

PEMANFAATAN EKSTRAK KASAR SPONS UNTUK MENINGKATKAN
PERTUMBUHAN DAN RESPON IMUN NON SPESIFIK IKAN NILA
(*Oreochromis niloticus*)

(The use of Sponge Crude Extract to Increase Growth and Immune Response of Nile
Tilapia *Oreochromis niloticus*)

Merlyn D. Manurung¹, Reiny A. Tumbol^{2*}, Henneke Pangkey²,
Deiske A. Sumilat², Remy E. P. Mangindaan²

¹) Program Studi S2 (Magister) Ilmu Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,
Universitas Sam Ratulangi, Manado.

²) Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam
Ratulangi, Manado.

*Author Correspondent: email: reinytumbol@yahoo.com

ABSTRACT

This study aims to examine the effect of sponge crude extract addition to the fish feed on growth and non-specific immune response of Nile tilapia (*O. niloticus*) and determine the most effective dose of the extract in raising the growth and the non-specific immune response of Nile tilapia (*O. niloticus*). The sponge sample was macerated and then evaporated using a rotary vacuum evaporator until the sample became a paste and mixed with feed. The fish were fed for 14 days respectively as much as 5% of body weight per day with feeding frequency of two times a day. The results showed that addition of sponge crude extract to the fish feed gave good effect on the growth and the non-specific immune response of Nile tilapia (*O. niloticus*) with best dose of 40 g / kg feed.

Keywords: *Sponge extract, fish immune response, fish growth, immune response, immunostimulant.*

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menguji pengaruh penambahan ekstrak kasar spons pada pakan ikan terhadap pertumbuhan dan respon imun non spesifik ikan nila (*Oreochromis niloticus*) serta menentukan dosis ekstrak kasar spons yang paling efektif dalam meningkatkan pertumbuhan dan respon imun non spesifik ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Sampel spons dimaserasi kemudian dievaporasi menggunakan rotary vacuum evaporator sehingga diperoleh ekstrak kasar berbentuk pasta yang kemudian dicampurkan pada pakan. Ikan uji diberi pakan perlakuan 5% dari bobot biomassa selama 14 hari dengan frekuensi pemberian pakan dua kali sehari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan ekstrak kasar spons pada pakan ikan memberikan pengaruh yang baik terhadap pertumbuhan dan respon imun non spesifik ikan nila (*Oreochromis niloticus*), yang mana dosis yang terbaik adalah 40 gr / Kg pakan.

Kata Kunci : *Ekstrak spons, respon imun ikan, pertumbuhan ikan, respon imun, imunostimulan.*

PENDAHULUAN

Penanggulangan penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri pada ikan umumnya telah dilakukan dengan pemberian antibiotik. Namun pemberian antibiotik ternyata dapat

menimbulkan masalah. Menurut Abubakar *et al.* (2011), antibiotik dapat memicu berbagai mikroba patogen menjadi resisten jika penggunaannya tidak sesuai dengan dosis yang dikarenakan kurangnya pengetahuan

dibidang kesehatan. Oleh karena itu diperlukan alternatif dalam upaya pencegahan maupun penanggulangan penyakit. Janis *et al.* (2016) mengemukakan bahwa upaya pencegahan penyakit yang efektif adalah dengan memanfaatkan bahan-bahan bersifat imunostimulan yang berasal dari materi biologis dan/atau zat sintesis yang dapat meningkatkan aktivitas pertahanan non spesifik serta merangsang organ pembentuk antibiotik dalam tubuh.

Spons laut diketahui menjadi tempat hidup beberapa jenis bakteri yang jumlahnya mencapai 40% dari biomassa spons. Simbiosis yang terjadi antara bakteri dengan spons laut menyebabkan organisme ini sebagai invertebrata laut yang memiliki potensi antibakteri yang lebih besar dibandingkan dengan organisme darat dan laut lainnya (Kanagasabhapathy *et al.*, 2005). Dari 15.000 jenis spons di berbagai perairan dunia baru sekitar 7.000 spons yang telah dilaporkan. Sejauh ini, beragam penelitian spons yang telah dipublikasikan menunjukkan perolehan senyawa yang memiliki aktivitas biologik yang tinggi sebagai anti kanker, anti HIV, anti jamur, dan anti bakteri (Reha *et al.*, 2013). Spons berpotensi untuk dikembangkan dalam bidang pengobatan, diantaranya sebagai antibakteri (Ngantung *et al.*, 2016). Selain antibakteri, spons juga diyakini merupakan sumber daripada imunostimulan. Penelitian terkait dengan imunostimulan dari biota laut seperti alga laut telah banyak dilaporkan, seperti aplikasi ekstrak rumput laut sebagai agen imunostimulan sistem pertahanan non spesifik pada udang (*Litopennaeus vannamei*) yang telah dilaporkan oleh Ridlo & Pramesti (2009).

Spons merupakan salah satu komponen ekosistem terumbu karang yang sangat potensial sebagai sumber bahan aktif. Hal ini dapat terjadi karena ketika spons mengalami gangguan dari organisme di sekitarnya, spons

melakukan biosintesis senyawa aktif sebagai respon pertahanan sistem metabolisme sel. Aktifitas biosintesis dimaksud sangat dipengaruhi oleh perubahan bioekologinya (Reha *et al.*, 2013). Ketersediaan spons melimpah di perairan Sulawesi Utara, sehingga perlu dilakukan pengkajian terkait manfaatnya sebagai bahan imunostimulan yaitu bahan penguat sistem kekebalan tubuh untuk meningkatkan respon imun non spesifik ikan nila (*Oreochromis niloticus*).

Penelitian ini bertujuan untuk menguji pengaruh penambahan ekstrak kasar spons pada pakan ikan terhadap pertumbuhan dan respon imun non spesifik ikan nila (*Oreochromis niloticus*) serta menentukan dosis ekstrak kasar spons yang paling efektif dalam meningkatkan pertumbuhan dan respon imun non spesifik ikan nila (*Oreochromis niloticus*).

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama dua bulan yakni bulan Agustus sampai dengan September 2018. Identifikasi spons dan proses evaporasi dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Farmasitika Laut; proses ekstraksi, pengujian aktifitas antibakteri dilaksanakan di Laboratorium Kesehatan Ikan, Lingkungan dan Toksikologi; sedangkan untuk pemeliharaan ikan uji dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Akuakultur Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Sam Ratulangi.

Ekstraksi dan Evaporasi

Sampel spons yang diperoleh sebanyak 220 g dibuat dengan cara maserasi. Sampel dipotong kecil-kecil dimasukan kedalam Erlenmeyer, kemudian direndam dengan alkohol 96% sebanyak 440 mL, ditutup dengan aluminium foil selama 1x24 jam. Sampel yang direndam disaring menggunakan kertas saring

menghasilkan filtrat 1 dan debris 1. Debris 1 kemudian ditambah dengan larutan etanol sebanyak 120 mL, ditutup dengan aluminium foil dan dibiarkan selama 1x24 jam, sampel tersebut disaring menggunakan kertas saring menghasilkan filtrat 2 dan debris 2. Debris 2 kemudian ditambah dengan larutan etanol sebanyak 120 mL, ditutup dengan aluminium foil selama 1x24 jam, sampel tersebut di lalu disaring menggunakan kertas saring menghasilkan filtrat 3 dan debris 3. Filtrat 1, 2, dan 3 dicampur menjadi satu kemudian disaring. Diambil sebanyak 1 liter campuran filtrat (1+2+3) lalu dievaporasi menggunakan rotary evaporator sehingga diperoleh ekstrak kasar (berbentuk pasta). Ekstrak kasar yang diperoleh sebanyak 42 gram.

Persiapan Pakan

Pakan yang digunakan adalah pellet komersil (FF-999). Pakan tersebut ditimbang sesuai dosis pemberian pakan yang ditentukan yaitu 5% dari bobot biomassa. Ekstrak spons (berbentuk pasta) ditimbang sesuai dosis yang ditentukan yaitu 20 g/kg pakan; 40 g/kg pakan dan 60 g/kg pakan. Setelah ditimbang, masing-masing bagian, dimasukkan kedalam tube lalu disuspensi dengan akuades sampai dengan 25 ml. Pakan yang telah ditimbang sesuai dosis ditempatkan pada wadah. Ekstrak spons yang diencerkan dengan akuades, tiap dosisnya dimasukkan kedalam botol sprayer untuk disemprotkan pada pakan. Pakan dikering anginkan sampai benar-benar kering, lalu di simpan dalam lemari pendingin sampai saat digunakan. Pencampuran pakan dengan ekstrak spons ini dilakukan setiap 1 kali dalam seminggu.

Pemberian pakan perlakuan mengandung Ekstrak Kasar Spons

Ikan nila berukuran 5-8 cm akan ditempatkan di dalam wadah akuarium dengan masing-masing akuarium

berisi 10 ekor ikan. Jumlah akuarium yang akan digunakan yakni 12 buah dengan perincian 3 perlakuan dengan penambahan ekstrak kasar spons dan untuk tiap perlakuan akan dilakukan tiga kali ulangan. Ikan nila akan diberi pakan perlakuan selama 14 hari.

Rancangan Percobaan

Penelitian ini akan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 4 perlakuan dengan 3 kali ulangan.

Analisis Statistik

Untuk mengkaji pengaruh perlakuan ekstrak kasar spons terhadap pertumbuhan dan respon imun non spesifik ikan nila, maka dilakukan uji analisis ragam. Apabila pemberian ekstrak kasar spons memberikan pengaruh yang nyata, maka dilakukan uji lanjut *Tukey Honestly Significant Difference (HSD)* untuk mengevaluasi perbedaan pengaruh antar perlakuan. Analisis ragam maupun uji lanjut *Tukey HSD* dikerjakan dengan menggunakan program IBM SPSS Statistics.

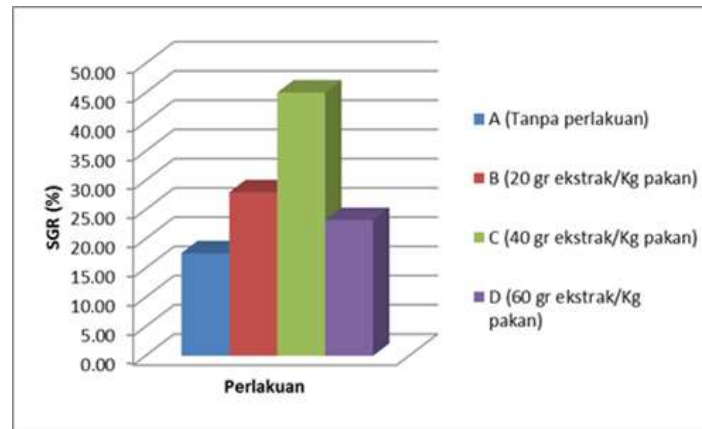
HASIL DAN PEMBAHASAN

Laju Pertumbuhan Spesifik

Berdasarkan hasil analisis ragam laju pertumbuhan spesifik ikan nila yang diberi pakan dengan penambahan ekstrak kasar spons diperoleh nilai signifikansi (sig.) sebesar 0.009 yakni terdapat perbedaan secara signifikan antar perlakuan. Dapat dilihat bahwa laju pertumbuhan spesifik ikan nila (disajikan pada Gambar 1) menunjukkan hasil terbaik pada perlakuan C (dengan penambahan ekstrak kasar spons 40 g/Kg pakan) yaitu 45.05% disusul oleh perlakuan B (dengan penambahan ekstrak kasar spons 20 g/Kg pakan) yaitu 27.99% dan perlakuan D (dengan penambahan ekstrak kasar spons 60 g/Kg pakan) yaitu 23.25%. Laju pertumbuhan spesifik yang paling rendah adalah pada perlakuan A (tanpa penambahan ekstrak kasar spons) yaitu sebesar 17.57%. Hasil uji lanjut *Tukey HSD* memperlihatkan bahwa terdapat

perbedaan yang signifikan antara perlakuan A (tanpa perlakuan) dan perlakuan C (dengan penambahan 40 gr

ekstrak kasar spon/Kg pakan), sedangkan untuk antar perlakuan lainnya tidak berbeda secara signifikan.



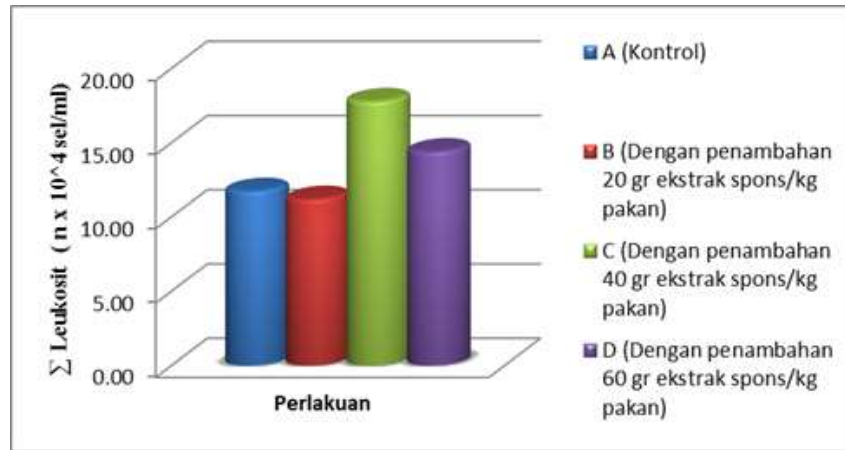
Gambar 1. Laju Pertumbuhan Spesifik (%)

Selama penelitian berlangsung ikan uji pada perlakuan C (dengan penambahan 40 gr ekstrak kasar spon/kg pellet) sangat responsif terhadap pemberian pakan, disusul oleh perlakuan B (dengan penambahan 20 gr ekstrak kasar spon/Kg pakan). Berbeda dengan ikan uji pada perlakuan D (dengan penambahan 60 gr ekstrak kasar spon/Kg pakan), ikan menunjukkan respon negatif terhadap pakan. Hal ini dapat disebabkan karena penambahan ekstrak kasar spon pada perlakuan D lebih banyak dari semua perlakuan sehingga dapat terjadi perubahan pada tekstur, aroma bahkan rasa dari pakan sehingga menyebabkan respon ikan terhadap pakan menjadi menurun. Penyebab lain yang mungkin yakni kandungan dari ekstrak kasar spon yang ditambahkan pada pakan dapat saja bersifat racun bagi ikan uji. Berbagai upaya terkait peningkatan pertumbuhan biota akuakultur memang telah banyak dilakukan. Wang *et al.* (2016) menjelaskan bahwa berbagai formulasi pakan telah diupayakan untuk meningkatkan pertumbuhan. Selain itu dalam menjaga lingkungan tetap baik, probiotik, vitamin dan imunostimulan dapat digunakan untuk mengendalikan dan membunuh bakteri pathogen, selain

itu juga untuk meningkatkan pertumbuhan ikan budidaya. Lebih lanjut dijelaskan bahwa salah satu metode yang menjanjikan untuk mengendalikan infeksi akuakultur dan memperkuat mekanisme pertahanan ikan yaitu melalui pemberian profilaksis probiotik dan herbal (Gibson *et al.*, 1997; Harikrishnan *et al.*, 2003; Sharifuzzaman & Austin, 2009).

Total Leukosit

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa penambahan ekstrak kasar spon pada pakan memberikan pengaruh yang signifikan pada total leukosit. Hal ini ditunjukkan dengan nilai signifikansi (sig.) sebesar 0.009. Hasil uji lanjut *Tukey HSD* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara perlakuan C (dengan penambahan 40 gr ekstrak kasar spon/kg pakan) dengan perlakuan A (tanpa perlakuan), juga pada perlakuan C (dengan penambahan 40 gr ekstrak kasar spon /kg pakan) dan perlakuan B (dengan penambahan 20 gr ekstrak kasar spon/kg pakan); sedangkan antar perlakuan lainnya tidak terdapat perbedaan signifikan. Rataan total leukosit ikan uji disajikan pada Gambar 2.

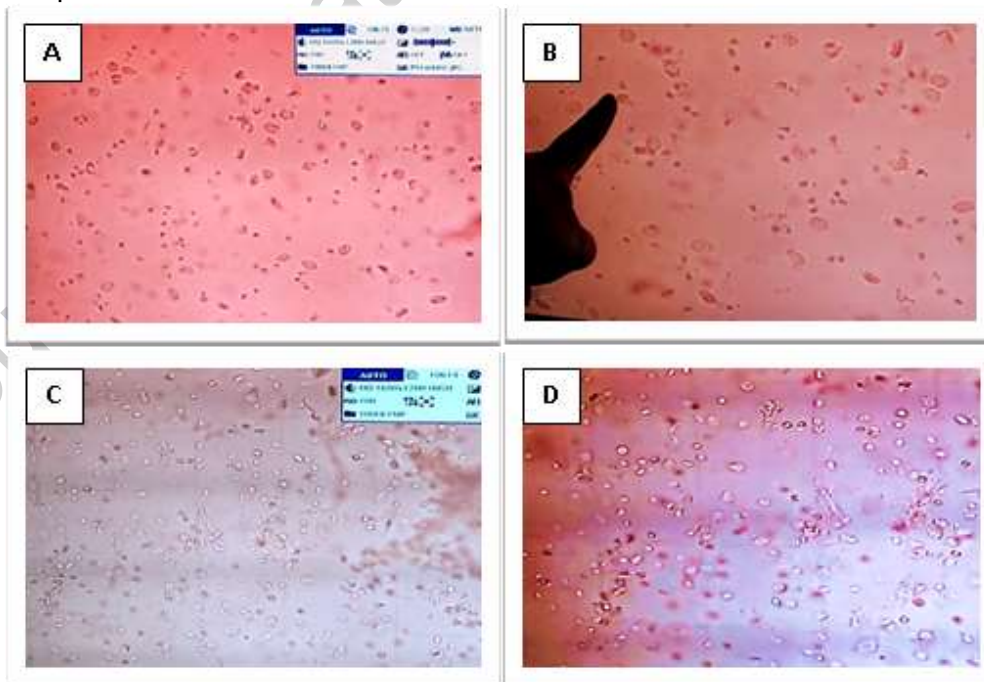


Gambar 2. Total Perhitungan Leukosit

Jumlah leukosit pada ikan berkisar antara 20.000-150.000 per ml darah. Leukosit mempunyai peranan dalam pertahanan seluler dan humoral organisme terhadap zat-zat asing (Effendi, 2003). Leukosit bergerak bebas dan merupakan sel fungsional dalam sistem imun bawaan.

Terdapat perbedaan yang signifikan antara perlakuan C (dengan penambahan 40 gr ekstrak kasar spons/kg pakan) dengan perlakuan A (tanpa perlakuan), diduga akibat penambahan ekstrak kasar spons dalam pakan yang diberikan pada ikan uji pada perlakuan C. Menurut Kresno

(2001) dalam Utami *et al.* (2013) peningkatan sel leukosit merupakan refleksi keberhasilan sistem imunitas ikan dalam mengembangkan respon imunitas seluler (non spesifik) sebagai pemicu untuk respon kekebalan. Supriyadi *et al.* (2006) menambahkan bahwa respon yang diberikan ikan untuk menambah daya tahan tubuhnya dengan meningkatkan jumlah leukosit yang mempunyai fungsi sebagai sel pertahanan. Pemberian pakan dengan penambahan ekstrak kasar spons terbukti dapat meningkatkan total leukosit, terutama pada perlakuan C.



Gambar 3. Pengamatan sel leukosit (perlakuan A,B,C,D)

Peningkatan total leukosit menandakan bahwa terjadi peningkatan jumlah sel-sel leukosit (makrofag) yang melakukan aktivitas fagositosis / pemangsa sel ragi roti yang merupakan benda asing. Hal ini menggambarkan kemampuan sel-sel leukosit untuk memangsa benda-benda asing dalam rangka pertahanan diri. Pada kegiatan budidaya tidak dapat dihindari adanya serangan bakteri. *Aeromonas hydrophila* dan *Pseudomonas sp.* adalah dua jenis bakteri patogen yang sering menginfeksi ikan nila yang dibudidayakan. *Aeromonas hydrophila* dapat menyebabkan eksophthalmia, lesi pada sirip, dan ulser pada tubuh bahkan mengalami perdarahan hebat. *Pseudomonas sp.* dapat menyebabkan cedera pada organ internal seperti mengubah konsistensi ginjal dan jantung (Hardi *et al.*, 2018).

Penelitian terkait ekstrak tumbuhan herbal untuk pengendalian penyakit telah banyak diterapkan dalam budidaya ikan. Efektivitas ekstrak tumbuhan untuk pengendalian penyakit sangat beragam. Aplikasi pakan *Azadirachta indica*, *Ocimum sanctum* dan *Curcuma longa* dapat meningkatkan kekebalan tubuh, respon imun dan resistensi ikan mas yang terinfeksi *A. hydrophila*. Mangrove (*Avicennia marina*) yang diekstrak daunnya terbukti menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus* dan *Vibrio anguillarum* yang diisolasi dari ikan hias air laut (Hardi *et al.*, 2018). Pada penelitian ini, penambahan ekstrak spons pada pakan dapat menstimulasi peningkatan total leukosit yang berperan penting pada sistem kekebalan tubuh non-spesifik. Namun demikian, masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk membuktikan bahan aktif yang berperan sebagai stimulan peningkatan sistem kekebalan tubuh dari ikan.

Aktifitas Fagositosis

Hasil analisis ragam memperlihatkan adanya perbedaan aktifitas fagositosis yang signifikan pada setiap perlakuan, ditandai dengan nilai signifikansi (sig.) 0.000 ($p < 0.05$).

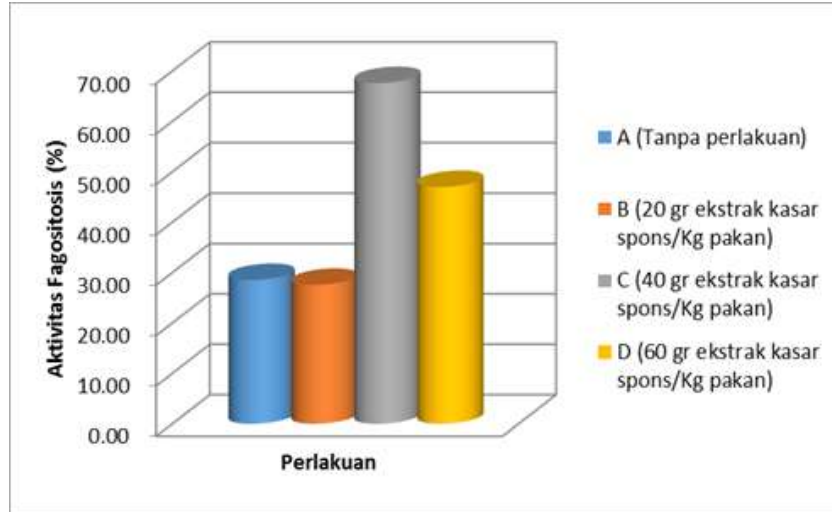
Hasil uji lanjut *Tukey HSD* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antar perlakuan, yaitu pada perlakuan A (tanpa perlakuan) dengan perlakuan C (dengan penambahan 40 gr ekstrak kasar spons /Kg pakan); perlakuan A (tanpa perlakuan) dengan perlakuan D (dengan penambahan 60 gr ekstrak kasar spons/Kg pakan); perlakuan B (dengan penambahan 20 gr ekstrak kasar spons/Kg pakan) dengan perlakuan C (dengan penambahan 40 gr ekstrak kasar spons /Kg pakan); perlakuan B (dengan penambahan 20 gr ekstrak kasar spons/Kg pakan) dengan perlakuan D (dengan penambahan 60 gr ekstrak kasar spons/Kg pakan); perlakuan C (dengan penambahan 40 gr ekstrak kasar spons/Kg pakan) dengan perlakuan D (dengan penambahan 60 gr ekstrak kasar spons/Kg pakan).

Meningkatnya aktifitas fagositosis mengindikasikan adanya peningkatan respon imun non spesifik pada ikan uji. Dengan adanya peningkatan respon imun non spesifik pada ikan uji diharapkan dapat menekan angka kerugian ketika terjadi infeksi bakteri. Hal ini sejalan dengan pendapat Anderson (1992), yang menyatakan bahwa tindakan pencegahan dengan cara meningkatkan mekanisme pertahanan non-spesifik yakni dengan pemberian imunostimulan dapat dilakukan untuk menekan kerugian yang mungkin ditimbulkan apabila terjadi wabah penyakit.

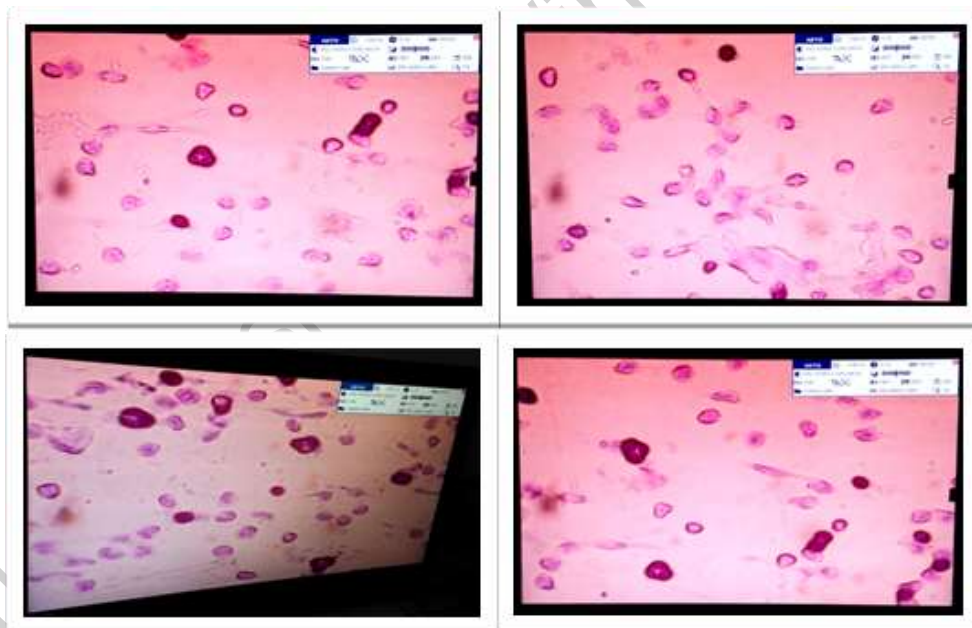
Imunostimulan merupakan zat yang dapat meningkatkan daya tahan tubuh terhadap serangan penyakit, dalam hal ini bukan meningkatkan respon imun spesifik (*acquired immune respon*), akan tetapi meningkatkan respon imun non-spesifik baik melalui

mekanisme pertahanan humoral maupun pertahanan seluler (Sakai, 1999). Lebih lanjut Anderson (1992) menyatakan bahwa ikan telah diketahui

lebih mengandalkan mekanisme sistem kekebalan non-spesifiknya atau bawaan (*innate immune sistem*) dari pada sistem kekebalan spesifiknya.



Gambar 4. Aktivitas Fagositosis ikan nila (*O. niloticus*) dengan pemberian pakan mengandung ekstrak kasar spons



Gambar 5. Aktivitas Fagositosis ikan nila (*O. niloticus*) dengan pemberian pakan mengandung ekstrak kasar spons

KESIMPULAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penambahan ekstrak kasar spons pada pakan ikan memberikan pengaruh yang baik terhadap pertumbuhan dan respon imun

non spesifik ikan nila (*Oreochromis niloticus*), yang mana dosis yang terbaik adalah 40 gr / Kg pakan.

Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini, diketahui bahwa pemberian pakan dengan penambahan ekstrak kasar

spons efektif dalam meningkatkan pertumbuhan maupun respon imun non spesifik ikan nila, sehingga dapat direkomendasikan sebagai berikut:

(1) Industri pakan ikan dapat membuat pakan ikan yang inovatif, yaitu dengan menggunakan ekstrak kasar spons sebagai tambahan dalam formulasi pakan

(2) Kandungan maupun karakteristik protein aktif dalam ekstrak kasar spons dapat diteliti lebih lanjut, sehingga dapat lebih efektif dalam pemanfaatannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Abubakar, H., Wahyudi, A.T., Yuhana, M., 2011. 'Skrining Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons Jaspis sp. Sebagai Penghasil Senyawa Antimikroba'. Ilmu Kelautan 16 (1), 35-40.
- Austin B. & Austin DA. 1993. 'Bacterial fish Pathogens. In Disease in Farmed and wild fish'. Ellis Horwood Ltd, Publisher, Chichester, England.
- Baiano J.C.F. & Barnes A.C., 2009. 'Towards control of Streptococcus iniae'. Emerging Infectious Diseases 15(12), 1891-1896.
- Balouri, M., Sadiki, M. & Ibsouda, S.K. 2016. 'Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review'. Journal of Pharmaceutical Analysis 6 (2016), 71-79.
- Cockerill, F. R., Wikler, M. A., Alder, J., Dudley, M. N., Eliopoulos, G. M., Ferraro, M. J., Hardy, D. J. & Hecht, D. W. 2012. 'Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically', Approved Standard—Ninth Edition 32(2) viewed 16 December 2018, from <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m07/>
- Davis, W. W. & Stout, T. R. 1971. 'Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay', American Society for Microbiology 22 (4), 659-670.
- Delamare-Deboutteville, J., Bowater, R., Condon, K., Reynolds, A., Fisk, A., Aviles, F., & Barnes, A.C., 2015. 'Infection and pathology in Queensland grouper, *Epinephelus lanceolatus*, (Bloch), caused by exposure to *Streptococcus agalactiae* via different routes'. Journal of Fish Diseases 38 (12), 102-135.
- Devi, P., Ravichandran, S., Ribeiro, M. and Ciavatta, M.L. 2013. 'Antifungal potential of Marine sponge extract against plant and fish pathogenic fungi'. Journal of Oceanography and Marine Research 1(3), 1-4.
- Evans, J.J., Wiedenmayer, A.A., Klesius, P.H. and Shoemaker, C.A. 2004. 'Survival of *Streptococcus agalactiae* from frozen fish following natural and experimental infections'. Aquaculture 233, 15-21.
- Evans, J.J., Klesius, P.H. & Shoemaker, C.A. 2006. 'An overview of *Streptococcus* in warmwater fish'. Aquac. Health Int. (7), 10-14.
- Hardi, E.H., Saptiani, G., Kusuma I. W. & Nugroho, R.A. 2018. 'Evaluation of Traditional Plant Extracts for Innate Immune Mechanism and Disease Resistance Against Fish Bacterial *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas* sp.' Earth and Environmental Science 139. Viewed on 10 December 2018, from <https://doi.10.1088/1755-1315/139/1/012003>
- Hastuti, S.D., 2013. 'Applications bacteria *Streptococcus agalactiae* As Antigen Vaccine Candidate for Disease Prevention Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis* Sp)'. Jurnal Gamma, 8(2), 64-79.
- Hudzicki, Jan. 2009. 'Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol'. American Society for Microbiology. Viewed 6 April 2018, from www.asmscience.org
- Janis, O. A. P., Tumbol, R. A., & Longdong, S. 2016. 'Efikasi Bakasang sebagai imunostimulan

- pada pakan sidat (*Anguilla marmorata*) terhadap infeksi *Aeromonas hydrophila*'. *Budidaya Perairan* 4 (2), 37 – 43.
- Kanagasabhapathy, M., Sasaki, H., Nakajima, K., Nagata, K., Nagata, S. 2005. 'Inhibitory Activities of Surface Associated Bacteria Isolated From the Marine Sponge *Pseudoceratina purpurea*'. *Microbes and Environments* 20(3), 178-185.
- Kementerian Kelautan dan Perikanan, 2017. Pastikan Pasokan Benih, KKP Kembangkan Teknologi Corong. DJPB, 21 Nov 2017, viewed 6 April 2018, from <http://kkp.go.id/djpb/artikel/331-pastikan-pasokan-benih-kkp-kembangkan-teknologi-corong>
- Kurniawan, A., 2012. Penyakit Akuatik. Pangkalpinang: UBB Press.
- Latundra, A., I., & Ahmad, A., 2012. Isolasi dan Karakterisasi Protein Bioaktif dari Beberapa Jenis Spons sebagai Antimikroba'. viewed 2 December 2004, from <http://repository.unhas.ac.id/bitstream/handle/123456789/1645/Ilham%20paper%20Jember%20seman%202012.pdf?sequence=1>.
- Lusiastuti, A.M., Taukhid, Kusri, E. & Hadie W. 2009. 'Sequence analysis of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*)'. *Indonesian Aquaculture Journal* 4 (2), 87-95.
- Lusiastuti, A.M., Purwaningsih, U. & Sumiati, T. 2010. 'Isolasi Bakteriofaga Anti *Streptococcus agalactiae* dari Darah Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)'. *Jurnal Riset Akuakultur* 5(2), 237-243
- Lusiastuti, A.M., Textor, M., Seeger, H., Akineden O. & Zschock, M. 2012. 'The occurrence of *Streptococcus agalactiae* sequence type 261 from fish disease outbreaks of tilapia *Oreochromis niloticus* in Indonesia'. *Aquaculture Research* 45, 1260-1263.
- Mokodompit, A., Boekoesoe, L. & Mustapa, M.A. 2015. 'Uji Efektifitas Antibakteri Ekstrak Etanol Spons Laut (Porifera:Demospongiae) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*'. Skripsi. Universitas Negeri Gorontalo.
- Newman, D.J. and Cragg, G.M. 2012. 'Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010'. *J. Nat. Prod.* 75, 311–335.
- Ngantung, A.E.C., Sumilat, D.A., Bara, R.A. 2016. 'Uji Aktivitas Anti Bakteri dari Spons *Dictyonella funicularis* dan *Phyllospongia lamellosa* yang Diambil dari Perairan Bunaken'. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis* 2 (1)
- O'Neill, J. 2014. 'Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations'. *Antimicrobial Resistance* 4, 1-16
- Post, G. 1987. *Textbook of Fish Health*. United States: T.F.H. Publications, Inc, for Revised and Expanded Edition. Viewed 6 April 2018, from <https://www.amazon.com/Textbook-Fish-Health-George-Post/dp/0866224912>
- Rashid, M. M., Sardar, M. & Islam, M.R. 2002. 'In Vitro Phagocytic Study of Blood Leucocytes and Peritoneal Macrophages of Walking Catfish *Clarias batrachus* Against *Aeromonas hydrophila* and *Escherichia coli*'. *Bangladesh J. Fish* 6 (1), 35-41.
- Reha, W., Noor, A., Ahmad, A., Nafie, N.L., Salama, D. 2013. 'Karakterisasi Protein Aktif dari Spons dan Mikroba Simbiotiknya sebagai Usaha Awal Menuju Agen Immunostimulan'. *Marina Chimica Acta* 14 (1)
- Safari, W.F., 2015. 'Aktivitas Antibakteri dan Antikanker Ekstrak Kasar Metabolit Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons dan Deteksi Gen Penyandi NRPS'. Tesis. Institut Pertanian Bogor.

- Sakai, M. 1999. 'Current Research Status of Fish Immunostimulan'. *Aquaculture* 172, 63-92.
- Selvin J. & Lipton, A.P. 2004. 'Dendrilla nigra, a marine sponge, as potential source of antibacterial substances for managing shrimp diseases'. *Aquaculture* 236, 277-283.
- Sugiani, D., Sukenda, Enang, H.& Lusiastuti, A. M. 2012. 'Pengaruh Ko-Infeksi Bakteri *Streptococcus agalactiae* dengan *Aeromonas hydrophila* Terhadap Gambaran Hematologi dan Histopatologi Ikan Tilapia (*Oreochromis niloticus*)'. *Researchgate*. Viewed 9 April 2018, from <https://www.researchgate.net/publication/309962814>
- Supriyadi, H. 2006. Infeksi Bakteri *Streptococcus iniae* pada Ikan Budidaya di Indonesia. *Media Akuakultur* 1(2), 71-74.
- Taukhid, Lusiastuti, A.M., Sumiati, T., 2014. 'Application of *Streptococcus agalactiae* vaccine to prevent streptococcosis on tilapia culture, *Oreochromis niloticus*', *Berita Biologi* 13 (3), 245-253.
- Taukhid & Purwaningsih, 2011. 'Penapisan Isolat Bakteri *Streptococcus* spp. Sebagai Kandidat Antigen dalam Pembuatan Vaksin, serta Efikasinya untuk Pencegahan Penyakit Streptococcosis pada Ikan Nila, *Oreochromis niloticus*', *Jurnal Riset Akuakultur* 6 (1), 103-118.
- Wang, W., Sun, J., Liu, C. & Xue Z. 2016. 'Application of Immunostimulants in Aquaculture: Current Knowledge and Future Perspectives'. *Aquaculture Research* 48 (1). Viewed 10 December 2018, from <https://doi.org/10.1111/are.13161>
- Wewengkang, D.S., Sumilat, D.A., Rotinsulu, A. 2014. 'Karakterisasi dan Bioaktif Antibakteri Senyawa Spons *Haliclona* sp. dari Teluk Manado'. *Jurnal LPPM Bidang Sains dan Teknologi* 1 (1)
- Woods N. K. Niwasabutra, R. Acevedo, J. Igoli, N.A. Altwaijry, J. Tusiimire, A.I. Gray, D.G. Watson, V.A. Ferro. 2017. 'Natural Vaccine Adjuvants and Immunopotentiators Derived From Plants, Fungi, Marine Organisms, and Insects. In: *Immunopotentiators in Modern Vaccines*'. Second Edition, 211-229.