

## Sintasan ikan mas turunan ketiga pembawa marka Cyca-DAB1\*05 ditantang dengan *Aeromonas hydrophila*

### Survival of common carp carrying Cyca-DAB1\*05 post-challenged with *Aeromonas hydrophila*

Laode Muhammad Arsal, Munti Yuhana\*, Sri Nuryati, Alimuddin

Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor  
Kampus IPB Dramaga Bogor, Jawa Barat 16680

\*Surel: yhnmy@yahoo.co.id

#### ABSTRACT

Blood parameters are considered as important indicators to diagnose fish health status. This study was performed to observe blood profiles including total erythrocytes, hemoglobin concentration, hematocrite, total leukocytes and differential leukocytes, and survival of common carp *Cyprinus carpio* infected by *Aeromonas hydrophila*. Fish were divided into two groups: the 3<sup>rd</sup> generation of common carp carrying fish carrying Cyca-DAB1\*05 of major histocompatibility complex II molecular marker, and fish without the marker as control treatment. Common carp 3<sup>rd</sup> generation was produced by crossing among second generation of fish carrying the Cyca-DAB1\*05 marker. Each fish was injected intramuscularly by 0.1 mL of 10<sup>8</sup> cfu/mL *A. hydrophila*. Challenge test was conducted for 14 days and blood was collected at day-0, three, seven, and 14. The results of this study showed that erythrocytes, hemoglobin and hematocrite concentrations of common carp carrying the molecular marker at post challenge with *A. hydrophila* were higher ( $P < 0.05$ ) compared to control fish. The blood profiles were highly correlated to survival of fish. Survival of fish that carrying the molekuler marker was about two point six fold higher than those of control fish.

Keywords: *Cyprinus carpio*, *Aeromonas hydrophila*, Cyca-DAB1\*05, molecular marker

#### ABSTRAK

Gambaran darah merupakan indikator penting untuk mendiagnosa penyakit ikan. Penelitian ini dilakukan untuk menguji gambaran darah ikan mas *Cyprinus carpio* setelah diinfeksi dengan bakteri *Aeromonas hydrophila* yang meliputi total sel darah merah, konsentrasi hemoglobin, hematokrit, total sel darah putih, dan diferensial leukosit, serta sintasannya. Ikan mas yang digunakan terdiri atas ikan mas generasi ketiga yang membawa marka molekuler Cyca-DAB1\*05 dari kelompok *major histocompatibility complex* II dan ikan mas tanpa marka sebagai kontrol. Ikan mas generasi ketiga merupakan keturunan persilangan antar ikan mas generasi kedua yang mempunyai marka Cyca-DAB1\*05. Masing-masing ikan diinfeksi *A. hydrophila* secara intramuskuler pada dosis 0,1 mL, kepadatan 10<sup>8</sup> cfu/mL. Uji tantang dilakukan selama 14 hari, dan sampel darah ikan diambil pada hari ke-0, tiga, tujuh dan 14. Hasil uji tantang menunjukkan bahwa total sel darah merah, konsentrasi hemoglobin dan hematokrit pada ikan mas yang membawa marka molekuler lebih tinggi dibandingkan ikan mas tanpa marka ( $P < 0,05$ ). Hasil uji gambaran darah berkorelasi tinggi dengan tingkat kelangsungan hidup ikan mas. Tingkat kelangsungan hidup ikan mas yang membawa marka molekuler Cyca-DAB1\*05 lebih tinggi hingga dua koma enam kali daripada ikan mas kontrol.

Kata kunci: *Cyprinus carpio*, *Aeromonas hydrophila*, Cyca-DAB1\*05, marka molekuler

#### PENDAHULUAN

Ikan mas (*Cyprinus carpio*) merupakan salah satu komoditas budidaya utama di Indonesia. Kebutuhan pasar yang tinggi diimbangi dengan produksi ikan mas dalam jumlah besar melalui sistem budidaya intensif dengan tingkat kepadatan

tinggi. Namun demikian, di balik keberhasilan tersebut, masih terdapat faktor pembatas dalam pelaksanaan budidaya ikan mas berupa serangan penyakit, baik bakterial maupun viral, yang juga merupakan salah satu permasalahan utama. Angka kematian kumulatif yang terkait dengan wabah penyakit memberikan dampak negatif yang besar

pada kegiatan industri budidaya berupa kerugian ekonomi (Gilad *et al.*, 2003).

Salah satu bakteri yang sering menyerang ikan mas adalah *Aeromonas hydrophila*. Gejala infeksi *A. hydrophila* meliputi pembengkakan jaringan, perdarahan yang meluas pada permukaan kulit (*haemorrhagic septicemia*), nekrosis, luka pada kulit hingga luka terbuka (*ulcer*) pada permukaan tubuh atau hingga ke dalam jaringan (Mu *et al.*, 2011; Pridgeon & Klesius, 2011). Pada beberapa jenis ikan lain sering ditemukan tanda klinis seperti kerontokan sirip punggung dan sirip ekor, serta pembengkakan pada bagian perut dan berisi cairan (*dropsy*) yang diikuti dengan kematian (Popma & Masser, 1999). Meskipun sering dianggap sebagai patogen sekunder yang terkait dengan wabah penyakit, *A. hydrophila* juga bisa menjadi patogen utama penyebab wabah dengan angka kematian yang tinggi (Pridgeon *et al.*, 2011).

Adanya infeksi akan ditanggapi oleh sistem imun dengan mengaktifkan kekebalan tubuh bawaan (nonspesifik) sebagai pertahanan dasar pertama pada infeksi. Respons imun bawaan pada ikan memiliki peranan yang sangat penting dalam hal pertahanan menghadapi infeksi patogen (Uribe *et al.*, 2011). Sistem pertahanan tubuh nonspesifik seperti sel-sel fagosit termasuk monosit dan neutrofil akan diaktifkan ketika terjadi infeksi.

Salah satu indikator yang dapat dilihat dari adanya infeksi yaitu perubahan terhadap profil gambaran darah. Darah bertindak sebagai agen transportasi internal dan memainkan peran penting dalam regulasi aktivitas kehidupan. Darah bertanggung jawab mengangkut oksigen, karbon dioksida, nutrisi, makanan, hormon, dan juga terlibat dalam produksi antibodi. Gambaran darah merupakan faktor diagnostik penting pada keadaan patologis (Nuryati *et al.*, 2006). Gambaran darah juga dapat dijadikan sebagai indikator pertahanan imun nonspesifik. Pengetahuan mengenai kondisi hematologi, dalam hal ini pemeriksaan komponen darah dapat digunakan untuk mengetahui kondisi kesehatan ikan, mengevaluasi pertahanan nonspesifik pada spesies ikan yang berbeda, serta mengetahui pengaruh perubahan fisiologis terhadap kesehatan ikan (Satheeshkumar *et al.*, 2011). Oleh karena itu, penting untuk melakukan pengujian terhadap sistem pertahanan nonspesifik pada ikan mas melalui pengamatan gambaran darah.

Saat ini *major histocompatibility complex* (MHC) merupakan marka yang umum digunakan

dalam studi mengenai hubungan daya tahan ikan terhadap suatu penyakit. Hal ini didasarkan karena MHC berperan penting dalam sistem imun. MHC dikodekan oleh dua subfamili utama, yakni MHC kelas I dan kelas II yang berfungsi untuk mengikat dan menyajikan antigen ke limfosit T melalui molekul CD8+ dan CD4+ (Rakus, 2008). MHC kelas I dan kelas II berperan dalam pengenalan beragam patogen, antigen peptida asing dan berperan penting dalam respons imun, baik bawaan maupun adaptif (Kales, 2006).

Ikan mas yang tahan terhadap infeksi patogen, yang termasuk MHC kelas II, dapat diidentifikasi melalui metode *polymerase chain reaction* dengan primer yang didesain dari sekuen Cyca-DAB1\*05 (Alimuddin *et al.*, 2011). Saat ini telah diproduksi ikan mas strain Majalaya generasi ketiga (F3) di Balai Besar Perikanan Budidaya Air Tawar Sukabumi, yang membawa marka molekuler MHC II. Ikan mas F3 tersebut merupakan hasil pemijahan ikan F2 jantan dan F2 betina yang tahan penyakit dan juga membawa marka molekuler Cyca-DAB1\*05. Daya tahan terhadap patogen dan korelasinya dengan gambaran darah perlu diuji sebelum ikan tersebut dapat dirilis ke pembudidaya. Penelitian ini bertujuan untuk menguji pengaruh infeksi bakteri *A. hydrophila* pada ikan mas F3 yang membawa marka molekuler Cyca-DAB1\*05 terhadap gambaran darah sebagai representasi tanggap kebal ikan mas serta pengaruhnya terhadap tingkat kelangsungan hidup ikan mas pascainfeksi.

## BAHAN DAN METODE

### Preparasi bakteri

Bakteri uji *A. hydrophila* yang digunakan berasal dari Laboratorium Kesehatan Ikan (LKI) Departemen BDP, FPIK-IPB. Bakteri *A. hydrophila* ditumbuhkan pada media *tripticase soy agar* (TSA), kemudian diinkubasi selama 18–24 jam pada suhu 24–25 °C pada media TSA miring di dalam tabung reaksi. Biakan *A. hydrophila* diambil menggunakan jarum Ose sampai memenuhi lingkaran jarum, kemudian dilarutkan dalam media *tripticase soy broth* (TSB) dan diinkubasi selama 18–24 jam dalam *waterbath*. Bakteri hasil inkubasi selanjutnya digunakan dalam uji tantang.

### Persiapan ikan uji

Ikan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan mas strain Majalaya keturunan ketiga (F3) yang membawa marka molekuler Cyca-

DAB1\*05 dari Balai Besar Perikanan Budidaya Air Tawar (BBPBAT) Sukabumi, dan ikan mas strain Majalaya yang tidak membawa marka dari pembudidaya di wilayah Bogor. Ikan mas F3 tersebut diaklimatisasi selama dua minggu dalam wadah akuarium berukuran 100x100x60 cm<sup>3</sup> sebanyak enam buah, dan setiap akuarium diisi sebanyak 30 ekor ikan mas dengan bobot 10–15 g. Ikan mas tersebut digunakan dalam uji tantang dengan *A. hydrophila* untuk mengevaluasi gambaran darah dan tingkat kelangsungan hidup ikan uji pascainfeksi.

### Penentuan LD-50

Penentuan LD-50 ini bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi bakteri yang dapat menyebabkan kematian sebanyak 50% pada ikan uji setelah proses infeksi melalui metode penyuntikan. Ikan disuntik secara intramuskuler menggunakan bakteri *A. hydrophila* sebanyak 0,1 mL dengan konsentrasi 10<sup>8</sup> cfu/mL, 10<sup>7</sup> cfu/mL, 10<sup>6</sup> cfu/mL, 10<sup>5</sup> cfu/mL, 10<sup>4</sup> cfu/mL, dan 10<sup>3</sup> cfu/mL, sebanyak sepuluh ekor untuk setiap perlakuan. Hasil dari uji LD-50 menunjukkan bahwa dosis yang dapat membunuh ikan mas sekitar 50% adalah konsentrasi 10<sup>8</sup> cfu/mL. Hasil uji LD-50 selanjutnya digunakan untuk penyuntikan ikan pada saat uji tantang.

### Uji tantang

Uji tantang dilakukan dengan menginjeksi bakteri *A. hydrophila* dengan dosis 0,1 mL sebanyak 10<sup>8</sup> cfu/mL per ekor ikan. Perlakuan yang digunakan yaitu uji tantang bakteri *A. hydrophila* pada ikan mas yang membawa marka molekuler Cyca-DAB1\*05, dan uji tantang bakteri *A. hydrophila* pada ikan mas yang tidak mempunyai marka (kontrol positif), serta ikan mas yang tidak mempunyai marka yang disuntik dengan PBS (kontrol negatif). Masing-masing perlakuan terdiri atas tiga ulangan.

### Pengambilan sampel darah

*Sampling* dilakukan pada hari ke-0, tiga, tujuh, dan 14 pascainfeksi untuk pengamatan gambaran darah. Setiap kali *sampling*, tiga ekor ikan diambil dari setiap perlakuan. Ikan yang telah diambil darahnya dipisahkan pada akuarium yang berbeda untuk mencegah kemungkinan terambil kembali saat pengamatan pada hari berikutnya. Sebelum pengambilan darah dilakukan, ikan terlebih dahulu dibius menggunakan Arowana *stabilizer* dengan cara mencampurkan 1 mL Arowana *stabilizer* ke dalam 1 L air, kemudian

ikan mas dimasukkan ke dalam wadah tersebut. Setelah itu, dilakukan pengambilan sampel darah. Pengambilan darah dilakukan pada pembuluh vena kaudalis (vena ekor) menggunakan *syringe*. Darah dihisap sampai batas yang diinginkan. Darah yang terambil diberi antikoagulan dengan perbandingan 1:4 dengan jumlah darah yang diambil. Selanjutnya, dilakukan pengamatan terhadap parameter gambaran darah ikan uji.

### Parameter uji

Parameter uji yang diamati dalam penelitian ini meliputi jumlah total sel darah merah, total sel darah putih, hemoglobin, hematokrit, diferensial leukosit, dan tingkat kelangsungan hidup ikan uji pascainfeksi *A. hydrophila*.

### Total sel darah merah

Darah dihisap dengan pipet yang berisi bulir pengaduk warna merah sampai skala 0,5. Lalu ditambahkan larutan Hayem's (berfungsi untuk melisis sel-sel darah putih) sampai skala 101, pengadukan darah di dalam pipet dilakukan dengan mengayunkan tangan yang memegang pipet seperti membentuk angka delapan selama tiga hingga lima menit sehingga darah tercampur rata. Setelah itu tetesan pertama larutan darah dalam pipet dibuang, selanjutnya tetesan berikutnya diteteskan pada hemositometer tipe Neubauer kemudian ditutup dengan gelas penutup. Jumlah sel darah merah dihitung dengan bantuan mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Jumlah total sel darah dihitung pada lima kotak kecil hemositometer, dan jumlahnya dihitung dengan rumus (Blaxhall & Daisley, 1973):

$$SDM = (A/N) \times (1/V) \times Fp$$

Keterangan:

- SDM = jumlah sel darah merah
- A = jumlah sel darah merah terhitung
- N = jumlah kotak hemositometer yang diamati
- V = volume kotak hemositometer yang diamati
- Fp = faktor pengenceran

### Kadar hemoglobin

Kadar hemoglobin (Hb) diukur menurut metode Sahli yaitu dengan mengisi tabung Sahlinometer dengan larutan HCl 0,1 N sampai garis skala paling bawah (skala 10), kemudian ditempatkan di antara dua tabung dengan warna standar. Darah ikan dari tabung Eppendorf diambil dengan pipet Sahli sebanyak

0,02 mL dan dimasukkan ke tabung Sahli dan didiamkan selama tiga menit, sebelumnya ujung pipet dibersihkan terlebih dahulu. Kemudian ditambahkan akuades dengan pipet tetes sedikit demi sedikit dan diaduk sampai berubah warna tepat sama dengan warna standar yang ada dalam Hb meter tersebut. Skala dibaca dengan melihat permukaan cairan dan dicocokkan dengan skala tabung Sahli yang dilihat pada skala jalur g% (kuning) yang berarti banyaknya hemoglobin dalam gram per 100 mL darah.

### Kadar hematokrit

Kadar hematokrit (Ht) diukur dengan memasukkan sampel darah ke dalam tabung mikrohematokrit sampai 2/3 bagian tabung, ujung tabung disumbat dengan cretoceal dan disentrifugasi selama tiga menit dengan kecepatan 8.000 rpm. Darah dihisap dengan tabung mikrohematokrit sampai mencapai ¾ bagian tabung. Kemudian ujung tabung ditutup dengan cretoceal sedalam 1 mm. Lalu tabung mikrohematokrit disentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm selama lima menit dengan posisi tabung yang bervolume sama berhadapan agar putaran sentrifugasi seimbang. Nilai kadar hematokrit ditentukan dengan persentase panjang bagian darah yang mengendap (a) serta panjang total volume darah yang terdapat di dalam tabung (b):  $(a/b) \times 100$ . Kadar hematokrit dinyatakan sebagai % volume padatan sel darah. Kadar hematokrit mencerminkan banyaknya sel darah (digambarkan dengan endapan/padatan) dalam cairan darah.

### Total sel darah putih

Penghitungan total sel darah putih dilakukan dengan cara mengencerkan darah terlebih dahulu dengan menggunakan larutan Turk's. Penambahan larutan Turk's yang bersifat asam akan menyebabkan sel darah merah mengalami lisis sehingga yang tertinggal hanya sel darah putih saja. Pencampuran dilakukan di dalam pipet pencampur berskala maksimum 11. Pipet ini berisi bulir putih berfungsi sebagai pengaduk. Sel darah putih dihitung dengan cara darah dihisap dengan pipet pencampur sampai skala 0,5 dan selanjutnya ditambahkan dengan larutan Turk's. Pipet digoyang membentuk angka delapan selama tiga hingga lima menit agar darah tercampur rata.

Sebelum dilakukan penghitungan, dua tetes pertama dari campuran tersebut dibuang dan tetesan selanjutnya diteteskan pada hemositometer tipe Neubauer dan ditutup dengan

gelas penutup. Jumlah sel darah putih dihitung dengan bantuan mikroskop pada pembesaran 400 kali. Penghitungan dilakukan pada kotak besar hemositometer dengan rumus sebagai berikut (Blaxhall & Daisley, 1973).

$$SDP = (A/N) \times (1/V) \times Fp$$

Keterangan:

SDP = jumlah sel darah putih

A = jumlah sel darah putih terhitung

N = jumlah kotak hemositometer yang diamati

V = volume kotak hemositometer yang diamati

Fp = faktor pengenceran

### Diferensial leukosit

Darah diteteskan pada gelas objek. Selanjutnya gelas objek yang lain diletakkan di atas tetesan darah sampai membentuk sudut sekitar 30°, lalu ditarik sampai darah menyebar sepanjang tepi gelas objek pertama. Setelah itu ulasan darah dikeringudarkan, lalu direndam dalam larutan Giemsa (1:20) selama 15–20 menit. Selanjutnya sampel dibilas akuades dan diamati menggunakan mikroskop (Blaxhall & Daisley, 1973).

### Kelangsungan hidup

Kematian ikan dicatat setiap hari setelah diinfeksi. Tingkat kelangsungan hidup (KH) dihitung masing-masing perlakuan. Perhitungan dilakukan berdasarkan persamaan: kelangsungan hidup (KH) =  $(\text{jumlah total ikan akhir} / \text{jumlah total ikan awal}) \times 100$ .

### Gejala klinis

Pengamatan terhadap gejala klinis dilakukan secara deskriptif selama 14 hari pascainfeksi *A. hydrophila*, meliputi hiperemia, radang, hemoragi, nekrosis, dan tukak. Ikan yang menunjukkan gejala klinis infeksi *A. hydrophila* dipisahkan untuk mempermudah pengamatan proses *recovery*.

### Analisis data

Data gambaran darah dan tingkat kelangsungan hidup yang diperoleh dianalisis menggunakan *software* SPSS 13 dan ditampilkan dalam bentuk tabel atau gambar. Data tersebut dianalisis dengan cara membandingkan setiap parameter yang sama, pada waktu pengamatan yang sama, antara ikan mas yang membawa marka molekuler Cyca-DAB1\*05 dengan ikan mas tanpa marka.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil

#### Gambaran darah

Pengamatan terhadap total sel darah merah (Gambar 1) menunjukkan bahwa antara ikan yang membawa marka molekuler dan ikan mas tanpa marka secara statistik tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ). Sel darah merah total ikan mas yang membawa marka molekuler pada hari ke-0 berada pada nilai  $1,56\pm 0,20 \times 10^6$  sel/mm<sup>3</sup>, sedangkan ikan mas tanpa marka sebesar  $1,16\pm 0,47 \times 10^6$  sel/mm<sup>3</sup>. Pada hari ketiga sel darah merah total menurun, baik pada ikan mas yang membawa marka molekuler maupun ikan tanpa marka. Sel darah merah total ikan mas yang membawa marka molekuler  $1,38\pm 0,21 \times 10^6$  sel/mm<sup>3</sup>, dan ikan mas tanpa marka sebesar  $0,85\pm 0,30 \times 10^6$  sel/mm<sup>3</sup>. Hari ketujuh, jumlah sel darah merah total menurun, pada ikan yang membawa marka molekuler  $1,14\pm 0,26 \times 10^6$  sel/mm<sup>3</sup>, dan pada ikan mas tanpa marka  $0,76\pm 0,22 \times 10^6$  sel/mm<sup>3</sup>. Pada pengamatan hari ke-14 menunjukkan peningkatan sel darah merah total, baik pada ikan mas yang membawa marka molekuler maupun ikan mas tanpa marka. Sel darah merah total ikan mas yang membawa marka molekuler sebesar  $1,17\pm 0,06 \times 10^6$  sel/mm<sup>3</sup>, sedangkan pada ikan mas tanpa marka sebesar  $0,90\pm 0,19 \times 10^6$  sel/mm<sup>3</sup>.

Hemoglobin pada ikan mas (Gambar 2) yang membawa marka molekuler pada hari ke-0 ( $7,77\pm 0,15$  g%) dan hari ketiga ( $7,20\pm 0,53$  g%) adalah sama, dan kedua-duanya lebih tinggi ( $P<0,05$ ) dibanding ikan mas tanpa marka (hari ke-0:  $5,7\pm 0,06$  g%; hari ketiga:  $5,60\pm 0,20$  g%). Hasil uji statistik menunjukkan bahwa nilai hemoglobin pada hari ketiga pascainfeksi, berbeda nyata antara ikan mas yang membawa marka molekuler dan ikan mas tanpa marka. Hari ketujuh kembali terjadi penurunan nilai hemoglobin,  $6,00\pm 1,44$  g% (ikan mas yang membawa marka molekuler),  $3,93\pm 1,03$  g% (ikan mas tanpa marka). Pengamatan hari ke-14 menunjukkan terjadinya peningkatan kadar hemoglobin pada ikan mas yang membawa marka molekuler sebesar  $7,13\pm 1,10$  g%. Demikian halnya pada ikan mas tanpa marka, terjadi peningkatan kadar hemoglobin sebesar  $4,93\pm 0,64$  g%.

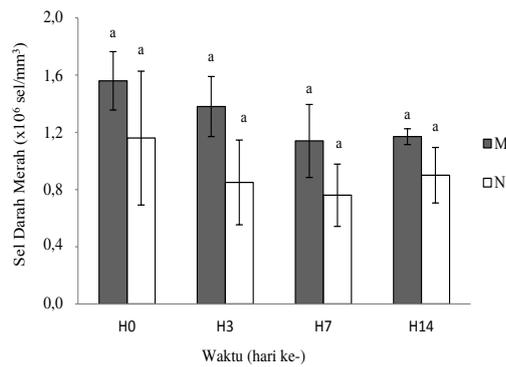
Hasil uji statistik pada nilai hematokrit (Gambar 3) tidak berbeda nyata antara ikan mas yang membawa marka molekuler dengan ikan tanpa marka. Nilai hematokrit hari ke-0 pada ikan mas yang membawa marka molekuler sebesar  $30,04\pm 2,86\%$ , sedangkan pada ikan

mas tanpa marka sebesar  $38,40\pm 6,41\%$ . Pada hari ketiga terjadi penurunan nilai hematokrit, baik pada ikan mas yang membawa marka molekuler maupun pada ikan mas tanpa marka. Pada ikan mas yang membawa marka molekuler sebesar  $27,55\pm 4,57\%$ , sedangkan ikan mas tanpa marka sebesar  $24,11\pm 5,48\%$ . Pengamatan hari ketujuh masih menunjukkan penurunan nilai hematokrit pada ikan mas yang membawa marka molekuler, dengan nilai sebesar  $19,69\pm 8,03\%$ . Penurunan nilai hematokrit juga terjadi pada ikan mas tanpa marka,  $16,36\pm 4,28\%$ . Hari ke-14, terjadi peningkatan kadar hematokrit pada ikan mas yang membawa marka molekuler dengan nilai  $23,52\pm 5,02\%$ . Akan tetapi, pada ikan mas yang tidak memiliki marka, penurunan kadar hematokrit masih terjadi dengan nilai  $14,32\pm 3,99\%$ .

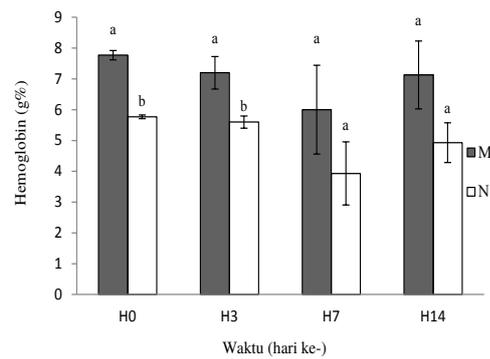
Total sel darah putih ikan mas (Gambar 4) yang membawa marka molekuler pada hari ke-0 sebesar  $5,75\pm 0,66 \times 10^4$  sel/mm<sup>3</sup> lebih tinggi ( $P<0,05$ ) daripada ikan mas tanpa marka sebesar  $4,5\pm 0,25 \times 10^4$  sel/mm<sup>3</sup>. Selanjutnya, total sel darah putih ikan mas membawa marka cenderung meningkat hingga hari ketujuh, kemudian menurun pada hari ke-14. Hasil uji statistik menunjukkan pada hari ketujuh pascainfeksi, total sel darah putih pada ikan mas yang membawa marka molekuler berbeda nyata terhadap ikan mas tanpa marka. Pada pengamatan hari ke-14 total sel darah putih menurun, baik pada ikan mas yang membawa marka molekuler maupun ikan mas tanpa marka.

Pengamatan terhadap parameter diferensial leukosit meliputi persentase limfosit, monosit dan neutrofil menunjukkan hasil yang berbeda nyata pada limfosit (Gambar 5) dan monosit (Gambar 6) pada hari ketiga pascainfeksi, sedangkan pada neutrofil tidak menunjukkan hasil yang berbeda nyata selama masa infeksi. Pada hari ke-0 persentase limfosit, monosit dan neutrofil pada ikan uji yang membawa marka molekuler secara berurutan  $97,67\pm 1,15\%$ ;  $1,33\pm 1,53\%$ ;  $1\pm 1\%$  sedangkan pada ikan mas tanpa marka adalah  $95,67\pm 0,58\%$ ;  $1,67\pm 0,58\%$ ;  $2,67\pm 1,15\%$  (Gambar 5, 6, dan 7).

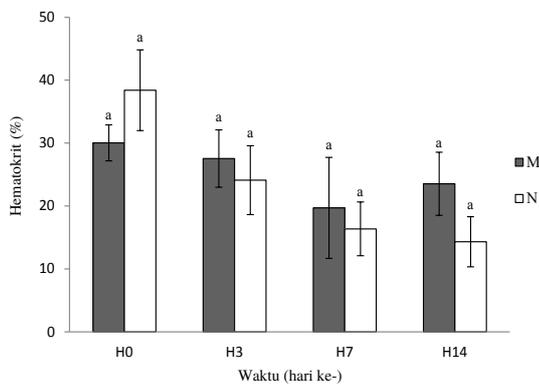
Pada hari ketiga pascainfeksi, peningkatan persentase monosit baik pada ikan mas yang membawa marka molekuler maupun ikan mas tanpa marka terjadi, dan berbeda nyata secara statistik ( $P<0,05$ ). Persentase neutrofil juga mengalami peningkatan baik pada ikan mas yang membawa marka molekuler maupun ikan mas tanpa marka, namun tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ). Pada ikan mas yang membawa marka



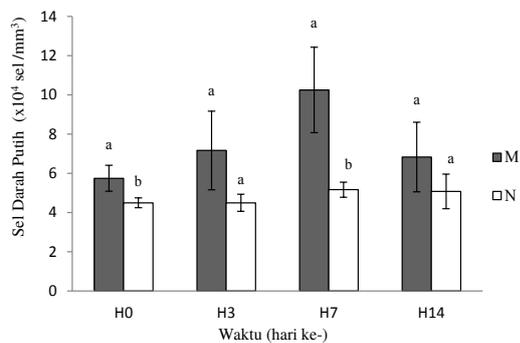
Gambar 1. Total sel darah merah ikan mas yang membawa marka molekuler Cyca-DAB1\*05 (M) dan tanpa marka (N) pascainfeksi *Aeromonas hydrophila*. Huruf yang berbeda pada bagian atas garis simpangan baku menunjukkan hasil yang berbeda nyata ( $P < 0,05$ ).



Gambar 2. Kadar hemoglobin ikan mas yang membawa marka molekuler Cyca-DAB1\*05 (M) dan tanpa marka (N) pascainfeksi *Aeromonas hydrophila*. Huruf yang berbeda pada bagian atas garis simpangan baku menunjukkan hasil yang berbeda nyata ( $P < 0,05$ ).



Gambar 3. Nilai hematokrit ikan mas yang membawa marka molekuler Cyca-DAB1\*05 (M) dan tanpa marka (N) pascainfeksi *Aeromonas hydrophila*. Huruf yang berbeda pada bagian atas garis simpangan baku menunjukkan hasil yang berbeda nyata ( $P < 0,05$ ).



Gambar 4. Total sel darah putih ikan mas yang membawa marka molekuler Cyca-DAB1\*06 (M) dan tanpa marka (N) pascainfeksi *Aeromonas hydrophila*. Huruf yang berbeda pada bagian atas garis simpangan baku menunjukkan hasil yang berbeda nyata ( $P < 0,05$ ).

molekuler persentase monosit dan neutrofil sebesar  $6,33 \pm 0,58\%$ ;  $12 \pm 3\%$ ; dan pada ikan mas tanpa marka  $10,67 \pm 1,15\%$ ;  $17,67 \pm 2,52\%$ . Sebaliknya, persentase limfosit menurun di hari ketiga pascainfeksi, dan berbeda nyata secara statistik ( $P < 0,05$ ). Pada ikan mas yang membawa marka molekuler  $81,67 \pm 3,06\%$ , dan pada ikan mas tanpa marka  $71,67 \pm 2,52\%$ .

Pada hari ketujuh pascainfeksi, persentase monosit dan neutrofil kembali meningkat. Pada ikan mas yang membawa marka molekuler persentase sel monosit dan neutrofil sebesar  $23,33 \pm 0,58\%$ ;  $27,67 \pm 1,15\%$ ; dan pada ikan mas tanpa marka  $21,33 \pm 3,06\%$ ;  $22,33 \pm 4,16\%$  (secara statistik tidak berbeda nyata). Persentase limfosit kembali menurun (tidak berbeda nyata secara statistik), pada ikan mas yang membawa marka molekuler persentase limfosit sebesar  $49 \pm 1\%$ ,

dan pada ikan mas tanpa marka  $56,33 \pm 6,11\%$ . Pada hari ke-14 pascainfeksi, terjadi penurunan persentase monosit dan neutrofil. Meskipun mengalami penurunan, namun secara statistik persentase monosit dan neutrofil antara ikan yang mempunyai marka dengan yang tanpa marka pada hari pengamatan yang sama tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ). Pada ikan mas yang membawa marka molekuler persentase monosit dan neutrofil secara berurutan yaitu  $19 \pm 1\%$  dan  $20,00 \pm 1,73\%$ . Pada ikan mas tanpa marka  $19 \pm 2\%$  dan  $19,33 \pm 1,53\%$ . Sebaliknya, persentase limfosit meningkat baik pada ikan mas yang membawa marka molekuler maupun ikan mas tanpa marka, namun tidak berbeda nyata secara statistik. Pada ikan mas yang membawa marka molekuler persentase limfosit sebesar  $61,00 \pm 2,00\%$ , dan pada ikan mas tanpa marka  $61,67 \pm 1,53\%$ .

*Kelangsungan hidup*

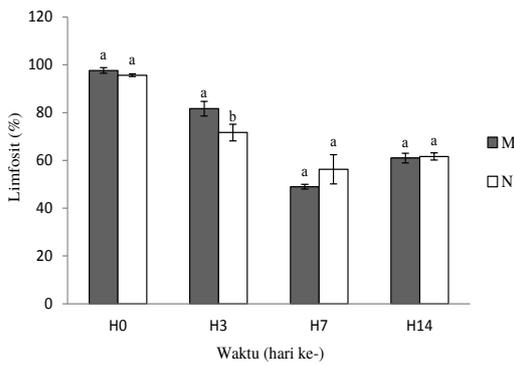
Persentase kelangsungan hidup ikan mas (Gambar 8) yang membawa marka molekuler mencapai  $37,78 \pm 5,09\%$ , sedangkan pada ikan mas tanpa marka sebesar  $14,45 \pm 3,85\%$  pada akhir percobaan (hari ke-14). Hasil uji statistik menunjukkan tingkat kelangsungan hidup ikan mas yang membawa marka molekuler berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap ikan mas tanpa marka (Gambar 9).

**Pembahasan**

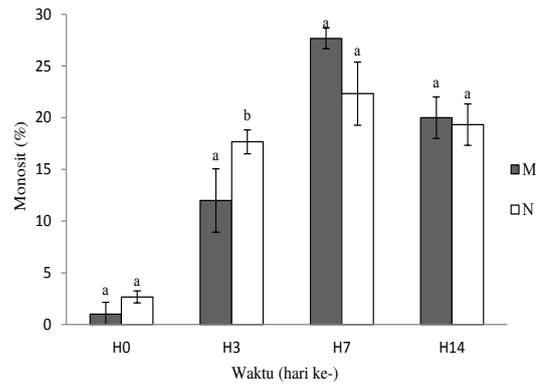
Berdasarkan hasil pengamatan terhadap seluruh aspek gambaran darah pada hari ke-0, tidak ada perbedaan nyata secara statistik antara ikan mas yang membawa marka molekuler dengan ikan mas tanpa marka, kecuali pada hemoglobin dan total sel darah putih. Pada ikan

sehat jumlah sel darah putih umumnya lebih rendah dibandingkan sel darah merah. Tingginya jumlah sel darah merah diikuti oleh tingginya persentase hematokrit dan hemoglobin. Adanya perbedaan pada hari ke-0 tersebut diduga karena marka Cyca-DAB1\*05 yang dibawa oleh ikan mas, sehingga ikan mas yang membawa marka memiliki kesiapan imunitas yang lebih baik daripada ikan mas tanpa marka.

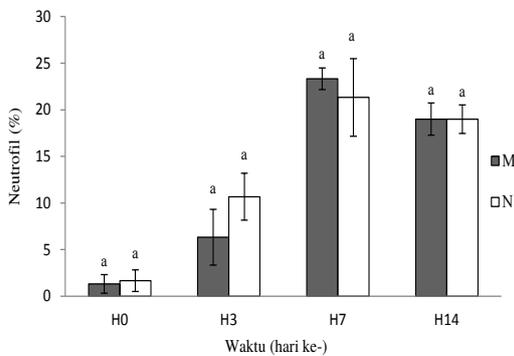
Hasil pemeriksaan gambaran darah hari ketiga menunjukkan adanya penurunan jumlah sel darah merah, hemoglobin dan hematokrit baik pada ikan mas yang membawa marka molekuler maupun ikan mas tanpa marka. Penurunan jumlah sel darah merah, hemoglobin dan hematokrit tersebut terjadi akibat adanya infeksi oleh *A. hydrophila*. Menurut Bailone *et al.*, (2010), terjadinya penurunan jumlah sel darah



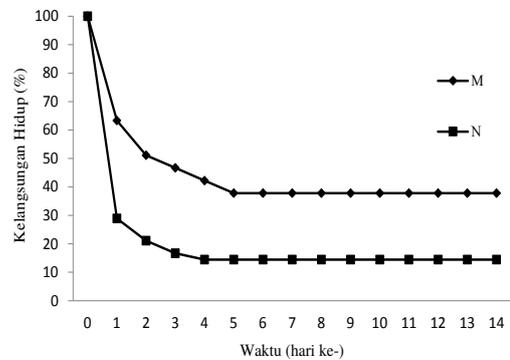
Gambar 5. Persentase limfosit pada ikan mas yang membawa marka molekuler Cyca-DAB1\*05 (M) dan tanpa marka (N) pascainfeksi *Aeromonas hydrophila*. Huruf yang berbeda pada bagian atas garis simpangan baku menunjukkan hasil yang berbeda nyata ( $P < 0,05$ ).



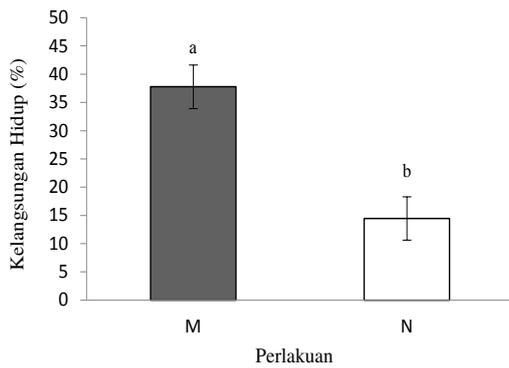
Gambar 6. Persentase monosit pada ikan mas yang membawa marka molekuler Cyca-DAB1\*05 (M) dan tanpa marka (N) pascainfeksi *Aeromonas hydrophila*. Huruf yang berbeda pada bagian atas garis simpangan baku menunjukkan hasil yang berbeda nyata ( $P < 0,05$ ).



Gambar 7. Persentase neutrofil pada ikan mas yang membawa marka molekuler Cyca-DAB1\*05 (M) dan tanpa marka (N) pascainfeksi *Aeromonas hydrophila*. Huruf yang berbeda pada bagian atas garis simpangan baku menunjukkan hasil yang berbeda nyata ( $P < 0,05$ ).



Gambar 8. Kurva kelangsungan hidup ikan mas selama percobaan yang membawa marka molekuler Cyca-DAB1\*05 (M) dan tanpa marka (N).



Gambar 9. Kelangsungan hidup ikan mas yang membawa marka molekuler Cyca-DAB1\*05 (M) dan tanpa marka (N) pada akhir ujiantang. Huruf yang berbeda pada bagian atas garis simpangan baku menunjukkan hasil yang berbeda nyata ( $P < 0,05$ ).

merah dan kadar hemoglobin dapat disebabkan oleh infeksi agen bakteri. Cook *et al.* (2011) menyatakan bahwa nilai hematokrit di bawah 30 % menunjukkan defisiensi sel darah merah. Selain itu, kemampuan bakteri *A. hydrophila* dalam menghasilkan eksotoksin yang dapat melisis sel darah merah menjadi salah satu faktor penyebab menurunnya sel darah total. Rey *et al.* (2009), menyatakan bahwa bakteri *A. hydrophila* menghasilkan eksotoksin berupa hemolisin yaitu enzim yang mampu melisis sel-sel darah merah dan membebaskan hemoglobinya. Sebaliknya, jumlah sel darah putih ikan mengalami peningkatan pada hari ketiga pascainfeksi. Meningkatnya jumlah sel darah putih sebagai respons pertahanan tubuh ikan untuk melawan infeksi yang disebabkan oleh *A. hydrophila*. Sel darah putih merupakan salah satu komponen darah yang aktif di dalam sistem pertahanan tubuh dan berfungsi sebagai pertahanan nonspesifik yang dapat menghancurkan patogen melalui proses fagositosis.

Menurut Priyatna *et al.* (2011), peningkatan jumlah sel darah putih (leukosit) dapat dijadikan petunjuk adanya fase pertama infeksi maupun stres. Peningkatan jumlah sel darah putih disebabkan oleh peningkatan aktivitas pembelahan sel darah putih, karena sel darah putih berperan dalam eliminasi patogen yang masuk ke tubuh melalui proses fagositosis. Sel darah putih memainkan peranan penting pada ikan dan terlibat dalam sistem pertahanan tubuh organisme di bawah beberapa kondisi seperti stres, peradangan, dan serangan parasit (Silveira-Coffigni *et al.*, 2004; Azevedo *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2006; Daneshvar *et al.*, 2012).

Pada hari ketujuh pascainfeksi, belum ditemukan peningkatan pada sel darah merah total, hemoglobin dan hematokrit. Sebaliknya, jumlah sel darah putih, monosit dan neutrofil mencapai nilai yang tertinggi (Gambar 6 dan 7). Peningkatan ini diduga karena meningkatnya respons imun nonspesifik dalam melawan infeksi yang disebabkan oleh *A. hydrophila*. Lorenzen dan La Patra (2005), menyatakan bahwa proteksi dari sistem imun nonspesifik bekerja pada stadia awal infeksi antara hari keempat sampai hari ke-8. Peningkatan jumlah monosit dan neutrofil tersebut diduga sebagai respons sistem imun nonspesifik dalam melawan serta mengeliminasi patogen. Monosit dan neutrofil berperan sebagai sel fagosit (APC) yang dapat menghancurkan patogen. Menurut Ardó (2010), sel fagosit merupakan komponen seluler yang paling penting dari sistem kekebalan tubuh bawaan ikan. Aktivitas fagositosis merupakan mekanisme pertahanan primordial dan karakteristik penting dari sistem kekebalan tubuh nonspesifik. Antigen yang telah diproses oleh sel-sel fagosit kemudian dipresentasikan oleh molekul MHC II kepada sel T, untuk diproses (dikenali) hingga terbentuk antibodi (imunitas spesifik).

Pada hari ke-14, jumlah sel darah putih menurun saering dengan menurunnya persentase monosit dan neutrofil. Penurunan tersebut diduga disebabkan mulai menurunnya aktivitas imun nonspesifik pasca hari ketujuh, dan perannya digantikan oleh imunitas spesifik (antibodi). Antibodi terbentuk pascapresentasi antigen asing melalui molekul yang terdapat pada sel-sel *antigen presenting cells* (APC) yaitu makrofag, selanjutnya akan memberi sinyal kepada limfosit B untuk melakukan proliferasi dan menghasilkan antibodi. Menurut Kollner *et al.* (2002), antibodi diproduksi oleh limfosit B setelah distimulasi oleh peptida antigen yang dipresentasikan melalui molekul MHC II yang terdapat pada sel-sel APC. Antibodi yang terbentuk akan merangsang sel-sel fagosit untuk menghancurkan patogen asing yang menginfeksi. Molekul MHC kelas II menyajikan peptida patogen dan menstimulus limfosit B untuk memproduksi antibodi, yang mengaktifasi sel fagositik, dan aktivasi sifat imunologi yang terlibat dalam eliminasi parasit dan bakteri serta netralisasi virus (Wegner, 2008; Moulana *et al.*, 2008; Rakus *et al.*, 2009). Eliminasi patogen yang dilakukan oleh sistem imun selanjutnya berpengaruh terhadap peningkatan laju penutupan luka (*recovery*). Proses pemulihan mulai terlihat antara hari ketujuh dan kedelapan, yang ditandai

dengan berkurangnya gejala klinis pascainfeksi serta terbentuknya jaringan baru pada bagian luka, mulai terjadi peningkatan jumlah eritrosit, hemoglobin dan hematokrit pada ikan mas yang membawa marka molekuler. Akan tetapi, pada ikan mas tanpa marka hanya jumlah eritrosit dan hemoglobin saja yang meningkat. Hematokrit pada ikan mas tanpa marka masih lebih rendah dibandingkan hari ketujuh. Hal ini diduga akibat ukuran ikan yang diamati pada hari ke-14 lebih kecil dibandingkan pada hari ketujuh. Peningkatan jumlah eritrosit, hemoglobin dan hematokrit tersebut mengindikasikan bahwa sistem pertahanan spesifik ikan mulai bekerja.

Secara umum gejala klinis yang terlihat pada ikan mas yang terinfeksi *A. hydrophila* dimulai dengan timbulnya hiperemia (warna kemerahan) di sekitar lokasi penyuntikan. Gejala klinis terlihat baik pada ikan mas membawa marka maupun tanpa marka. Hiperemia ini diawali dengan pembengkakan pada hari pertama pascainfeksi yang kemudian diikuti dengan peradangan dan hemoragi, lalu berkembang menjadi nekrosis (kerusakan jaringan) dan akhirnya menjadi tukak/ulcer (Gambar 10). Kematian ikan terjadi satu hari pascainfeksi, saat tahap peradangan dan tahap nekrosis hingga menjadi tukak. Hari pertama pascainfeksi terlihat adanya peradangan pada sebagian besar ikan baik ikan mas yang membawa marka molekuler maupun ikan mas tanpa marka di bagian lokasi penyuntikan, penurunan nafsu makan, adanya hemoragi pada daerah sekitar lokasi penyuntikan, serta tingkat kematian pada ikan mas tanpa marka mencapai 73% dan pada ikan mas dengan marka molekuler sebesar 62%.

Pada hari kedua, pergerakan renang kurang aktif, nekrosis pada bagian yang mengalami peradangan, ikan yang sakit lebih banyak berenang di dasar akuarium, serta kematian beberapa ekor ikan. Enzim eksotoksin dari *A. hydrophila* seperti protease dan elastase diduga menyebabkan kerusakan pada permukaan tubuh ikan mas yang terinfeksi, karena pada jaringan otot dan saluran pembuluh darah terdapat banyak kandungan protein. Ketika terjadi kerusakan pada pembuluh darah akibat eksotoksin, maka darah akan keluar dari pembuluh darah dan menyebabkan hemoragi pada permukaan tubuh. Efek dari eksotoksin yang berkelanjutan akan meningkatkan kematian sel pada jaringan otot sehingga menyebabkan nekrosis pada permukaan tubuh (Gambar 10).

Pengamatan gejala klinis menunjukkan di hari ketiga, terdapat luka terbuka (tukak/ulcer) pada daerah sekitar lokasi penyuntikan yang diikuti

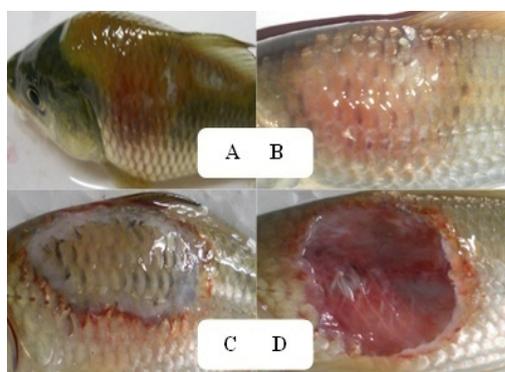
dengan hemoragi. Hari kelima, kematian beberapa ekor ikan khususnya ikan mas yang membawa marka molekuler, sedangkan pada ikan mas tanpa marka tidak ditemukan ikan yang mati. Pada hari kelima ikan mas yang membawa marka molekuler mulai menunjukkan proses penutupan luka yang ditandai dengan hilangnya bagian nekrosis serta berkurangnya hemoragi di sekitar luka. Pada ikan mas tanpa marka masih belum menunjukkan tanda-tanda penutupan luka seperti halnya pada ikan mas yang mempunyai marka molekuler. Adanya penutupan luka tersebut disebabkan karena mulai bekerjanya sistem imun khususnya imunitas nonspesifik pada ikan. Lorenzen dan La Patra (2005), menyatakan bahwa proteksi dari sistem imun nonspesifik bekerja pada stadia awal infeksi antara hari keempat sampai hari kedelapan.

Pada hari ketujuh dan kedelapan, luka pada ikan mulai mengalami proses pemulihan, terutama pada ikan mas yang membawa marka molekuler, tetapi tidak dilakukan penghitungan jumlah individu dan kecepatan pemulihan. Adanya proses penyembuhan luka tersebut ditandai dengan hilangnya hemoragi yang terdapat disekitar luka, serta mulai terbentuknya jaringan baru pada luka. Sedangkan pada ikan mas tanpa marka molekuler proses penyembuhan luka baru terjadi pada hari kesembilan, dengan ciri-ciri yang sama pada ikan mas yang membawa marka molekuler. Perbedaan kecepatan pemulihan luka tersebut diduga karena ikan mas yang mempunyai marka molekuler tersebut memiliki kecepatan regenerasi sel yang lebih tinggi dibandingkan ikan mas tanpa marka (Gambar 11). Kecepatan regenerasi sel sangat ditentukan oleh tingkat imunitas ikan terhadap infeksi patogen. Kemampuan sistem imun pada ikan mas yang membawa marka molekuler dalam mempresentasikan peptida asing jauh lebih baik sehingga berdampak pada peningkatan kemampuan tubuh untuk memproduksi antibodi sehingga mampu menetralkan dan membunuh antigen dan mempercepat laju penutupan luka. Menurut Kollner *et al.*, (2002), antigen spesifik antibodi disekresikan oleh limfosit B setelah presentasi peptida antigen asing oleh makrofag melalui molekul MHC kelas II.

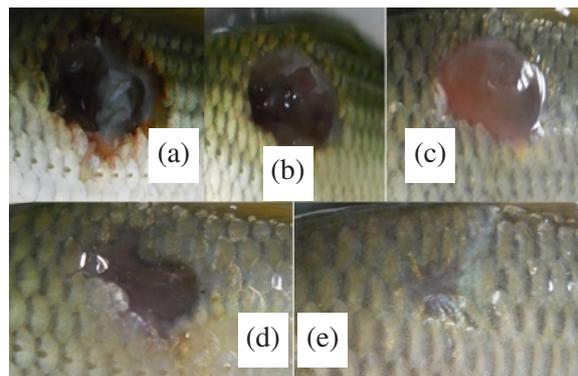
Tingkat kelangsungan hidup ikan mas pada akhir pengamatan menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan antara ikan mas yang membawa marka molekuler dengan ikan mas tanpa marka (Gambar 9). Secara statistik, tingkat kelangsungan hidup ikan mas yang membawa marka molekuler berbeda nyata dengan ikan mas

tanpa marka. Rendahnya kelangsungan hidup ikan tanpa marka diduga karena selama masa infeksi kemampuan ikan dalam memproduksi antibodi sangat rendah, sehingga ikan lebih banyak mengandalkan pada kemampuan imunitas bawaan (imun nonspesifik) untuk melawan infeksi patogen. Hal berbeda terjadi pada ikan mas yang membawa marka molekuler. Ikan dengan marka molekuler memiliki tingkat kelangsungan hidup dua kali lebih baik. Hal ini diduga karena marka molekuler yang terdapat pada ikan mas tersebut mampu menstimulasi kekebalan tubuh khususnya untuk memproduksi antibodi melalui limfosit B, sehingga berdampak pada peningkatan daya tahan tubuh dalam menanggapi adanya infeksi oleh patogen.

Limfosit adalah sel darah yang bertanggung jawab untuk produksi antibodi terhadap infeksi bakterial maupun viral. Perera dan Pathiratne (2008) menyatakan fungsi utama dari limfosit ikan bertindak sebagai sel-sel sistem kekebalan tubuh spesifik melalui produksi antibodi. Antibodi yang dihasilkan tersebut selanjutnya akan merangsang sel-sel fagosit dalam proses fagositosis. Terbentuknya antibodi spesifik dimulai dari masuknya suatu antigen ke dalam tubuh ikan, kemudian antigen tersebut difagosit oleh makrofag. Selanjutnya makrofag mengirim pesan ke limfosit sehingga memberikan respons melalui proliferasi dan memproduksi antibodi yang spesifik sesuai dengan antigen yang memberikan rangsangan. Sistem pertahanan tersebut disamping menghancurkan patogen juga akan mengaktifkan sistem memori, sehingga apabila ada serangan kembali oleh patogen yang sama akan direspons lebih cepat dari serangan pertama.



Gambar 10. Gejala klinis pascainfeksi dengan *Aeromonas hydrophila* baik pada ikan mas yang membawa marka molekuler Cyca-DAB1\*05 maupun tanpa marka (A dan B: radang pada lokasi suntik + hemoragi; C: nekrosis/kerusakan jaringan; D: tukak/ulcer).



Gambar 11. Proses penutupan luka pada ikan mas yang membawa marka molekuler Cyca-DAB1\*05 pascainfeksi dengan *Aeromonas hydrophila*. (a) tukak/ulcer + hemoragi, (b) tukak tanpa hemoragi, (c) terbentuknya jaringan baru, (d) luka mulai menutup, (e) luka hampir menutup seluruhnya. Tanda panah menunjukkan bagian yang mengalami proses *recovery*.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisis gambaran darah pascainfeksi *A. hydrophila*, ikan mas F3 yang membawa marka molekuler Cyca-DAB1\*05 memiliki respons imun dan tingkat kelangsungan hidup yang lebih baik dibandingkan ikan mas tanpa marka.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alimuddin, Mubinun, Santika A, Carman O, I. Faizal I, Sumantadinata K. 2011. Identification of Majalaya common carp strain resistant to KHV infection using Cyca-DAB1\*05 allele as the marker. *Indonesian Aquaculture Journal* 6: 157–163.
- Ardó L, Jeney Z, Adams A, Jeney G. 2010. Immune responses of resistant and sensitive common carp families following experimental challenge with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology* 29: 111–116.
- Azevedo TMP, Martins ML, Bozzo FR, Moraes FR. 2006. Haematological and gill responses in parasitized tilapia from Valley of Tijucas River, SC, Brazil. *Scientia Agricola* 63: 115–120.
- Bailone RL, Martins ML, Mouriño JLP, Vieira FN, Pedrotti FS, Nunes GC, Silva BC. 2010. Hematology and agglutination titer after polyvalent immunization and subsequent challenge with *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Archivos de Medicina Veterinaria* 42: 221–227.
- Blaxhall PC, Daisley KW. 1973. Routine haematological methods for use with fish

- blood. *Journal of Fish Biology* 5: 577–581.
- Cook DG, Wells RMG, Herbert NA. 2011. Anaemia adjusts the aerobic physiology of snapper *Pagrus auratus* and modulates hypoxia avoidance behaviour during oxygen choice presentations. *The Journal of Experimental Biology* 214: 2.927–2.934.
- Daneshvar E, Ardestani MY, Dorafshan S, Martins MC. 2012. Hematological parameters of Iranian cichlid *Iranocichla hormuzensis* Coad, 1982 (Perciformes) in Mehran River. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 84: 943–949.
- Faridah N, Santika A, Sucipto A, Yanti DH, Ciptoroso, Alimuddin. 2014. Daya tahan ikan mas Majalaya keturunan kedua yang membawa marka molekuler Cyca-DAB1\*05 terhadap infeksi *Aeromonas hydrophila* dan KHV. Seminar Nasional Bioteknologi Akuakultur, IICC IPB Bogor. 11 September 2014.
- Gilad O, Yun S, Adkison MA, Way K, Willits NH, Bercovier H, Hedrick RP. 2003. Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. *Journal of General Virology* 84: 2.661–2.668.
- Kollner B, Wasserrab B, Kotterba G, Fischer U. 2002. Evaluation of immune functions of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: how can environmental influences be detected? *Toxicology Letters* 131: 83–95.
- Lorenzen N, La Patra SE. 2005. DNA vaccine for aquaculture fish. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 24: 201–213.
- Martins ML, Tavares-Dias M, Fujimoto RY, Onaka EM, Nomura DT. 2004. Haematological alterations of *Leporinus macrocephalus* (Osteichthyes: Anostomidae) naturally infected by *Goezia leporini* (Nematoda: Anisakidae) in fish pond. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science)* 56: 640–646.
- Moulana M, Evenhuis J, Albertino M, Godwin U, Kountikov EI, Stuge TB, Wilson M, Bengten E, Miller NW, Mc Connell TJ. 2008. Characterization of anti-channel catfish MHC class II $\beta$  monoclonal antibodies. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 44: 111–119.
- Mu X, Pridgeon JW, Klesius PH. 2011. Transcriptional profiles of multiple genes in the anterior kidney of Channel catfish vaccinated with an attenuated *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology* 31: 1.162–1.172.
- Nuryati S, Kuswardani Y, Hadiroseyani Y. 2006. Pengaruh pemberian resin lebah terhadap gambaran darah ikan koki *Carassius auratus* yang terinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Akuakultur Indonesia* 5: 191–199.
- Perera HACC, Pathiratne A. 2008. Enhancement of Immune Responses in Indian Carp, *Catla catla*, Following Administration of Levamisole by Immersion. In: Bondad-Reantaso MG, Mohan CV, Crumlish M, Subasinghe RP (eds.). *Diseases in Asian Aquaculture VI*. Manila: Asian Fisheries Society. Hlm. 129–142.
- Popma T, Masser M. 1999. *Tilapia Live History and Biology*. Texas: SRAC Publication, United States Department of Agriculture.
- Pridgeon JW, Aksoy M, Klesius PH, Li Y, Mua X, Srivastava K, Reddy G. 2011. Identification and expression profiles of multiple genes in Nile tilapia in response to bacterial infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 144: 111–119.
- Pridgeon JW dan Klesius PH. 2011. Virulence of *Aeromonas hydrophila* to Channel catfish *Ictalurus punctatus* fingerlings in the presence and absence of bacterial extracellular products. *Diseases of Aquatic Organisms* 95: 205–215.
- Priyatna R, Indarjulianto S, Kurniasih. 2011. Infeksi *Aeromonas salmonicida* dari berbagai wilayah di Indonesia pada ikan mas *Cyprinus carpio*. *Biota* 16: 287–297.
- Rakus KŁ, Wiegertjes GF, Adamk M, Siwicki AK, Lepa A, Irnazarow I. 2009. Resistance of common carp *Cyprinus carpio* L. to Cyprinid herpesvirus-3 is influenced by major histocompatibility (MH) class II B gene polymorphism. *Fish and Shellfish Immunology* 26: 737–743.
- Rakus KŁ. 2008. Major histocompatibility (MH) polymorphism of common carp. Link with disease resistance [Disertasi]. Wageningen, Netherland: Wageningen University.
- Rey A, Verján N, Ferguson HW, Iregui C. 2009. Pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* strain KJ99 infection and its extracellular products in two species of fish. *Veterinary Record* 164: 493–499.
- Satheeshkumar P, Ananthan G, Kumar GS, Jagadeesan L. 2012. Haematology and biochemical parameters of different feeding behaviour of teleost fishes from Vellar estuary, India. *Comparative Clinical Pathology* 21:

1.187–1.191.

Silveira CR, Prieto TA, Ascencio VF. 2004.

Effects of different stressors in haematological variables in cultured *Oreochromis aureus* S.

Comparative Biochemistry and Physiology 139: 245–250.

Uribe C, Folch H, Enriquez R, Moran G. 2011.

Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. Veterinari Medicina 56: 486–503.

Wegner KM. 2008. Historical and contemporary selection of teleost MHC genes: did we leave the past behind? Journal of Fish Biology 73: 2.110–2.132.