**Kombinasi sirih dan kipahit sebagai Immunostimulan terhadap penyakit *Streptococcosis* pada ikan nila (*Orechromis niloticus*)**

Nunak Nafiqoh\*), Septyan Andriyanto, Hessy Novita, Desy Sugiani, Taukhid

*Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan*

\*)nunak.nafiqoh@kkp.go.id

**Abstrak**

Ikan nila merupakan ikan air tawar yang banyak dikonsumsi hampir diseluruh dunia. Serangan penyakit yang paling banyak ditemui menyerang kegiatan budidaya ikan nila adalah bakteri *Streptococcus agalactiae* sebagai agen penyakit *Streptococcosis.* Peningkatan sistem imun dari ikan yang dibudidayakan merupakan cara yang efektif untuk menanggulangi masalah tersebut. Salah satu fungsi tanaman obat adalah sebagai imnostimulan, dimana sistem imun akan meningkat terutama saat mengalami wabah penyakit ikan. Penelitian ini di tujukan untuk mengetahui efek dari kombinasi tanaman sirih dan kipahit sebagai imunostimulan untuk ikan nila dalam menghadapi serangan penyakit akibat *S. agalactiae.* Kombinasi dari kedua tanaman tersebut diberikan dalam 4 dosis berbeda 1, 2, 4, dan 8% per kg pakan Parameter hematologi menunjukkan perbedaan hematokrit dan eritrosit dari kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol. Nilai hitung leukosit, NBT dan lisosim menunjukkan tren serupa. Nilai sintasan menunjukkan kelompok perlakuan jauh lebih baik dibandingkan kelompok kontrol.

Kata Kunci: Sirih, Kipahit, Imunostimulan, *Streptococcosis*, *Orechromis niloticus*

**Abstract**

*Tilapia is a freshwater fish that widely consumed in all over the world. Streptococcus agalactiae is the one of most common bacteria within freshwater, it causes a Streptococcosis disease in tilapia culture. One of medicinal plants property is as an imnostimulant, especially when experiencing outbreaks of fish disease. This research is aimed to find out the effect of the combination of betel and kipahit plants as immunostimulants for tilapia to conquers S. agalactiae outbreaks. The combination of the two plants was given in 4 different doses of 1, 2, 4, and 8% per kg of feed. Hematological parameters showed differences in hematocrit and erythrocytes in the treatment group compared to the control group. Leukocyte, NBT and lysozyme count values ​​show a similar trend. The survival value indicates the treatment group was better than the control group.*

Keyword: Betel, Kipahit, Imunostimulan, *Streptococcosis*, *Orechromis niloticus*

Pendahuluan

Aktifitas perikanan budidaya dewasa ini menjadi industri yang cukup menjanjikan, hal ini disebabkan karena produk budidaya telah memenuhi kebutuhan bahan pangan berupa ikan segar. Hal tersebut memicu terjadinya intensifikasi kegiatan budidaya di Indonesia dan juga di negara lainnya. Intensifikasi tanpa pengelolaan yang tepat mengakibatkan timbulnya masalah dalam kegiatan budidaya, salah satunya adalah penyakit yang menyerang kegiatan budidaya.

Penyakit yang cukup menjadi momok dalam kegiatan budidaya adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri sebagai agen. Bakteri penyebab penyakit yang mampu menyebabkan kerugian cukup besar adalah *Streptococcus agalactiae,* bakteri ini merupakan penyebab utama penyakit streptococcosis pada ikan. *S. agalactiae* adalah bakteri Gram-positif yang berbentuk bulat berantai (Streptococci), bersifat hemolitik baik alpha ataupun beta, menyerang hewan akuatik, terrestrial dan mamalia juga manusia, beberapa jenis ikan yang sudah diketahui rentan terhadap serangan bakteri *Streptococcus* antara lain dari golongan ikan kakap, salmon, belanak, kerapu, trout, dan tilapia (Amal and Zamri-Saad 2011).

Pada proses budidaya ikan nila, bakteri *Streptococcus* merupakan penyebab penyakit utama yang mampu mengakibatkan kerugian yang cukup besar. Indonesia adalah negara kedua terbesar dalam produksi ikan nila setelah China Indonesia (FAO, 2015). Sehingga keberadaan penyakit akibat bakteri *Streptococcus* menjadi perhatian yang cukup besar dari pemerintah. Beberapa cara telah dikembangkan untuk mengatasi penyakit akibat bakteri *Streptococcus*, antara lain vaksinasi dan probiotik. Namun kekayaan biodiversitas berupa tanaman yang dapat berfungsi sebagai obat sangat sayang untuk tidak dimanfaatkan, selain itu tanaman obat-obatan banyak tumbuh disekitar kolam pemeliharaan.

Daun kipahit adalah salah satu tumbuhan perdu yang ada di sekitar kolam pemeliharaan. Tanaman kipahit sendiri merupakan tanaman yang jaang dimanfaatkan oleh manusia, meskipun mengandung senyawa yang dapat bertindak sebagai anti-oksidan, anti-bakteri dan anti-inflamasi (Chukwuka and Ojo 2014). Sedangkan sirih merupakan obat tradisional yang banyak digunakan di Indonesia, dikenal sebagai anti-bakteri, anti-oksidan, dan mempunyai aktifitas immunomodulasi (Pradhan *et al*. 2013). Kedua bahan tersebut terbukti sebagai anti-bakteri dengan dosis berbeda saat diujikan pada bakteri *Aeromonas hydrophila* (Nafiqoh, Sukenda, Zairin, *et al*. 2019).

Beberapa studi tentang penggunaan bahan tanaman obat menunjukkan bukti efikasi dari tanaman obat yang digunakan baik digunakan secara tunggal ataupun kombinasi, namun studi lanjutan menegaskan bahwa kombinasi dari tanaman obat mempunyai efikasi yang lebih baik sebagai obat (Che *et al*. 2013; Ji *et al*. 2007). Oleh karena itu studi ini dilakukan untuk mengetahui prospek tanaman obat sirih dan kipahit yang dikombinasikan sebagai peningkat system imun pada ikan nila yang di uji tantang dengan bakteri *Streptococcus agalactiae.*

Bahan dan Metode

Ekstraksi tanaman obat

Tanaman obat berupa daun sirih dan kipahit didapatkan dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro) berupa serbuk kering, kemudian serbuk tersebut diekstrak dengan metode maserasi menggunakan pelarut aceton dengan perbandingan 1:10 g/v. Larutan di diamkan semalam pada suhu ruang dalam orbital shaker (50 rpm). Larutan rendaman tanaman obat kemudian di saring menggunakan kertas saring Whatmann (N°41). Larutan yang telah disaring kemudian dievaporasi menggunakan alat rotary evaporator (Heidolph WB 200) hingga semua pelarut menguap. Hasil ekstrak kemudian disimpan dalam botol kaca gelap pada suhu 4 °C untuk digunakan pada uji *in vitro*.

Persiapan pakan dan pemeliharaan ikan

Tanaman obat yang akan digunakan direndam dalam akuades dengan komposisi 1, 2, 3, 4 dan 8 gr 100 mL-1 akuades selama semalam, kemudian disaring menggunakan kertas saring dan di semprotkan pada 100 gr pakan, pakan dikeringanginkan dan disimpan dalam wadah bersih tertutup, sedangkan pakan control merupakan pakan yang tidak ditambahkan tanaman obat.

Ikan nila berukuran 10±2 cm dipelihara dalam bak bervolume 40 liter dengan kepadatan 2 ekor L-1. Ikan dipelihara selama 4 minggu dengan diberikan pakan perlakuan sebayka 3% dari biomassa. Pada ahir pemeliharaan ikan di uji tantang menggunakan bakteri pathogen *Streptococcus agalactiae* dan kematian di amati sampai hari ke-4 pasca uji tantang. Setiap kelompok perlakuan dilakukan sebanyak tiga kali ulangan.

Pengambilan sampel

Pengambilan sampel dilakukan pada ahir masa pemeliharaan dan pasca uji tantang. Sampel yang diambil adalah darah yang diambil menggunakan spuit1 cc. darah dibagi menjadi dua bagian, satu bagian di campur dengan 3,8% Natrium sitrat sebagai anti-koagulan dan satu bagian di diamkan selama 2 jam pada suhu ruang untuk disentrifus untuk koleksi serum, serum yang dikoleksi kemudian disimpan pada suhu -20°C untuk uji lisosim. Sedangkan darah dengan anti-koagulan digunakan untuk Analisa jumlah eritrosit, leukosit dan Nitroblue Tetrazolium (NBT).

Eritrosit dan Leukosit

Jumlah eritrosit dan leukosit di lakukan sesuai prosedur yang telah dijelaskan oleh Ngugi *et al*. (2015). Untuk menghitung eritrosit, darah yang telah di campur dengan anti-koagulan dilarutkan dengan Dacie’s fluid (1 mL formaldehyde, 3g trisodium citrate, 99 mL akuades). Sedangkan untuk menghitung leukosit darah yang telah di campur dengan anti-koagulan dilarutkan dengan Turk’s Fluid (1 mL crystal violet, 0.5 mL asam asetat glasial, 100 mL akuades). Sampel kemudian di teteskan pada hemocytometer dan di hitung dibawah mikroskop. Perhitungan eritrosit dan leukosit mengikuti rumus;

$$Eritrosit = \frac{Jumlah sel x Pengenceran}{0.02}$$

$$Leukosit =\frac{jumlah sel x pengenceran}{volume kamar hitung (\frac{4}{10})}$$

Respon imun

Respon imun yang diukur adalah aktifitas lisosim dan NBT, aktifitas lisosim diukur menggunakan metode Ellis (1990). Sebanyak 10 μL serum di inkubasi dalam 190 μL suspensi *Micrococcus lysodeikticus* (0.05 M Na2H2PO4 dalam akuades steril), sample dibaca sesaat penambahan suspensi dan 5 menit setelah inkubasi pada suhu 24°C dengan Panjang gelombang 530 nm.

Nitoblue tetrazolium (NBT) diukur menggunakan metode Kumar *et al*. (2008). Sebanyak 20 μL darah dimasukkan dalam sumur *96-well plate* dan di inkubasi selam 1 jam pada suhu 27°C, sumur dicuci menggunakan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) dan di tambahkan NBT sebanyak 20 μL dan diinkubasi selama 1 jam. NBT dibuang dan kedalam sumur dimasukkan fiksatif berupa 95% methanol selama 3 menit, diikuti 30% menthanol selama 3 menit. kemudian kedalam sumur dimasukkan 70 μL DMSO dan 60 μL KOH (1 M). Sampel dibaca dalaam Panjang gelombang 540 nm.

Uji tantang

Untuk uji tantang *S. agalactiae* di tumbuhkan dalam media Triptic Soya Broth (TSB, Oxoid) selama 48 jam pada suhu 30°C. Kemudian bakteri di encerkan dalam PBS hingga mencapai kepadatan 105 CFU mL-1. Sebanyak 100 μL bakteri yang telah diencerkan di ijeksikan secara intramuscular pada saat ahir pemeliharaan. Sintasan dan Relative Percent Survival (RPS) dihitung sebagai berikut;

$$Sintasan (\%)=\frac{fish surviving number at the end of experiment }{fish number at the beginning of experiment} x 100$$

$$Relative percent survival (\%) = 1-(\frac{\% of treated group}{\% of control group}) x 100$$

Hasil dan pembahasan

Hematokrit merupakan bagian padat dari cairan darah dalam ikan, dengan komposisi terbanyak adalah eritrosit atau sel darah merah. Hasil menunjukkan bahwa penambahan ekstrak tanaman mampu memelihara jumlah padatan (Gambar 1) sekaligus jumlah eritrosit (Gambar 2) pada kelompok perlakuan.

Gambar 1. Nilai Hematokrit ikan nila yang menerima perlakuan tanaman kombinasi ekstrak daun sirih dan kipahit setelah uji tantang dengan bakteri *S. agalactiae*

Figure 1. Hematocrit value of tilapia received a combination of betel and kipahit leaf extract treatment after challenge with *S. agalactiae*

Penelitian sebelumnya yang terfokus pada eritrosit manusia menemukan bahwa eritrosit mampu berperan sebagai modulator dari respon imun bawaan (Anderson, Brodsky, and Mangalmurti 2018). Sehingga jumlah sel darah merah yang lebih tinggi pada kelompok perlakuan mengindikasikan bahwa ikan mempunyai sistem pertahanan yang cukup dibandingkan dengan kelompok kontrol. Bakteri *S. agalactiae* yang digunakan merupakan bakteri koleksi laboratorium kesehatan ikan yang telah di amati, bakteri ini merupakan bakteri *Streptococcus* yang bersifat non-hemolitik atau tidak melisiskan eritrosit (Suhermanto *et al*. 2019), sehingga kemungkinan jumlah eritrosit dari kelompok kontrol tidak dipengaruhi oleh adanya infeksi dari *S. agalactiae* namun dipengaruhi oleh perlakuan tanaman obat.

Gambar 2. Jumlah eritrosit ikan nila yang menerima perlakuan tanaman kombinasi ekstrak daun sirih dan kipahit setelah uji tantang dengan bakteri *S. agalactiae*

Figure 2. Erythrocyte of tilapia received a combination of betel and kipahit leaf extract treatment after challenge with *S. agalactiae*

Naiknya jumlah leukosit merupakan respon yang terjadi hampir disetiap adanya serangan infeksi. Hal ini disebabkan bahwa fungsi sel darah putih (leukosit) adalah pertahanan pertama dari tubuh untuk menghalau serangan penyakit yang terjadi. Hasil serupa juga ditunjukkan oleh penelitian sebelumnya yang menggunakan ikan nila yang telah diinfeksi oleh *Enterococcus sp*. Pada penelitian tersebut jumlah leukosit yang terhitung naik secara signifikan (Martins *et al*. 2008). Penambahan ekstrak tanaman terlihat memberikan efek positif pada ikan uji (Gambar 3), hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan naiknya jumlah leukosit pada ikan nila yang menerima perlakuan pakan bersuplemen minyak esensial dari *Citrus limon* (Baba *et al*. 2016)*.* Jumlah leukosit yang naik diduga karena adanya proliferasi sel dari sel dari darah putih yang diproduksi di organ ginjal dari ikan, seperti penelitian yang menggunakan ikan lele sebagai ikan model (Nafiqoh, Sukenda, Zairin Jr, *et al*. 2019)

Gambar 3. Jumlah leukosit ikan nila yang menerima perlakuan tanaman kombinasi ekstrak daun sirih dan kipahit setelah uji tantang dengan bakteri *S. agalactiae*

Figure 3. Leukocyte value of tilapia received a combination of betel and kipahit leaf extract treatment after challenge with *S. agalactiae*

Nilai Tetrazolium yang menggambarkan aktifitas fagositosis dari ikan nila menunjukkan perbedaan antara perlakuan dan kontrol (Gambar 4) Hal ini diduga karena jumlah sel darah putih dari kelompok perlakuan cenderung lebih banyak dibandingkan kontrol. Hasil yang sama diperoleh oleh penelitian Baba *et al*. (2016).

Gambar 4. Nitroblie tetrazolium ikan nila yang menerima perlakuan tanaman kombinasi ekstrak daun sirih dan kipahit setelah uji tantang dengan bakteri *S. agalactiae*

Figure 4. Nitoblue tetrazolium value of tilapia received a combination of betel and kipahit leaf extract treatment after challenge with *S. agalactiae*

Demikian juga nilai dari aktifitas lisosim yang terdeteksi dari serum, pada kelompok perlakuan cenderung lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol (Gambar 5). Penelitian yang sama menunjukkan adanya kenaikan aktifitas lisosim dari ikan nila yang menerima perlakuan. Lisosim adalah system pertahanan humoral dari ikan yang mampu memicu hidolisis dari dinding sel bakteri, ditemukan di serum dan lender (*mucus*) (Vallejos-Vidal *et al*. 2016). Naiknya aktifitas lisosim akibat penambahan tanaman obat diduga akibat adanya interaksi antara kandungan tanaman obat berupa flavonoid dengan lisosim, perlu dicatat bahwa interaksi ini sangat tergantung pada posisi hydrogen dan glikosil (Yang *et al*. 2012).

Gambar 5. Aktifitas lisosim ikan nila yang menerima perlakuan tanaman kombinasi ekstrak daun sirih dan kipahit setelah uji tantang dengan bakteri *S. agalactiae*

Figure 5. Lysosyme activity of tilapia received a combination of betel and kipahit leaf extract treatment after challenge with *S. agalactiae*

Pada pengukuran pertumbuhan ikan yang menerima perlakuan menunjukkan tidak adanya efek negative yang biasa terlihat dari pakan yang suplemen tanaman obat, hal ini diduga karena yang digunakan adalah ekstrak dari tanaman sirih dan kipahit dimana serat dari tanaman sudah dieliminasi. Meskipun pertubuhan Panjang dari kelompok perlakuan terlihat tidak berbeda dibandingkan kelompok kontrol (Gambar 6), namun pada pertumbuhan berat kelompok perlakuan cenderung lebih bik dibandingkan dengan kelompok kontrol (Gambar 7). Penambahan tanaman obat tertentu memang diketahui mampu meningktakan pertumbuhan seperti penelitian Abdel-Tawwab *et al*. (2010) yang menggunakan suplementasi daun teh pada ikan nila. Pertumbuhan yang lebih baik dari kelompok perlakuan diduga naiknya *feed intake* dari ikan yang menerima perlakuan.

Gambar 6. Pertumbuhan panjang ikan nila yang menerima perlakuan tanaman kombinasi ekstrak daun sirih dan kipahit

Figure 6. Growth length of tilapia received a combination of betel and kipahit leaf extract treatment

Gambar 7. Pertumbuhan berat ikan nila yang menerima perlakuan tanaman kombinasi ekstrak daun sirih dan kipahit

Figure 7. Growth weight of tilapia received a combination of betel and kipahit leaf extract treatment

Banyak penelitian yang menunukkan adanya kenaikan sintasan (Gambar 8) dan Relative Percent Survival (Table 2) dari ikan yang menerima perlakuan. Kenaikan ini tentu saja dipengaruhi oleh peningkatan respon imun yang menunjukkan adanya kenaikan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Penelitian menggunakan tanaman daun sirih dan kipahit secara tunggal mampu meningkatkan sintasan relatif hingga 79%, dengan kedua tanaman tersebut dikombinasikan sintasan relatif yang dihitung mampu naik hingga 96% (Nafiqoh, Sukenda, Zairin, *et al*. 2019)

Gambar 8. Analisa sintasan dari ikan nila yang menerima perlakuan tanaman kombinasi ekstrak daun sirih dan kipahit setelah uji tantang dengan bakteri *S. agalactiae*

Figure 8. Survival rate analysis rate of tilapia that received a combination betel leaf and kipahit extract after challenging tests with *S. agalactiae* bacteria

Tabel 2. Relative percent survival (RPS) dari ikan nila yang menerima perlakuan kombinasi ekstrak daun sirih dan kipahit setelah uji tantang dengan bakteri *S. agalactiae*

Table 2. Relative percent survival (RPS) of tilapia that received a combination betel leaf and kipahit extract after challenging tests with *S. agalactiae* bacteria

|  |  |
| --- | --- |
| Perlakuan | RPS |
| 0% | - |
| 1% | 87.9182 |
| 2% | 96.33885 |
| 4% | 86.03532 |
| 8% | 80.13287 |

Kesimpulan

Penambahan tanaman kombinasi ekstrak daun sirih dan kipahit dengan dosis 2% mempunyai prospek yang cukup baik sebagai imunostimulan pada ikan nila saat diuji tantang dengan bakteri pathogen *Streptococcus agalactiae.*

Saran

Perlu didalami lebih lanjut tentang efektifitas ekstrak kombinasi sebagai peningkat pertumbuhan.

Ucapan Terimakasih

Penelitian ini dibiayai oleh DIPA 2019 BRPBATPP Sempur Bogor.

Daftar Pustaka

Abdel-Tawwab, Mohsen, Mohammad H. Ahmad, Medhat E. A. Seden, and Saleh F. M. Sakr. 2010. “Use of Green Tea, Camellia Sinensis L., in Practical Diet for Growth and Protection of Nile Tilapia, Oreochromis Niloticus (L.), against Aeromonas Hydrophila Infection.” *Journal of the World Aquaculture Society* 41 (May): 203–13.

Amal, MNA, and M Zamri-Saad. 2011. “Streptococcosis in Tilapia (Oreochromis Niloticus): A Review.” *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 34 (2): 195–206.

Anderson, H. Luke, Igor E. Brodsky, and Nilam S. Mangalmurti. 2018. “The Evolving Erythrocyte: Red Blood Cells as Modulators of Innate Immunity.” *The Journal of Immunology* 201 (5): 1343–51.

Baba, Esin, Ümit Acar, Canan Öntaş, Osman Sabri Kesbiç, and Sevdan Yılmaz. 2016. “Evaluation of Citrus Limon Peels Essential Oil on Growth Performance, Immune Response of Mozambique Tilapia Oreochromis Mossambicus Challenged with Edwardsiella Tarda.” *Aquaculture* 465 (December): 13–18..

Che, C. T, Z. J Wang, M Sing, S Chow, C Wai, and K Lam. 2013. “Herb-Herb Combination for Therapeutic Enhancement and Advancement: Theory, Practice and Future Perspectives.” *Molecules* 18: 5125–41.

Chukwuka, K S, and O M Ojo. 2014. “Extraction and Characterization of Essential Oils from Tithonia Diversifolia (Hemsl.) A . Gray.” *American Journal of Essential Oils and Natural Products* 1 (4): 1–5.

Ellis, A. E. 1990. “Lysozyme Assay.” In *Techniques in Fish Immunology: Fitc 1*, edited by J. S. Stolen, 101–3. California: Sos Publications..

Ji, Seung Cheol, Osamu Takaoka, Gwan Sik Jeong, Si Woo Lee, Katsuya Ishimaru, Manabu Seoka, and Kenji Takii. 2007. “Dietary Medicinal Herbs Improve Growth and Some Non-Specific Immunity of Red Sea Bream Pagrus Major.” *Fisheries Science* 73 (1): 63–69.

Kumar, Rajesh, S. C Mukherjee, Ritesh Ranjan, and S. K Nayak. 2008. “Enhanced Innate Immune Parameters in Labeo Rohita ( Ham .) Following Oral Administration of Bacillus Subtilis Enhanced Innate Immune Parameters in Labeo Rohita ( Ham .) Following Oral Administration of Bacillus Subtilis.” *Fish & Shellfish Immunology* 24: 168–72.

Martins, Ml., Jlp. Mouriño, Gv. Amaral, Fn. Vieira, G. Dotta, Amb. Jatobá, Fs. Pedrotti, Gt. Jerônimo, Cc. Buglione-Neto, and G. Pereira-Jr. 2008. “Haematological Changes in Nile Tilapia Experimentally Infected with Enterococcus Sp.” *Brazilian Journal of Biology* 68 (3): 657–61.

Nafiqoh, Nunak, Sukenda Sukenda, Muhamad Zairin Jr, Alimuddin Alimuddin, Angela Mariana Lusiastuti, and Jean-Christophe Avarre. 2019. “Status kesehatan ikan lele (*Clarias gariepinus*) yang menerima pakan bersuplemen kombinasi daun sirih (*Piper betle* leaf), jambu biji (*Psidium guajava* leaf), dan kipahit (*Tithonia diversifolia* leaf).” *Jurnal Riset Akuakultur* 13 (4): 357.

Nafiqoh, Nunak, Sukenda, M. Zairin, Alimuddin, Angela Lusiastuti, Samira Sarter, Domenico Caruso, and Jean-Christophe Avarre. 2019. “Antimicrobial Properties against Aeromonas Hydrophila and Immunostimulant Effect on Clarias Gariepinus of Piper Betle, Psidium Guajava, and Tithonia Diversifolia Plants.” *Aquaculture International*, August.

Ngugi, Charles C., Elijah Oyoo-Okoth, James Mugo-Bundi, Paul Sagwe Orina, Emily Jepyegon Chemoiwa, and Peninah A. Aloo. 2015. “Effects of Dietary Administration of Stinging Nettle (Urtica Dioica) on the Growth Performance, Biochemical, Hematological and Immunological Parameters in Juvenile and Adult Victoria Labeo (Labeo Victorianus) Challenged with Aeromonas Hydrophila.” *Fish and Shellfish Immunology* 44 (2): 533–41.

Pradhan, D, K A Suri, D K Pradhan, and P Biswasroy. 2013. “Golden Heart of the Nature : Piper Betle L .” *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 1 (6): 147–67.

Suhermanto, Achmad, Sukenda Sukenda, Muhammad Zairin Jr, Angela M Lusiastuti, and Sri Nuryati. 2019. “Characterization of Streptococcus Agalactiae Bacterium Isolated from Tilapia (Oreochromis Niloticus) Culture in Indonesia.” *AACL Bioflux* 12 (3): 11.

Vallejos-Vidal, Eva, Felipe Reyes-López, Mariana Teles, and Simon MacKenzie. 2016. “The Response of Fish to Immunostimulant Diets.” *Fish & Shellfish Immunology* 56 (September): 34–69.

Yang, Ran, Lanlan Yu, Huajin Zeng, Ruiling Liang, Xiaolan Chen, and Lingbo Qu. 2012. “The Interaction of Flavonoid-Lysozyme and the Relationship between Molecular Structure of Flavonoids and Their Binding Activity to Lysozyme.” *Journal of Fluorescence* 22 (6): 1449–59.