

JIPK

JURNAL ILMIAH PERIKANAN DAN KELAUTAN

Research Article

Pengaruh *Dunaliella Salina* Terhadap Polimorfonuklear Leukosit Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus lanceolatus*) Yang Diinfeksi Viral Nervous Necrosis (VNN)

Effect of *Dunaliella Salina* on Polymorphonuclear Leukocytes of Cantang Grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus lanceolatus*) Infected by Viral Nervous Necrosis (VNN)

Rani Yuwanita*¹, Nanik Retno Buwono¹, dan Handian Febyadi Eka Putra²

¹) Dosen Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya

²) Mahasiswa Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya

ARTICLE INFO

Received: September 03, 2018

Accepted: November 20, 2018

*) Corresponding author:

E-mail: ry.ranita126@gmail.com

Kata Kunci:

Dunaliella salina, VNN,
Polimorfonuklear, Kerapu Cantang

Keywords:

Dunaliella salina, VNN,
Polymorphonuclear, Cantang
grouper

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh *Dunaliella salina* terhadap jumlah polimorfonuklear leukosit ikan kerapu cantang yang diinfeksi VNN. Seratus delapan puluh ekor larva ikan kerapu cantang ditebar ke dalam 15 buah bak bervolume 16 L dengan kepadatan 10 ekor/bak. Sebelum diinfeksi VNN, ikan kerapu cantang diberi perlakuan pakan pelet yang mengandung tepung *Dunaliella* dengan dosis: K- (0 gr/kg pakan), A(6 gr/kg pakan), B (12 gr/kg pakan) dan C (18 gr/kg pakan) secara *adlibitum* selama 10 hari. Setelah 10 hari perlakuan, ikan kerapu cantang diinfeksi VNN selama 96 jam melalui injeksi *intramuscular* dengan dosis 0,1 ml/ekor ikan. Berdasarkan hasil pengamatan, *Dunaliella salina* berpengaruh terhadap jumlah polimorfonuklear leukosit ikan kerapu cantang yang diinfeksi VNN dengan nilai tertinggi pada perlakuan C (18 gr/kg pakan) yang mempunyai nilai rerata leukosit $45,9 \times 10^3$ sel/ml, neutrofil: $4,24 \times 10^3$ sel/ml dan eosinofil $13,38 \times 10^3$ sel/ml.

Abstract

This study aimed to determine the effect of *Dunaliella salina* on the number of crocodile grouper leukocyte polymorphonuclear infected with VNN. One hundred and eighty larvae of cantang grouper fish were stocked into 15 pieces of 16 L volumes with a density of 10 fish/tube. Before being infected with VNN, the groupers were treated with pellet feed containing doses of *Dunaliella* flour with a dose: K- (0 g/kg feed), A (6 g/kg of feed), B (12 g/kg of feed) and C (18 g/kg of feed) in *adlibitum* for 10 days. After 10 days of treatment, cantang groupers were infected with VNN for 96 hours through intramuscular injection with a dose of 0.1 ml/fish. Based on the observations, *Dunaliella salina* has an effect on the number of VNN infected grouper cucumber leukocyte polymorphonuclear with the highest value in treatment C (18 g/kg feed) which has a leukocyte mean value of 45.9×10^3 cells/ml, neutrophils: 4.24×10^3 cells/ml and eosinophils 13.38×10^3 cells/ml.

Cite this as: Rani, Y., Nanik R. B., & Handian, F. E. P. (2018). Pengaruh *Dunaliella Salina* Terhadap Polimorfonuklear Leukosit Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus lanceolatus*) Yang Diinfeksi Viral Nervous Necrosis (VNN). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 10(2):124-130. <http://doi.org/10.20473/jipk.v10i2.9797>

1. Pendahuluan

VNN (*viral nervous necrosis*) adalah penyakit yang terdaftar oleh *The Office International des Epizooties* (OIE) dan menjadi masalah utama di dalam produksi perikanan laut di dunia. Identifikasi virus penyebab VNN merupakan anggota famili Nodaviridae dan pertama kali diidentifikasi dari jaringan otak larva striped jack (Mori *et al.*, 1992). Berdasarkan taksonomi, VNN diklasifikasikan ke dalam genus betanodavirus (Schneemann *et al.*, 2005). Betanodavirus merupakan virus yang tidak memiliki *envelope*, berbentuk *spherical* dan mempunyai diameter 25 nm. Genom betanodavirus terdiri dari dua untai tunggal molekul RNA positif-sense. Segmen genom yang lebih besar (RNA1) berukuran 3,1 kb, berperan dalam mengkode polimerase RNA yang tergantung RNA (*RNA-dependent RNA polymerase*). Sedangkan segmen genom yang lebih kecil (RNA2) berukuran 1,4 kb, bertugas dalam mengkode protein selubung (*coat protein*) (Nishizawa *et al.*, 1995).

VNN pertama kali ditemukan di Indonesia pada tahun 2000 oleh Yuasa dan kawan-kawan melalui metode deteksi PCR pada ikan kakap putih (Yuasa *et al.*, 2000). *Piscine nodaviruses* (betanodaviruses) menginfeksi lebih dari 30 spesies ikan laut, khususnya pada stadia larva dan juvenil, yang mengakibatkan mortalitas yang sangat tinggi (Maeno *et al.*, 2007). Ikan yang terinfeksi VNN menunjukkan gejala saraf tidak normal (*neurological disorder*) dan sering disertai dengan vakuolasi pada sistem saraf pusat *Central Nervous System* (CNS) dan retina (Thiery, *et al.*, 2006).

Penyebaran VNN harus segera diatasi untuk mencegah terjadinya kerugian pada kegiatan budidaya. Bahan alternatif yang diduga dapat digunakan sebagai antivirus terhadap penyebaran VNN adalah *Dunaliella salina*. *Dunaliella salina* mengandung 57% protein, 32% karbohidrat dan 6% lemak dari berat keringnya (Becker, 2007). Campo *et al.*, (2007) melaporkan bahwa dalam 2 gram berat kering *Dunaliella salina* terdapat 100 mg β -karoten. Hui Chen dan Jian-Guo Jiang (2009) juga menambahkan terdapat 50 mg β -karoten dalam 1 gram berat kering *Dunaliella salina*. Supamattaya, *et al.* (2005) menjelaskan, bahwa dengan pemberian 300 mg β -karoten mikro alga *Dunaliella* per kg pakan menghasilkan *Survival Rate* (SR) tertinggi pada ikan atau udang yang terinfeksi virus yaitu sebesar 33,3 %. Pemberian tepung *Dunaliella*

salina sebesar 11 g/kg pakan dapat meningkatkan pertumbuhan serta menstimulasi sistem imun ikan (Amaninejad *et al.*, 2012).

2. Bahan dan Metode

Persiapan pakan dimulai setelah melakukan kultur *Dunaliella salina* selama 7 hari. Hasil pemanenan *Dunaliella salina* kemudian diubah menjadi tepung. Sebanyak 350 liter kultur menghasilkan 53,9 gram tepung *Dunaliella salina*. Selanjutnya dilakukan pembuatan pakan secara *repelleting* dengan cara mencampurkan tepung *Dunaliella salina* dengan beberapa dosis yang telah ditentukan, yaitu: K- (0 g/kg pakan), A (6 g/kg pakan), B (12 g/kg pakan) dan C (18 g/kg pakan) ke dalam pelet merek *Stella* no. 2 dan dilakukan pencetakan ulang secara manual menggunakan alat penggiling pakan.

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah ikan kerapu cantang yang diperoleh dari BBAP Situbondo dengan ukuran antara 7-9 cm dan berat 5-8 gram sebanyak 180 ekor. Ikan kerapu cantang dimasukkan ke dalam masing-masing stoples kapasitas 16 L yang telah diisi 10 liter air laut sebagai media hidup ikan dan diberi aerasi. Air laut sebelumnya telah disterilisasi menggunakan kaporit 60 ppm dan dinetralkan dengan Na-thiosulfat 30 ppm. Sebelum digunakan untuk penelitian, ikan diaklimatisasi selama ± 5 hari. Pada proses aklimatisasi, ikan mulai dibiasakan diberi pakan pelet 2 kali sehari secara *ad libitum* untuk mempermudah pada saat perlakuan pemberian pakan.

Selama 10 hari masa pemeliharaan, ikan kerapu cantang diberi pakan hasil *repelleting* yang mengandung *Dunaliella salina* 2 kali sehari, yaitu pada pukul 08.00 WIB dan pukul 16.00 WIB secara *ad libitum*. Selain itu, dilakukan pengukuran suhu, pH, salinitas dan DO setiap hari pada pagi dan sore untuk mengontrol kualitas air.

Setelah masa pemeliharaan ikan kerapu cantang dengan pemberian pakan mengandung *Dunaliella salina* selama 10 hari selesai, isolat VNN diinjeksikan pada ikan kerapu cantang melalui *intramuscular* dengan dosis 0,1 ml/ekor ikan. Gejala klinis pada ikan mulai diamati pasca ikan diinfeksi oleh VNN sampai 96 jam berikutnya dengan selang waktu 12 jam sekali atau sampai menunjukkan TCID₅₀ yang berarti sebanyak 50% ikan dari total populasi ikan telah terinfeksi virus yang ditandai dengan munculnya gejala klinis Pada hari terakhir pengamatan atau setelah 96 jam pengamatan gejala klinis,

dilakukan pengambilan sampel darah untuk pengamatan polimorfonuklear leukosit.

Menurut Mahasri *et al.*, (2011), pengambilan sampel dan uji polimorfonuklear leukosit dapat dilakukan dengan mengambil sampel darah pada bagian arteri caudalis sebanyak 1 ml menggunakan spuit 1 ml yang sudah diberi *Ethylen Diamine Tetra Acetic Acid* (EDTA).

Kemudian membuat ulasan darah pada *object glass* lalu keringkan dan fiksasi menggunakan metanol selama 3 menit dan dikeringkan kembali. Kemudian diberi pewarna giemsa 20% selama 15 menit dan dikeringkan lalu bilas menggunakan akuades dan biarkan mengering. Ulasan darah kemudian diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 1000 kali untuk mengamati dan menghitung jumlah leukosit, neutrofil, dan eosinofil.

3. Hasil dan Pembahasan

Ikan kerapu yang telah diinfeksi VNN

mulai menunjukkan gejala klinis setelah 12 jam pasca infeksi. Gejala klinis yang ditunjukkan sangat dikenali sebagai akibat adanya infeksi VNN yaitu nafsu makan yang berkurang, gerakan berenang vertikal dan sering menabrakkan diri ke dinding dan dasar bak, dan warna tubuh yang menggelap (Tabel 1).

Menurut Sudaryatma *et al.*, (2012), gejala klinis yang ditunjukkan pada ikan terinfeksi VNN dimulai dari ikan berdiam diri di dasar perairan diikuti dengan posisi berenang yang terbalik. Amelia dan Prayitno (2012) menambahkan pada hari ke-4 pasca terinfeksi VNN menunjukkan gejala berenang secara vertikal ke permukaan air, berenang memutar dan juga warna tubuhnya menjadi lebih gelap karena stres.

Penurunan nafsu makan dipengaruhi oleh faktor stres sehingga respons saraf yang bekerja untuk meningkatkan sistem imun mengalami gangguan fisiologis. Menurut Setyorini *et al.*, (2009), penggelapan warna kulit akibat infeksi

Tabel 1. Gejala klinis pasca infeksi VNN

Waktu Pasca Infeksi	Gejala Klinis
12 jam	Nafsu makan ikan beragam, terdapat ikan yang merespon pakan dengan baik dan terdapat pula ikan yang tidak merespon pakan serta terdapat beberapa ikan pasif di dasar perairan.
24 jam	Ikan pasif di dasar perairan dengan tubuh miring dan tidak merespons pakan yang diberikan. Terdapat beberapa ikan yang menjadi pucat warna tubuhnya dan beberapa ikan gesit sehingga menabrakkan tubuhnya ke dinding wadah serta beberapa ikan perutnya membuncit.
36 jam	Ikan pasif di dasar perairan dengan nafsu makan yang berkurang dan bergerombol dengan memiringkan tubuhnya di dasar perairan. Beberapa ikan terlihat perutnya membuncit.
48 jam	Ikan pasif di dasar perairan dan tidak merespons adanya pakan dan beberapa perutnya membuncit, warna tubuh menggelap.
60 jam	Beberapa ikan tidak merespons pakan dan pasif di dasar perairan dengan berenang miring dan perut membuncit.
72 jam	Nafsu makan ikan menurun drastis dengan berdiam di dasar perairan dan beberapa ikan terlihat perutnya membuncit.
84 jam	Banyak ikan yang tidak merespons pakan dan berdiam diri di dasar perairan secara bergerombol. Beberapa berwarna pucat dan gelap dengan perutnya membuncit.
96 jam	Ikan tidak merespon pakan dan pasif di dasar perairan, berenang berputar-putar di dasar perairan dan berenang miring.

VNN berhubungan dengan produksi lendir. Sebagai respon fisiologis, ikan yang terinfeksi virus akan memproduksi lendir berlebih, dan selanjutnya produksi lendir akan menurun drastis sehingga tubuh ikan terasa kesat dan kulit berwarna lebih gelap.

Pemberian *Dunaliella salina* dapat merangsang peningkatan jumlah leukosit dan polimorfonuklear ikan kerapu cantang, dan dosis 18 g/kg pakan dapat meningkatkan lebih banyak leukosit dan polimorfonuklear dibandingkan dengan dosis yang lainnya (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian *Dunaliella salina*

sel pembentuk leukosit untuk menghasilkan lebih banyak sel-sel yang terdapat dalam leukosit.

Jumlah neutrofil ikan kerapu cantang setelah pemberian *Dunaliella salina* dijumpai pada perlakuan C (6 g/kg) yakni sebesar 3,90 sel/mm³. Hal ini diduga karena kandungan polisakarida yang terdapat pada *Dunaliella salina*. Menurut Purnamasari (2017), pemberian polisakaridamempunyai potensi sebagai imunomodulator sehingga dapat mengaktifkan sel imunokompeten yang dapat meningkatkan sistem imunitas. Peningkatan produksi neutrofil yang berfungsi untuk mempertahankan respon



(a)

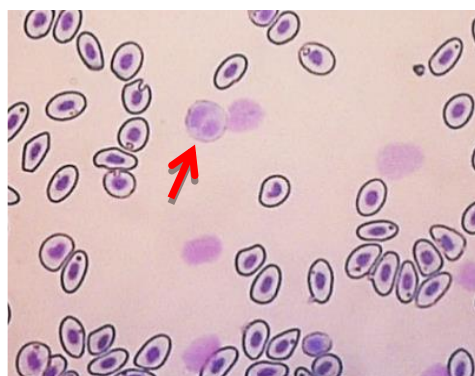


(b)

Gambar 1. Gejala klinis ikan kerapu cantang yang diinfeksi VNN. (a). ikan diam di dasar. (b). Ikan berenang berputar (*whirling*)



(a)



(b)

Gambar 2. Neutrofil dan Eusinofil ikan kerapu cantang setelah infeksi VNN. (a). neutrofil (b). eusinofil (Pembesaran 400x).

pada ikan kerapu dapat merangsang peningkatan jumlah leukosit ikan kerapu cantang. Menurut Jun Dai *et al.* (2010), *Dunaliella salina* mengandung polisakarida (glukosa, galaktosa, xilosa, manosa dan rhamnosa) mencapai 12-40%. Menurut Rustikawati (2012), polisakarida dapat meningkatkan sel imun yaitu dengan menginduksi

inflamasi akut dalam tubuh, dalam hal ini neutrofil sedang melakukan fagositosis. *Dunaliella salina* juga mengandung betakaroten yang dapat berperan sebagai antioksidan. Pada saat fagositosis akibat infeksi VNN akan menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang merupakan radikal bebas.

Polisakarida yang terkandung di dalam *Dunaliella salina* juga dapat meningkatkan jumlah eosinofil. Menurut Shaktivel *et al.*, (2015), penambahan polisakarida telah terbukti mampu meningkatkan lisozim. Peningkatan lisozim sendiri menandakan

asing (Rahma *et al.*, 2015).

Neutrofil yang teraktivasi cenderung menghasilkan ROS dan *Reactive Nitrogen Species*(RNS) yang bersifat toksik terhadap berbagai patogen. Selain dapat membatasi

Tabel 2. Data rerata polimorfonuklear leukosit setelah pemberian *Dunaliella salina*

Perlakuan	Total Leukosit (10 ³ sel/mm ³),	Neutrofil (10 ³ sel/mm ³)	Eosinofil (10 ³ sel/mm ³)
K – (0 g/kg pakan)	44,4 ± 0,005	3,83 ± 0,002	3,19 ± 0,007
A (6 g/kg pakan)	44,7 ± 0,104	3,86 ± 0,003	3,22 ± 0,007
B (12 g/kg pakan)	45,0 ± 0,013	3,88 ± 0,007	3,25 ± 0,008
C (18 g/kg pakan)	45,2 ± 0,001	3,90 ± 0,005	3,28 ± 0,007

Tabel 3. Rerata polimorfonuklear leukosit setelah infeksi

Perlakuan	Total Leukosit	Neutrofil	Eosinofil
K – (0 g/kg pakan)	45,1 ± 0,008	3,94 ± 0,015	10,58 ± 0,80
A (6 g/kg pakan)	45,6 ± 0,014	3,96 ± 0,007	12,06 ± 0,23
B (12 g/kg pakan)	45,8 ± 0,007	3,97 ± 0,006	12,57 ± 0,20
C (18 g/kg pakan)	45,9 ± 0,004	4,24 ± 0,015	13,38 ± 0,25

Tabel 4. kisaran parameter kualitas air

Parameter Kualitas Air	Kisaran Kualitas Air selama Penelitian	Kisaran Optimal Menurut Pustaka
Suhu	24-27,5 ⁰ C	24-31 ⁰ C**
pH	7,1-8,1	5-9*
DO	5,01-6,96	>4,9 ppm**
Salinitas	31-33 ppt	30-33 ppt**

*DJPB KKP (2013) **Yoshimitsu *et al.*, (1986)

adanya aktivitas fagositosis sel imun non-spesifik pada tubuh ikan, salah satunya eosinofil.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan diketahui bahwa *Dunaliella salina* berpengaruh terhadap jumlah polimorfonuklear leukosit ikan kerapu cantang yang diinfeksi VNN. Jumlah neutrofil ikan kerapu cantang tertinggi pada perlakuan C (6 g/kg) yakni sebesar 4,24 sel/mm³ (Tabel 3). Tingginya jumlah neutrofil pada perlakuan C tersebut diduga sebagai akibat dari adanya infeksi dalam tubuh ikan. Menurut Utami *et al.*, (2013), peningkatan jumlah neutrofil akan terjadi ketika ada infeksi. Peningkatan jumlah neutrofil merupakan akibat dari mekanisme kekebalan tubuh yang bekerja sebagai respons imun. Hal ini berkaitan dengan fungsi utama neutrofil yaitu penghancuran bahan asing melalui proses fagositosis. Peningkatan jumlah sel neutrofil mengindikasikan adanya peningkatan kegiatan makrofag yang menghancurkan partikel

replikasi virus, ROS yang terlalu tinggi juga dapat menyebabkan kerusakan pada area sel sehingga menyebabkan inflamasi. Betakaroten yang dihasilkan oleh *Dunaliella salina* merupakan prekursor vitamin A yang memiliki antioksidan sehingga dapat menetralkan adanya radikal bebas, seperti ROS. Vitamin A juga berperan dalam menjaga sel dan jaringan dari kerusakan serta berperan dalam fungsi kekebalan tubuh.

Pemberian *Dunaliella salina* pada perlakuan A, B, C maupun D menunjukkan terjadinya eosinophilia (peningkatan jumlah eosinofil dalam darah). Tingginya jumlah eosinofil pada dosis 18 g/kg pakan juga diduga sebagai akibat dari adanya infeksi iridovirus dalam tubuh ikan. Eosinofil bersama-sama dengan neutrofil melawan infeksi yang disebabkan oleh VNN. Menurut Suhermanto *et al.*, (2011), eosinofil merupakan sel kedua dalam sistem meiloid, sel ini tidak seefisien neutrofil

dalam fagositosis. Eosinofil pada ikan diperlukan untuk melawan infeksi, serta untuk menarik leukosit menuju area infeksi.

Parameter kualitas air yang diukur pada penelitian ini meliputi suhu, DO, pH dan salinitas. Berdasarkan pengamatan parameter kualitas air selama penelitian, kisaran kualitas air masih tergolong dalam kisaran optimal untuk kelangsungan hidup ikan kerapu cantang (Tabel 4).

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengamatan, *Dunaliella salina* berpengaruh terhadap jumlah polimorfonuklear leukosit ikan kerapu cantang yang diinfeksi VNN dengan nilai tertinggi pada perlakuan C (18 g/kg pakan) yang mempunyai nilai rerata leukosit 45,9 x 10³ sel/ml, neutrofil: 4,24 x 10³ sel/ml dan eosinofil 13,38 x 10³ sel/ml.

Daftar Pustaka

- Amaninejad, P., Emadi, H., Emtiazjoo, M., & Hossein, Z.S.H. (2012). Effects of *Dunaliella salina* on Different Levels of IGM, IGG, IGA and IGE Immuno globulins in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*).
- Amelia, N., & Prayitno, S.B. (2012). Pengaruh Ekstrak Daun Jambu Biji (*Psidium guajava*) Untuk Menginaktifkan *Viral Nervous Necrosis* (VNN) Pada Ikan Kerapu Bebek (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Journal of Aquaculture Management and Technology 1* (1), 264-278.
- Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology advances*, 25(2), 207-210.
- Del Campo, J. A., García-González, M., & Guerrero, M. G. (2007). Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 74 (6), 1163-1174.
- DJPB KKP. (2013). Leaflet Pembesaran Ikan Kerapu Macan di KJA. [https://www.djpb.kkp.go.id/public/upload/download/leaflet/Leaflet Pembesaran Ikan Kerapu Macan di KJA](https://www.djpb.kkp.go.id/public/upload/download/leaflet/Leaflet%20Pembesaran%20Ikan%20Kerapu%20Macan%20di%20KJA). Diakses pada 23 Mei 2018.
- Chen, H., & Jiang, J. G. (2009). Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. *Journal of cellular physiology*, 219(2), 251-258.
- Dai, J., Wu, Y., Chen, S. W., Zhu, S., Yin, H. P., Wang, M., & Tang, J. (2010). Sugar compositional determination polysaccharides from *Dunaliella salina* by modified RP-HPLC method of precolumn derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 629-635.
- Mahasri, D., Widyastuti, P., & Sulmawati, L. (2011). Gambaran leukosit darah ikan koi (*Cyprinus carpio*) yang terinfeksi *Ichthyophthirius multifiliis* pada derajat infestasi yang berbeda dengan metode kohabitasi. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 3(1).
- Mori, K. I., Nakai, T., Muroga, K., Arimoto, M., Mushiake, K., & Furusawa, I. (1992). Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology*, 187(1), 368-371.
- Nishizawa, T., Mori, K. I., Furuhashi, M., Nakai, T., Furusawa, I., & Muroga, K. (1995). Comparison of the coat protein genes of five fish nodaviruses, the causative agents of viral nervous necrosis in marine fish. *Journal of General Virology*, 76(7), 1563-1569.
- OIE (Office International des Epizooties). (2013). Chapter 2.3.11 Viral Encephalopathy and Retinopathy in Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals 4th Edition. Office International des Epizooties. Paris. 456 hlm.
- Purnamasari, R. (2017). Polisakarida Krestin dari Jamur *Coriolus versicolor* terhadap hitung Jenis Leukosit Mencit yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*. *BIOTROPIC The Journal of Tropical Biology*, 1(2), 16-30.
- Rahma, F. W. (2016). Pengaruh pemberian ekstrak argassum sp. Dengan pelarut methanol pada pakan terhadap jumlah eritrosit dan differensial eukositikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) (Doctoral dissertation) Universitas Airlangga.
- Rustikawati, I. (2012). Efektivitas Ekstrak *Sargassum* sp. Terhadap Diferensiasi Leukosit Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) yang Diinfeksi *Streptococcus iniae*. *Jurnal Akuatika*, 3(2).
- Sakthivel, M., Deivasigamani, B., Rajasekar, T., Kumaran, S., & Alagappan, K. M. (2016). Immunostimulatory Effects of Polysaccharide Compound from Seaweed *Kappaphycus alvarezii* on Asian seabass (*Lates calcarifer*) and its Resistance against *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Marine Biology & Oceanography*, 2015.
- Schneemann, A., Ball, L.A., Delsert, C., Johnson, J.E. & Nishizawa, T. (2005). Family nodaviridae. In: virus taxonomy, eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. Fauquet c.m., Mayo m.a., Maniloff j., Desselberger u. & Ball l.a., eds. Elsevier academic press, London, UK, 865-872
- Sudaryatma, P. E., Lestari, A. T., Sunarsib, N. L., Widiarti, K. S., Hidayat, S. N., & Srinoto, D. (2012). Imunositokimia Streptavidin Biotin:

- Deteksi Dini Viral Nervous Necrosis Virus pada Lendir Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Jurnal Sain Veteriner*, 30 (2012).
- Suhermanto, A., Andayani, S., & Maftuch, M. (2011). Pemberian total fenol teripang pasir (*holothuria scabra*) untuk meningkatkan leukosit dan diferensial leukosit ikan mas (*cyprinus carpio*) yang diinfeksi bakteri *Aeromonas Hydrophila*. *Jurnal Kelautan: Indonesian Journal of Marine Science and Technology*, 4(2), 150-157.
- Supamattaya, K., Kiriratnikom, S., Boonyaratpalin, M., & Borowitzka, L. (2005). Effect of a *Dunaliella* extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*, 248(1-4), 207-216.
- Thiéry, R., Cozien, J., Cabon, J., Lamour, F., Baud, M., & Schneemann, A. (2006). Induction of a protective immune response against viral nervous necrosis in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* by using betanodavirus virus-like particles. *Journal of virology*, 80(20), 10201-10207.
- Utami, D. T., Prayitno, S. B., Hastuti, S., & Santika, A. (2013). Gambaran parameter Hematologis pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang diberi vaksin DNA *Streptococcus iniae* dengan dosis yang berbeda. *Journal of Aquaculture Management And Technology*, 7-20.
- Yushimitsu, T., Eda, H., & Hiramatsu, K. (1986). Groupers final report marine-culture research and development in Indonesia. ATA-192. JICA, 103-129.
- Yuasa, K., Roza, D., Koesharyani, I., Johnny, F., & Mahardika, K. (2000). General remarks on fish disease diagnosis. *Textbook for the Training Course on Fish Disease Diagnosis. Lolitkanta-JICA Booklet*, (12), 5-18.