



POTENSI EKSTRAK KULIT BUAH DAN BIJI RAMBUTAN (*Nephelium lappaceum*) SEBAGAI SENYAWA ANTI BAKTERI PATOGEN PADA IKAN[©]

Azwar Ibrahim^{*}, Y. T. Adiputra^{†,‡}, Agus Setyawan[†] dan Siti Hudaidah[†]

ABSTRAK

Limbah tanaman buah berpotensi sebagai bahan pengobatan alternatif. Rambutan (*Nephelium lappaceum*) merupakan tanaman buah yang memiliki peluang digunakan sebagai bahan pengobatan pada infeksi bakteri patogen pada ikan. Penelitian *in vitro* ekstrak etanol dari kulit dan biji rambutan dilakukan untuk mempelajari kemampuannya sebagai senyawa anti bakteri patogen pada ikan. Penelitian dilakukan dengan dua tahap yaitu pengujian penghambatan dan pengujian *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC). Pengujian penghambatan yang dilakukan adalah uji penghambatan pertumbuhan bakteri dan uji cakram. Hasil uji penghambatan pertumbuhan bakteri menunjukkan bahwa kulit rambutan tidak memiliki kemampuan sebagai anti bakteri patogen pada ikan. Berlawanan, hasil uji penghambatan pertumbuhan bakteri menunjukkan biji rambutan berpotensi sebagai senyawa antibakteri pathogen pada ikan antara lain *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida* dan *Streptococcus* sp. Uji cakram menunjukkan kemampuan biji rambutan untuk menghambat pertumbuhan tiga bakteri patogen tersebut paling baik bekerja pada konsentrasi 75% dengan diameter zona hambat lebih dari 10 mm. Konsentrasi minimal yang efektif untuk menghambat pertumbuhan tiga bakteri patogen adalah pada konsentrasi 50-75% dan semakin tinggi konsentrasinya menunjukkan kandungan bahan aktif flavonoid dalam biji rambutan semakin berfungsi sebagai anti bakteri patogen pada ikan.

Kata kunci : ekstrak etanol, bakteriostatik, flavonoid, MIC, rambutan

© e-JRTBP 2013

^{*} Mahasiswa Jurusan Budidaya Perairan

[†] Staf Pengajar Jurusan Budidaya Perairan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung

[‡] Alamat Korespondensi : yudha_adiputra@yahoo.com

Pendahuluan

Peningkatan produksi akuakultur terutama menggunakan metode budidaya ikan yang intensif memberikan banyak implikasi terhadap munculnya penyebab-penyebab ikan budidaya menjadi stres antara lain kepadatan tinggi, transportasi, penanganan dan seleksi dan kualitas air (Christyapita *et al.*, 2007; Magnadóttir, 2006; Sakai, 1999). Pembudidaya memahami bahwa semakin tingginya teknologi dan intensifnya metode budidaya maka kemungkinan ikan terinfeksi penyakit semakin besar (Dügener *et al.*, 2003). Penyakit terutama yang disebabkan oleh bakteri menjadi salah satu tantangan dalam akuakultur dan memerlukan perhatian khusus untuk mencegah terjadinya wabah penyakit bakterial. Salah satu cara yang paling banyak digunakan untuk mencegah infeksi bakteri adalah dengan meminimalisasi penyebab stres pada ikan dan meningkatkan sistem imun tubuh ikan pada ukuran larva dan dewasa (Magnadóttir, 2006; Bricknell and Dalmo, 2005), dengan pemberian bahan-bahan aktif yang terkandung dalam tanaman (Citarasu, 2010; Ardó *et al.*, 2008; Rao *et al.*, 2006).

Tanaman mendapatkan perhatian lebih karena fungsinya dapat digunakan sebagai pengobatan (Ji *et al.*, 2008; Tolo *et al.*, 2006) terutama pada ikan atau udang (Yin *et al.*, 2006). Potensi tanaman sebagai bahan obat terus berkembang dengan kemampuan kerjanya tidak saja pada satu spesies bakteri patogen tetapi juga bekerja pada bakteri patogen yang sudah resisten terhadap pengobatan menggunakan antibiotik (Vaseeharan *et al.*, 2011). Potensi lainnya adalah campuran beberapa bahan aktif dari

tanaman dari Cina dan vaksin konvensional atau dalam bentuk minyak atsiri dapat digunakan sebagai pencegah penyakit dengan meningkatkan sistem imun ikan (Galina *et al.*, 2009; Mousavi *et al.*, 2011).

Beberapa jenis tanaman yang banyak digunakan sebagai bahan pengobatan dan peningkatan sistem imun ikan atau udang dari berbagai negara antara lain: Cina- *Astragalus membranaceus*, *A. radix Lonicera japonica*, *Ganoderma lucidum*, *Pericarpium citri reticulatae*, *Crataegus pinnatifida*, *Radix codonopsis*, *R. isatidis*, *Herba taraxaci* dan *Fructus hordei germinatus* (Yin *et al.*, 2009; Ardó *et al.*, 2008; Xue *et al.*, 2008); India- *Eclipta alba*, *Solanum trilobatum*, *Ocimum sanctum*, *Withania somnifera* dan *Myristica fragrans* (Christyapita *et al.*, 2007; Divyagnaneswari *et al.*, 2007; Sivaram *et al.*, 2004); Bolivia- *Baccharis pentlandii*, *B. platypoda*, *Chromoleana tunariense*, *Erechtites hieracifolius*, *Mikania psilostachya*, *Phichea sagittalis*, *Tagetes maxima*, *Tessaria fastigiata* dan *Wulffia baccata* (Parejo *et al.*, 2003). Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai bahan pengobatan adalah rambutan (*Nephelium lappaceum*). Menurut Setiawan (2003), kulit buah rambutan mengandung tannin dan saponin, sedangkan biji rambutan mengandung lemak dan polifenol. Selain itu, kulit buah rambutan juga mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* (Khasanah, 2011). Penelitian menggunakan rambutan sebagai bahan pengobatan untuk ikan dan udang tidak banyak dilakukan, oleh sebab itu penelitian ini dilakukan untuk mempelajari kemampuan kulit buah

dan biji rambutan untuk digunakan sebagai senyawa anti bakteri patogen pada ikan. Penelitian ini penting dilakukan untuk membuka potensi baru pengobatan penyakit ikan menggunakan bahan-bahan alamiah.

Bahan dan Metode

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei sampai dengan Juni 2012 bertempat di Laboratorium Stasiun Karantina Ikan-Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Lampung dan Laboratorium Budidaya Perikanan Jurusan Budidaya Perairan Universitas Lampung.

Penelitian dilakukan dengan tiga tahap. Tahap persiapan, meliputi sterilisasi alat, pembuatan ekstrak kulit buah dan biji rambutan dengan pelarut etanol 70% dan pembuatan media isolat bakteri. Kulit buah dan biji rambutan diperoleh dari Kota Metro, Lampung. Kulit buah dan biji rambutan dikeringkan dengan cara dijemur lalu diblender hingga halus. Hasil blender kemudian diayak dan menghasilkan tepung kulit buah dan biji rambutan masing-masing 300 gram. Tepung kulit buah dan biji rambutan di maserasi dengan larutan etanol 70% dengan perbandingan 1 : 5 (w : v). Hasil maserasi lalu dievaporasi dengan *vacum evaporator* pada suhu 35°C hingga kering.

Tahap pelaksanaan, meliputi pengujian penghambatan dan pengujian *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dari ekstrak kulit buah dan biji rambutan terhadap pertumbuhan bakteri. Pengujian penghambatan dilakukan dengan menggunakan metode *paper disc*. Metode ini digunakan untuk melihat diameter zona hambat dari

ekstrak kulit buah dan biji rambutan. *Paper disc* direndam ekstrak kulit buah dan biji rambutan \pm 15 menit dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%, lalu diletakkan di media isolat empat bakteri patogen pada ikan yaitu *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida*, *Streptococcus* sp. dan *Vibrio alginolyticus* dan diinkubasi selama 24 jam. Pengujian *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dilakukan dengan menggunakan metode *serial tube dilution*. Uji MIC dilakukan dengan membuat larutan ekstrak dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100% pada media cair MHB (*Muller Hilton Broth*). Tabung reaksi yang digunakan sebagai wadah diisi MHB sebanyak 4,5 ml lalu ditambahkan 0,5 ml ekstrak kulit buah dan biji rambutan secara berseri dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100% pada masing – masing tabung lalu diinokulasi bakteri dengan kepadatan 10^7 cfu/ml, diinkubasi selama 24 jam. Tahap pengamatan, meliputi penentuan ekstrak yang efektif menghambat pertumbuhan bakteri, pengukuran diameter zona hambat dan konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan empat bakteri patogen pada ikan yaitu *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida*, *Streptococcus* sp. dan *Vibrio alginolyticus*. Hasil penelitian dianalisis secara deskriptif dan dibandingkan dengan pustaka yang relevan.

Hasil dan Pembahasan

Pemanfaatan tanaman sebagai pengobatan dan peningkatan sistem imun ikan dapat memperluas manfaat tanaman bukan hanya sebagai bahan makanan tetapi limbahnya dapat

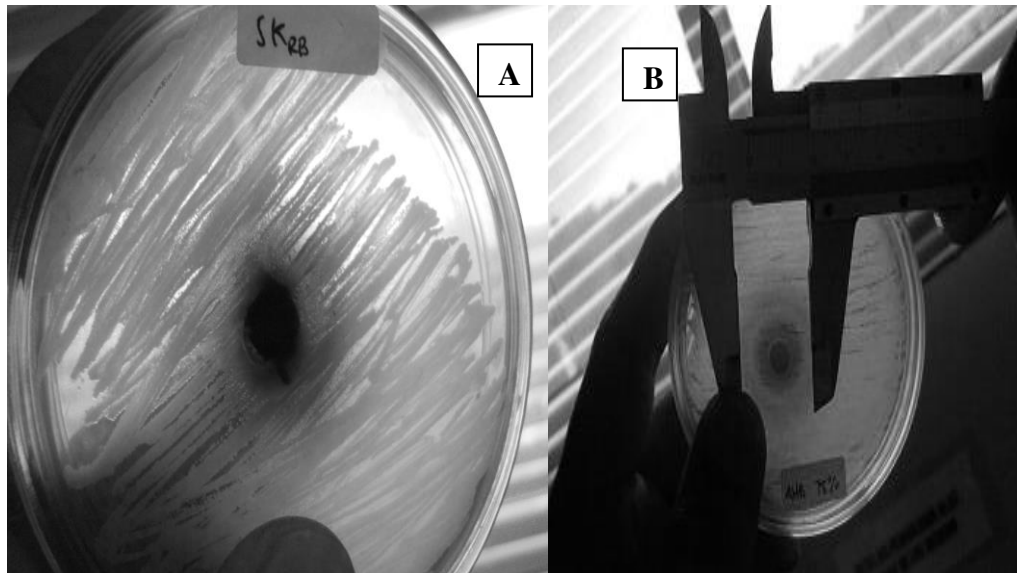
dimanfaatkan secara maksimal. Rambutan yang dikenal sebagai tanaman buah hanya dimanfaatkan buahnya sedangkan kulit buah dan bijinya tidak dimanfaatkan secara maksimal dan menjadi limbah. Penelitian ini merupakan dasar dari pemanfaatan rambutan sebagai bahan pengobatan pada penyakit ikan yang disebabkan bakteri. Limbah rambutan dieksplorasi manfaatnya berupa kulit buah dan bijinya sebagai antibakteri patogen pada ikan. Kulit buah dan biji rambutan dapat diekstrak dengan menggunakan pelarut etanol. Etanol merupakan pelarut yang termasuk golongan polar. Pelarut polar merupakan pelarut yang dapat melarutkan senyawa flavanoid dan tanin yang terkandung dalam kulit buah dan biji rambutan (Khasanah, 2011). Pengujian penghambatan berupa uji penghambatan pertumbuhan bakteri dan uji cakram dilakukan untuk mengetahui pengaruh senyawa antibakteri yang terkandung di dalam ekstrak kulit buah dan biji rambutan terhadap bakteri empat bakteri patogen pada ikan antara lain *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *Streptococcus* sp., dan *V. alginolyticus*. Hasil uji penghambatan menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah rambutan tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *Streptococcus* sp., dan *V. alginolyticus* (Tabel 1). Tidak terbentuknya zona hambat disekitar *paper disc* sehingga bakteri masih tetap tumbuh merupakan indikasi bahwa ekstrak kulit buah rambutan tidak berpotensi sebagai senyawa antibakteri patogen (Gambar 1). Berlawanan dengan hasil ekstrak kulit buah, pada ekstrak biji rambutan berpengaruh dalam menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*, *A. salmonicida*,

dan *Streptococcus* sp., sedangkan terhadap bakteri *V. alginolyticus* tidak berpengaruh (Tabel 1). Terbentuknya zona hambat disekitar *paper disc* menunjukkan ekstrak biji rambutan berpotensi sebagai antibakteri patogen pada ikan (Gambar 1).

Ekstrak biji rambutan yang memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, dan *Streptococcus* sp., selanjutnya dilakukan pengukuran diameter zona hambat untuk menentukan seberapa besar daya hambat ekstrak biji rambutan dalam menghambat pertumbuhan bakteri. (Tabel 2, Gambar 1). Soetjipto (2008) menyatakan diameter zona hambat 20 mm atau lebih dikategorikan sangat kuat, zona hambat 10 sampai 20 mm kuat, 5 sampai 10 mm sedang, dan diameter kurang 5 mm berarti lemah. Konsentrasi yang memiliki zona hambat paling luas ada pada konsentrasi 75% dengan zona hambat diatas 10 mm, sehingga konsentrasi 75% merupakan dosis yang paling efektif karena memiliki zona hambat yang kuat. Perlakuan dengan konsentrasi 25% dan 50% menghasilkan daya hambat masing-masing bakteri dibawah 5 mm dan diatas 5 mm, sehingga digolongkan zona hambat lemah dan sedang. Hal ini diduga karena pada konsentrasi ini, bakteri membentuk respon resistensi terhadap senyawa antibakteri ekstrak biji rambutan. Pada perlakuan konsentrasi 75%, ekstrak biji rambutan menghasilkan zona hambat terluas yaitu > 10 mm yang digolongkan kuat. Hal ini diduga pada konsentrasi ini senyawa-senyawa antibakteri pada ekstrak biji rambutan bekerja maksimal sehingga dapat merusak dinding sel bakteri yang mengganggu metabolisme

sel yang akhirnya menghambat pertumbuhan bakteri. Sedangkan konsentrasi 100%, zona hambat menurun terutama pada bakteri *A. hydrophila* dan *A. salmonicida* yang mengalami penurunan drastis. Pada

bakteri *Streptococcus* sp. zona hambat masih tergolong kuat karena luasnya diatas 10 mm, sedangkan bakteri *A. hydrophila* dan *A. salmonicida* zona hambat sedang karena diatas 5 mm.



Gambar 1. Zona hambat yang terbentuk dari ekstrak kulit buah rambutan (*Nephelium lappaceum*) (A) dan biji rambutan (B) pada uji penghambatan.

Tabel 1. Hasil uji penghambatan ekstrak kulit buah dan biji rambutan (*Nephelium lappaceum*) dengan menggunakan empat jenis bakteri patogen pada ikan.

Asal Ekstrak	Jenis Bakteri Patogen			
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Vibrio alginolyticus</i>
Kulit Buah	-	-	-	-
Biji	+	+	+	-

Keterangan: (+) = menghambat
(-) = tidak menghambat

Uji MIC (Tabel 3) dilakukan untuk mengetahui konsentrasi terendah ekstrak biji rambutan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, dan *Streptococcus* sp. Konsentrasi ekstrak biji rambutan yang diujikan adalah

25%, 75%, 50%, 100%, 0% dan kontrol dengan masa inkubasi 24 jam. Ekstrak biji rambutan menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dan *A. salmonicida* pada konsentrasi 50%, sedangkan bakteri *Streptococcus* sp. pada konsentrasi 75%, hal ini

ditunjukkan adanya perubahan warna media dari keruh menjadi bening. Media MHB pada bakteri *A. hydrophila* dan *A. salmonicida* mulai terjadi perubahan warna dari keruh menjadi bening pada konsentrasi 50% dan semakin bening pada konsentrasi yaitu pada konsentrasi 75% dan 100%, sedangkan bakteri *Streptococcus* sp. mulai menjadi bening pada konsentrasi 75% dan 100%. Hasil konsentrasi 0% dan 25% pada bakteri *A. hydrophila* dan *A. salmonicida* dan ditambah

konsentrasi 50% bakteri *Streptococcus* sp. warna yang dihasilkan sama dengan kontrol positif. Hasil uji MIC menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak biji rambutan semakin dapat menghambat pertumbuhan bakteri, hal ini berarti semakin tinggi konsentrasi ekstrak semakin tinggi kandungan bahan antibakteri yang dihasilkan.

Tabel 2. Diameter zona hambat (mm) ekstrak biji rambutan (*Nephelium lappaceum*) pada uji penghambatan terhadap tiga bakteri patogen pada ikan.

Konsentrasi Ekstrak Biji Rambutan	Diameter Zona Hambat (mm)		
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>	<i>Streptococcus</i> sp.
Kontrol +	32	32	35
Kontrol -	0	0	0
25%	3	2	4
50%	7	6	5
75%	15	14	17
100%	6	7	12

Bahan aktif yang terkandung dalam ekstrak biji rambutan yang terbukti berdasarkan pengujian penghambatan dan pengujian MIC. Bahan aktif dalam ekstrak biji rambutan diperkirakan termasuk golongan flavonoid (Marston and Hostettmann, 2006). Flavonoid yang diperoleh dari biji rambutan termasuk kuat - sangat kuat dengan dua tipe penghambatan bakteri yaitu sebagai bakteriostatik dan bakterisidal. Dua tipe penghambatan bakteri didukung oleh hasil pengamatan pengujian penghambatan dan pengujian MIC dimana bakteri-bakteri patogen yang diuji memperoleh hasil terhambat pertumbuhannya oleh ekstrak biji rambutan yang bersifat bakteriostatik. Bakteri-bakteri patogen juga tidak dapat tumbuh dalam media pada

kondisi normal dengan diberi ekstrak biji rambutan yang disebut bersifat bakterisidal.

Biji rambutan yang diekstrak dengan etanol mengandung bahan aktif senyawa-senyawa flavanoid (Khasanah, 2011). Bahan aktif dari ekstrak biji rambutan efektif bekerja sebagai bakteriostatik dan bakterisidal karena diduga dapat menghambat dan merusak dinding atau membran sel bakteri yang terdiri dari lapisan protein. Mekanisme kerja senyawa-senyawa fenol termasuk flavanoid sebagai antibakteri adalah dengan mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sel (Brooks *et al*, 1996). Penghambatan dan perusakan dinding dan membran sel ini dapat dilakukan dengan terbentuknya ikatan-

ikatan hidrogen dan kovalen antara bahan aktifnya yang bersifat hidrofobik sehingga mengganggu integrasi dinding dan membran sel bakteri (Hugo, 1998).

Tabel 3. Pengujian *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) (%) dari ekstrak biji rambutan (*Nephelium lappaceum*) pada tiga bakteri patogen pada ikan.

Konsentrasi Ekstrak Biji Rambutan (%)	Pertumbuhan Bakteri		
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>	<i>Streptococcus</i> sp.
0	+	+	+
25	+	+	+
50	-	-	+
75	-	-	-
100	-	-	-

Keterangan: (+) = bakteri tumbuh
(-) = bakteri tidak tumbuh

Pemanfaatan ekstrak biji rambutan selanjutnya dapat dilanjutkan dengan pengujian yang dilakukan *in vivo* antara lain uji toksisitas pada ikan atau hewan uji lain misalnya *Artemia* sp. dan *Daphnia* sp. untuk mengetahui apakah ekstrak rambutan menjadi bahan beracun bagi inang. Terbuka juga peluang keberlanjutan penelitian ini dengan mempelajari efektifitas ekstrak rambutan untuk menaikkan sistem imun ikan dengan meneliti pengaruh pemberian ekstrak dengan kondisi hematologi, pertahanan tubuh seluler dan humoral pada ikan yang diuji tantang dengan patogen-patogen yang menginfeksi ikan.

Kesimpulan

Ekstrak etanol biji rambutan lebih efektif dibandingkan kulit buah dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen pada ikan antara lain: *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, dan *Streptococcus* sp. Ekstrak etanol biji rambutan memiliki zona hambat terbesar pada konsentrasi 75% dengan diameter zoan hambat diatas 10 mm yang termasuk dalam kategori

antibakteri kuat. Ekstrak etanol biji rambutan berdasarkan uji MIC dapat menghambat *A. hydrophila* dan *A. salmonicida* pada konsentrasi 50%, sedangkan *Streptococcus* sp. pada konsentrasi 75%.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih kami tujukan kepada Kepala dan Staff Stasiun Karantina Ikan-Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Lampung dalam penyediaan tempat, alat, dan isolat bakteri uji pada penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Ardó, L., Yin, G., Xu, P., Váradi, L., Szigeti, G., Jeney, Z and Jeney, G. 2008. Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 275:26-33.
- Brooks, G.F., Butel, J. S., Ornston, L. N. 1996. *Mikrobiologi Kedokteran* (Medical

- Microbiology*)/Jawetz, Melnick & Adelberg. Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 753 hlm.
- Bricknell, I and Dalmo, R. A. 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology* 19:457-472.
- Christybapita, D., Divyagnaneswari and Michael, R. D. 2007. Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*. *Fish & Shellfish Immunology* 23:840-852.
- Citarasu, T. 2010. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquacult Int* 18:403-414.
- Divyagnaneswari, M., Christybapita, D. and Michael, R. D. 2007. Enhancement of nonspecific immunity and disease resistance in *Oreochromis mossambicus* by *Solanum tribatum* leaf fractions. *Fish & Shellfish Immunology* 23:249-259.
- Düğenci, S. K., Arda, N. and Candan A. Some medicinal plants as immunostimulants for fish. *J. Ethnopharmacology* 88:99-106.
- Galina, J., Yin, G., Ardo, L and Jeney, Z. 2009. The use of immunostimulating herbs in fish. An overview of research. *Fish Physiol Biochem* 35:669-676.
- Hugo, W. B. 1998. Bacteria - Biology of Microorganisms. *In*: Hugo, W. B. and Russell, A. D (eds), *Pharmaceutical Microbiology*. Blackwell Science. Oxford. p. 3-34.
- Ji, S.C., Takaoka, O., Jeong, G. S., Lee, S. W., Ishimaru, K., Seoka, M and Takii, K. 2007. Dietary medicinal herbs improve growth and some non-specific immunity of red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Science* 73:63-69.
- Khasanah, A.N., 2011. Uji Aktivitas Penangkap Radikal Ekstrak Etanol, Fraksi-Fraksi dari Kulit Buah dan Biji Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) Serta Penetapan Kadar Fenolik dan Flavonoid Totalnya. Skripsi. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Magnadóttir, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology* 20:137-151.
- Marston, A. and Hostettmann, K. 2006. Separation and Quantification of Flavonoid. *In*: Andersen, Ø. M and Markham, K. R (eds), *Flavonoids, Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC-Taylor & Francis. Florida. p. 1-36.
- Mousavi, S. M., Wilson, G., Raftos, D., Mirzargar, S. S. and Omidbiagi, R. 2011. Antibacterial activities of a new combination of essential oils against marine bacteria. *Aquacult Int* 19:205-214.
- Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Saavedra, G., Murcia, M. A., Jiménez, A. M and Codina, C. 2003. Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. *Life Sciences* 73:1667-1681.
- Rao, Y. V., Das, B. K., Jyotirmayee and Chakrabarti, R. 2006. Effect of *Achyranthes aspera* on immunity and survival rate of *Labeo rohita* infected with

- Aeromonas hydrophila*. Fish & Shellfish Immunology 20:263-273.
- Reyes-Becerril, M., Tovar-Ramirez, D., Ascencio-Valee, F., Civera-Cerecedo, R., Gracia-Lopez, V and Barbosa-Solomieu, V. Effects of dietary live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress. Aquaculture 280:39-44.
- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture 172:63-92.
- Soetjipto, H. 2008. Aktivitas Antibakteri Minyak Astiri dan Toksisitas Ekstrak Bunga Legetan (*Spilanthes paniculata* Wall.). Berkala Ilmiah Biologi 2(7):53-59
- Sivaram, V., Babu, M. M., Immanuel, G., Murugadass, S., Citarasu, T. and Marian, M. P. 2004. Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. Aquaculture 237:9-20.
- Tolo, F. M., Rukunga, G. M., Muli, F. W., Njagi, E. N. M., Njue, W., Kumon, K., Mungai, G. M., Muthaura, C. N., Muli, J. M., Keter, L.K., Oishi, E. and Kofi-Tsekpo, M. W. 2006. Anti-viral activity of the extracts of a Kenyan medicinal plant *Carissa edulis* agaist herpes simplex virus. J. Ethnopharmacology 104:92-99.
- Vaseeharan, B., Prasad, G. S., Ramasamy, P. and Brennan, G. 2011. Antibacterial activity of *Allium sativum* against multidrug-resistant *Vibrio harveyi* isolated from black gill-diseased Fenneropenaeus indicus. Aquacult Int 19:531-539.
- Xue, J., Xu, Y., Jin, L., Liu, G., Sun, Y., Li, S. and Zhang, J. 2008. Effects of traditional Chinese medicine on immune reponses in abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. Fish & Shellfish Immunology 24:752-758.
- Yeh, S. P., Chang, C. A., Chang, C. Y., Liu, C. H. and Chen, W. 2008. Dietary sodium alginate administration effects fingerling growth and resistance to *Streptococcus* sp. and iridovirus, and juvenile non-specific immune responses of the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. Fish & Shellfish Immunology 25:19-27.
- Yin, G., Ardó, L., Thompson, K. D., Adams, A., Jeney, Z and Jeney, G. 2009. Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune reponse of carp, *Cyprinus carpio*, and protection against *Aeromonas hydrophila*. Fish & Shellfish Immunology 26:140-145.
- Yin, G., Jeney, G., Racz, T., Jun, P., Jeney, Z. 2006. Effects of two Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) on non-specific immune reponse of tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture 253:39-47.

