan kerapu tikus yang diukur berdasarkan konsentrasi hemoglobin dan nilai hematokrit..

2. METODE PENELITIAN

Metode kerja dalam penelitian ini dilakukan dengan 6 tahapan yaitu 1). Pengumpulan dan pengeringan daun *M. tanarius*, 2) Pembuatan ekstraksi daun *M. tanarius*, 3). Penyemprotan ekstrak daun *M. tanarius* pada pakan ikan komersil, 4). Desain perlakuan (eksperimen) dan pemeliharaan ikan, 5). Pengambilan sampel darah ikan dan 6). Pengamatan kadar hemoglobin dan nilai hematokrit ikan kerapu tikus.

2.1 Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak daun *M. tanarius* diawali dengan pengeringan pada suhu ruang dan dilanjutkan dengan penghalusan. Serbuk halus kemudian direndam dengan menggunakan etanol 80% selama 24 jam yang disertai dengan pengadukan. Selanjutnya larutan disaring menggunakan corong buchner yang dilapis dengan kertas saring untuk memisahkan ampas (residu) dengan filtrat yang mengandung senyawa yang larut dalam pelarut. Penyaringan ini dilakukan tiga kali secara berulang sampai warna campuran menjadi agak pudar. Pelarut kemudian dipisahkan dengan cara evaporasi pada suhu 60 oC lalu didapat hasil ekstraksi berupa ekstrak pekat. Hasil ekstrak pekat daun *M. tanarius*

diperoleh kemudian diletakkan di atas water bath suhu 50oC untuk menghilangkan pelarutnya sehingga didapatkan ekstrak kental.

2.2 Desain Perlakuan dan Pemeliharaan

Penelitian dilakukan dengan Rancangan Acak Kelompok (RAK), lima perlakuan dan lima ulangan. Disiapkan lima kelompok Keramba Jaring Apung (KJA), dengan ukuran masing-masing kelompok 1x1x1,5 m. Dikumpulkan sebanyak dua puluh lima ekor ikan kerapu tikus yang terinfeksi VNN, sesuai dengan gejala-gejala ikan yang terinfeksi VNN. Rata-rata berat badan ikan kerapu tikus yang terkumpul adalah 824,4 ± 156,23 g. Ikan-ikan tersebut dikumpulkan dari petani budidaya ikan kerapu tikus yang pemeliharaannya diberikan pakan ikan rucah. Setiap kelompok perlakuan diberikan 120 g pakan ikan komersil per hari (3% dari masing-masing berat badan ikan) dalam Yushinta dkk (2011).

Pemberian pakan dilakukan 2 kali sehari. Setiap pemberian seberat 60 g pakan ikan komersil pada setiap kelompok perlakuan. Perlakuan 1, 2, 3, dan 4, masing-masing berturut-turut diberikan 2 g, 3 g, 4 g, dan 5 g ekstrak daun *M. tanarius* disemprotkan pada pakan ikan komersil, sedangkan perlakuan kontrol hanya diberikan pakan ikan komersil tanpa ekstrak daun *M. tanarius*. Pemberian pakan dilakukan setiap pukul 06.30 dan pukul 17.30 WITA. Perlakuan dilakukan selama 30 hari.

2.3 Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan kerapu tikus (*C. altivelis*) dengan berat badan rata-rata 824,4 ± 156,23 g. Hewan uji tersebut diperoleh dari petani budidaya dengan diberikan pakan ikan rucah selama pemeliharaannya. Menurut Rizka et al., (2013) bahwa pemberian pakan dengan ikan rucah akan terinfeksi VNN. Hewan uji diseleksi sesuai dengan gejala-gejala klinik yang disebabkan oleh VNN yaitu warna tubuh menggelap, berenang berputar-putar, tubuh ikan menukil kebawah, ikan menabrak dinding kolam, penutupan selaput mata, mengalami buta dan pelemahan syaraf dan ikan mati (Yanuhar, 2011).

2.4 Perlakuan

Sebanyak 25 ekor ikan kerapu tikus yang terinfeksi VNN dibagi ke dalam 5 kelompok jaring apung. Setiap kelompok berisi 5 ekor ikan dengan lima kali ulangan. Perlakuan 1, 2, 3 dan 4 masing-masing diberikan ekstrak daun *M. tanarius* dicampur dengan pakan ikan komersil berturut-turut 2 g, 3g, 4 g dan 5g. Ikan kontrol hanya diberikan pakan komersil.

2.5 Pengambilan Sampel Darah

Sampel darah diambil pada hari ke-0, hari-10, hari ke-20 dan hari ke-30 setelah pemberian pakan 2 kali/hari. Pengambilan sampel darah menggunakan syringe melalui vena caudalis dekat ekor di antara sisik ikan kerapu tikus. Sampel darah dihisap perlahan sebanyak 3 mL setiap ekor, kemudian dipindahkan ke dalam tabung hampa udara yang telah dibasahi terlebih dahulu dengan antikoagulan.

2.6 Pengamatan Konsentrasi Hemoglobin

Penghitungan konsentrasi hemoglobin ikan kerapu tikus sebelum dan sesudah perlakuan dengan pemberian ekstrak daun *M. tanarius* dapat diukur dengan menggunakan metode Sahli. Sistem kerja metode ini yaitu dengan mengamati kesamaan warna sampel

perlakuan dengan warna standar pada alat sahli. Untuk mengamati konsentrasi hemoglobin, terlebih dahulu sampel darah ikan kerapu tikus dari semua masing-masing kelompok perlakuan dihisap dengan menggunakan pipet sahli sampai skala 20 mm³. Ujung pipet yang digunakan dibersihkan dari sisa – sisa darah dengan kertas tissue. Darah dipindahkan ke dalam tabung sahli yang telah diisi dengan larutan HCl 0,1 N sampai angka 10. Selanjutnya, cairan diaduk hingga homogen. Tabung sahli tersebut ditempatkan diantara 2 tabung yang berisi warna standar. Sedikit demi sedikit ditambahkan akuades ke dalam tabung sahli dengan menggunakan pipet, sampai warnanya sama dengan warna standar, dan hasilnya dinyatakan dalam gr% (Hesser, 1960).

2.7 Penghitungan Nilai Hematokrit

Nilai hematokrit digunakan untuk mengukur perbandingan antara eritrosit dengan plasma, sehingga hematokrit memberikan rasio total eritrosit dengan total volume darah dalam tubuh ikan kerapu tikus. Pengukuran nilai hematokrit dilakukan menggunakan tabung mikrohematokrit berupa pipa kapiler yang berlapis heparin. Sampel darah dialirkan dari tabung hampa udara dengan menggunakan pipa kapiler hingga $\frac{3}{4}$ bagian kapiler. Ditutup pada pipa kapiler dengan bahan penutup (lilin) pada salah satu ujung pipa kapiler agar pada saat disentrifuse darah tidak keluar. Pipa kapiler yang berisi darah kemudian disentrifuse dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Selanjutnya, dilakukan pengukuran dengan membandingkan bagian darah yang mengendap dengan seluruh bagian darah yang ada di dalam tabung mikrohematokrit. Hasilnya dinyatakan dalam persen (%) (Angka dkk., 1985).

2.8 Analisis Data

Pengaruh ekstrak etanol daun *M. tanarius* melalui data hematologi ikan kerapu tikus dianalisis secara sidik ragam (ANOVA). Jika analisis menunjukkan berpengaruh nyata atau $F_{hitung} > F_{tabel}$, maka dilanjutkan dengan menggunakan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf kepercayaan 95%.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Ekstrak Tumbuhan *M. tanarius*

Tumbuhan *M. tanarius* diambil dari hutan Kabupaten Buton Tengah Propinsi Sulawesi Tenggara. Bagian tumbuhan yang diambil adalah organ daun *M. tanarius*. Daun *M. tanarius* tersebut dikeringkan dengan cara dijemur dibawah sinar matahari hingga mengering dan dihaluskan hingga berbentuk serbuk. Pembuatan ekstrak etanol daun *M. tanarius* dilakukan dengan metode maserasi atau perendaman. Ekstraksi daun *M. tanarius* menggunakan pelarut etano 80% dengan perbandingan daun *M. tanarius* dengan pelarut etanol 1:3 dengan metode maserasi (perendaman). Maserasi dilakukan 3x24 jam untuk dapat mengikat senyawa yang terkandung di didalam daun *M. tanarius* tersebut. Setelah 24 jam larutan ini disaring dengan menggunakan corong buchner yang dilapis dengan kertas saring. Penyaringan ini dilakukan tiga kali secara berulang sampai warna campuran menjadi agak pudar. Hasil koleksi ekstraksi kemudian dievaporasi pada suhu 60 oC dengan tekanan 380 rpm hingga etanol teruapkan semua dan ekstrak berbentuk pasta seberat 830 g.

3.2 Hasil Pengamatan Konsentrasi Hemoglobin dan Nilai Hematokrit

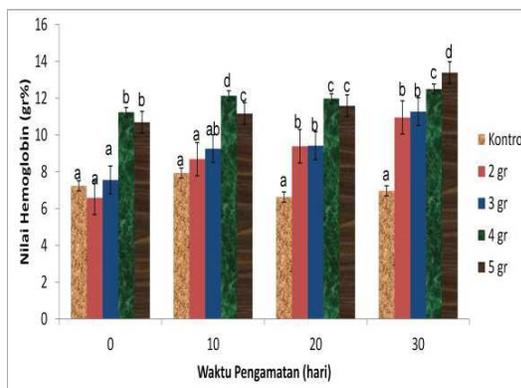
Hasil pengamatan konsentrasi hemoglobin dan nilai hematokrit selama pemberian ekstrak etanol daun *M. tanarius* dengan dosis berbeda yang disemprotkan pada pakan ikan komersil yaitu P1 (2 gr), P2 (3 gr), P3 (4 gr) dan P4 (5 gr). Sedangkan Perlakuan kontrol tanpa pemberian ekstrak. Hasil pengamatan dapat dilihat pada Tabel berikut

Tabel 1 konsentrasi hemoglobin dan nilai hematokrit

Dosis	Hemoglobin gr%	Hematokrit %
Kontrol	7.05 ± 0.69 ^a	25.79 ± 1.87 ^a
P ₁ (2 gr)	8.57 ± 2.39 ^{ab}	31.88 ± 3.91 ^b
P ₂ (3 gr)	8.77 ± 2.56 ^{bc}	34.07 ± 4.33 ^{bc}
P ₃ (4 gr)	11.96 ± 0.53 ^c	38.12 ± 4.31 ^c
P ₄ (5 gr)	11.25 ± 1.04 ^d	38.11 ± 3.2 ^c

3.3 Konsentrasi Hemoglobin

Hemoglobin (Hb) adalah pigmen merah pembawa oksigen dalam sel darah merah, yang merupakan suatu protein yang kaya akan zat besi (Siakpere, 1985 dan Fange, 1994). Virus VNN menginfeksi ikan kerapu tikus dengan mengeluarkan toksin yang menyebabkan aliran darah yang bertugas mengedarkan nutrisi dan oksigen terganggu sehingga berkurangnya kemampuan hemoglobin mengikat oksigen. Hemoglobin berfungsi untuk mengikat oksigen kemudian digunakan dalam proses katabolisme untuk menghasilkan energi. Kemampuan darah untuk mengangkut oksigen bergantung pada kadar hemoglobin dalam darah (Lagler dkk., 1977). Data hasil penelitian menunjukkan peningkatan konsentrasi hemoglobin pada semua Perlakuan ekstrak etanol daun *M. tanarius* melalui pemberian pakan sampai pengukuran hari ke-30, dimana makin tinggi dosis Perlakuan ekstrak etanol daun *M. tanarius*, maka kadar hemoglobin ikan uji akan lebih tinggi.



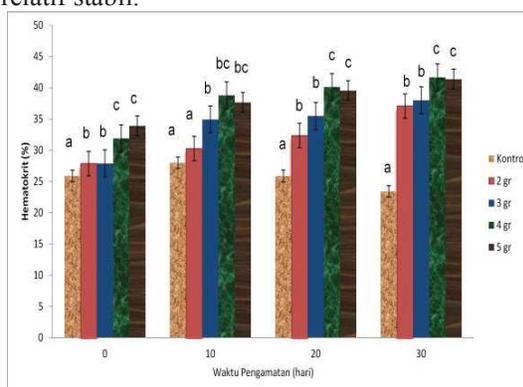
Gambar 1 Rata-rata Konsentrasi Hemoglobin ikan kerapu tikus selama 30 hari pemberian ekstrak etanol daun *M. tanarius*. Huruf yang sama (a, ab, b, c dan d) pada kolom yang sama menunjukkan tidak beda nyata ($P < 0,05$)

Hasil analisis statistik menunjukkan kadar hemoglobin pada Perlakuan kontrol tidak berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan Perlakuan 1, tetapi berbeda nyata dengan ketiga Perlakuan lainnya. Perlakuan 1 tidak berbeda nyata dengan Perlakuan 2, tetapi tidak berbeda nyata dengan Perlakuan 3 dan Perlakuan 4. Perlakuan 2 tidak berbeda nyata dengan Perlakuan 3, tetapi berbeda nyata dengan 4. Kenyataan ini menunjukkan bahwa pengaruh ekstrak etanol daun *M. tanarius* pada dosis yang tinggi secara nyata dapat meningkatkan kadar hemoglobin darah ikan kerapu tikus.

Kadar hemoglobin paling tinggi ditemukan pada Perlakuan 3, selanjutnya Perlakuan 4; Perlakuan 2; Perlakuan 1 dan Perlakuan kontrol dengan presentase secara berturut-turut 11,96 gr%; 11,25 gr%; 8,77 gr%; 8,57 gr%; dan 7,05 gr%. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Bastwain dkk. (2001) bahwa nilai hemoglobin ikan normal berkisar antara 10 – 14 gr%. Secara fisiologis, hemoglobin menentukan tingkat ketahanan tubuh ikan dikarenakan hubungannya yang erat dengan adanya daya ikat terhadap oksigen oleh darah. Peningkatan kadar hemoglobin pasca pemberian ekstrak etanol daun *M. tanarius* menunjukkan meningkatnya nafsu makan dan aliran darah semakin lancar untuk mengedarkan nutrisi dan oksigen dalam tubuh ikan seiring dengan berkurangnya tekanan infeksi VNN pada ikan kerapu tikus.

3.4 Nilai Hematokrit

Kadar hematokrit merupakan perbandingan antara sel darah merah dengan plasma darah, serta berpengaruh terhadap pengaturan sel darah merah. Pengukuran ini merupakan persentase eritrosit dalam darah lengkap setelah spesimen darah disentrifugasi. Hasil pengukuran menunjukkan peningkatan kadar hematokrit pada semua Perlakuan dengan memberikan ekstrak etanol daun *M. tanarius* sampai pengukuran hari ke-30, dimana makin tinggi Perlakuan dosis ekstrak etanol daun *M. tanarius* yang diberikan melalui pakan, maka kadar hematokrit ikan uji akan lebih tinggi mendekati normal. Berbeda dengan Perlakuan kontrol, kadar hematokrit hingga hari ke-30 terukur menunjukkan nilai yang relatif stabil.



Gambar 2 Rata-rata Nilai hematokrit ikan kerapu tikus selama 30 hari pemberian ekstrak etanol daun *M. tanarius*. Huruf yang sama (a, b, bc, dan c) pada kolom yang sama menunjukkan tidak beda nyata ($P < 0,05$).

Kadar hematokrit ikan uji pada Perlakuan 1 tidak berbeda nyata dengan Perlakuan 2, tetapi berbeda nyata dengan Perlakuan 3 dan Perlakuan 4. Kadar hematokrit pada Perlakuan ke-2 tidak berbeda nyata dengan Perlakuan ke-3 dan ke-4, tetapi berbeda nyata dengan Perlakuan kontrol. Kenyataan ini menunjukkan bahwa pengaruh pemberian ekstrak etanol daun *M. tanarius* dicampur dengan pakan ikan komersil dapat meningkatkan kadar hematokrit darah pada ikan kerapu tikus yang terinfeksi VNN. Kadar hematokrit paling tinggi ditemukan pada Perlakuan 3, selanjutnya Perlakuan 4; Perlakuan 2; Perlakuan 1 dan Perlakuan kontrol dengan persentase secara berturut-turut 38.12%; 38.11%; 34.07%; 31.88%; dan 25.79%. Hasil analisis statistik menunjukkan kadar hematokrit pada Perlakuan kontrol berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan keempat Perlakuan lainnya. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Bastwain dkk (2001) bahwa nilai hematokrit ikan normal berkisar antara 30,8 – 45,5%. Pemberian ekstrak etanol daun *M. tanarius* pada ikan kerapu tikus sampai pengukuran hari ke-30 memberikan pengaruh yang signifikan terhadap peningkatan kadar hematokrit menjadi normal, seiring dengan meningkatnya jumlah eritrosit dan nilai hemoglobin.

Hasil pemeriksaan konsentasi hemoglobin dan nilai hematokrit antara ikan Perlakuan dan kontrol menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun *M. tanarius* efektif secara signifikan. Pengukuran konsentrasi hemoglobin dan nilai hematokrit dari hari ke-0 sampai hari ke-30 menunjukkan bahwa konsentrasi hemoglobin terendah pada Perlakuan kontrol (7.05 g%) dan tertinggi pada Perlakuan 3 (11,96 gr%), dan nilai hematokrit terendah pada Perlakuan kontrol (25.79 %) dan tertinggi pada Perlakuan 3 (38,12 %).

4. KESIMPULAN

Dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun *M. tanarius* melalui pemberian pakan terindikasi mampu menginaktivasi VNN pada ikan kerapu tikus, yang ditandai dengan meningkatnya konsentrasi hemoglobin dan nilai hematokrit mendekati jumlah normal ikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Andayani,S., Marsoedi., Sanoesi,E., Wilujeng.A.E., dan H. Suprastiani. 2008. Profil Hematologi Beberapa Ikan Air Tawar Budidaya. Jurusan MSP, Fakultas Perikanan dan Kelautan, UB Malang.
- Angka SL, GT Wongkar, Karwani. 1985. Blood Picture and Bacteria Isolated From Ulcered and Crooked-Black *Clarias* *Batrachus*. Symposium On Pract. Measure for Preventing and Controlling FishDisease. BIOTROP. 17 P.
- Azhar. F., Pengaruh Pemberian Probiotik dan Prebiotik Terhadap Performan Juvenile Ikan Kerapu Bebek (*Cromileptes altivelis*). Laboratorium Kesehatan Ikan. Institut Pertanian Bogor . Bogor16680.
- Bastiawan, D; A. Wahid; M. Alifudin, dan I. Agustiawan. 2001. Gambaran Darah Lele dumbo (*Clarias spp.*) yang Diinfeksi Cendawan *Aphanomyces spp* pada pH yang Berbeda. Jurnal penelitian Indonesia 7(3): 44-47.
- Bijanti, R. 2005. Hematologi Ikan : Teknik Pengambilan Darah dan Pemeriksaan Hematologi Ikan. Bagian ilmu kedokteran hewan veteriner. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.

- Carvalho, C., Botelho, C., Ferreira, H., Ferreira, M.R., Santosa, M., Diaz, T., Oliveira, J.A., Soares-Martins, M., Almeida, A., Silva Júnior. 2013. In vitro inhibition of canine distemper virus by flavonoids and phenolic acids: Implications of structural differences for antiviral design. *Laboratório de Virologia Animal (LVA), Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil.*
- Chi, S. C. 2006. Piscine Nodavirus Infections in Asia. *First International Symposium on Viral Nervous Necrosis of Fish International Conference Center, Hiroshima, November 28 to December 1, 2006.*
- Dugencie, S. K., Arda, N and A. Canda. 2003. Some Medicinal Plants as Immunostimulant for fish. *Journal of ethnopharmacology*, (88), 99-106.
- Esteban, M. A., Cuesta, A., Betuna, J and J. Meseguer. 2001. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.) Innate Immunesystem. *J. Fish and Shellfish Immunology*. Vol 11, 303-313.
- Fänge, R. 1994. Blood Cell, Haemopoiesis and Lymphomyeloid tissues in fish. *Journal of fish and shellfish Immunology*. Vol 10, 234-244.
- Formica, J.V., Regelson, W., 1995. Review of biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology* 33, 1061–1080
- Hesser EF. 1960. *Methods for Routine Fish Hematology*. Progressive Fish Culturist.
- Irianto Agus. 2005. *Patologi Ikan Teleostei*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Kabata, Z. 1985. *Parasites and Disease of Fish Cultured in the Tropics*. Taylor and Frandhis Ltd. London. 318p.
- Lagler KF, Bardach JE, RR Miller, Passino DRM. 1977. *Ichthyology*. John Willey and Sons. Inc. new York-London. Hlm 506.
- Lee, M. H., Jwo-Farn Chiou., Kun-Ying Yen., Yang, L.L., 2000. EBV DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora*. Graduate Institute of Pharmacognosy Science, Taipei Medical College, 250 Wu-Hsing Street, Taipei 110, Taiwan
- Lim, T.Y., Lim, Y.Y., C.M. Yule, C.M., 2008. Evaluation of antioxidant, antibacterial and anti-tyrosinase activities of four Macaranga species. School of Science, Monash University Sunway Campus, Jalan Lagoon Selatan, Bandar Sunway, 46150 Petaling Jaya, Selangor, Malaysia.
- Rizka R P, Yanuhar U, Suryanto A M. 2013. Perubahan Struktur Jaringan Mata dan Otak pada Larva Ikan Kerapu Tikus (*C. altivelis*) Yang Terinfeksi Viral Nervous (VNN) Dengan Pemeriksaan Scanning Electro Microscope (SEM). Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Malang.
- Siakpere, O.K. 1985. Haematological Characteristics of *Clarias fisheriensis*. *S.J Fish Biology*, Vol 27 (3), 259-264.
- Uribe C, Folch H Enriquez R, dan Moran G. 2001. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinari Medicina* 56 (10):484-503.
- Yanuhar, U. 2011. The Function of Receptor Protein Humpback Grouper *Cromileptes altivelis* in Expression and Proliferation of CD4 and CD8 cells in Defence Immunity of Viral Nervous Necrotic Infection. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, Vol. 1, No. 2.