

APLIKASI DAN EFEKTIVITAS VAKSIN ANTI PARASIT PADA PEMBENIHAN IKAN KERAPU PASIR (*Epinephelus corallicola*) DI HATCHERI

Fris Johnny¹⁾, Des Roza¹⁾, dan Zafran¹⁾

ABSTRAK

Penyakit investasi parasit merupakan penyakit investasi yang sering diabaikan, padahal investasi parasit merupakan salah satu masalah serius dalam produksi ikan laut di Indonesia. Suatu penelitian untuk aplikasi dan menguji efektivitas vaksin inaktif terhadap parasit telah dilakukan di Laboratorium Patologi, Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol-Bali. Benih ikan kerapu pasir disuntik secara intraperitoneal dengan vaksin anti parasit inaktif dengan dua konsentrasi, yaitu (A). 0,1 mL/ekor (100 µg vaksin/ekor ikan); (B). 0,1 mL/ekor (10 µg vaksin/ekor ikan); dan (C). tanpa perlakuan vaksin hanya disuntik dengan 0,1 mL PBS/ekor (kontrol). Penyuntikan ulang (*booster*) dilakukan 15 hari pasca penyuntikan pertama. Efektivitas vaksin dievaluasi melalui ujiantang ikan yang divaksin dan kontrol dengan menginfeksi parasit *Benedenia* hidup. Daya imunogenisitas dievaluasi setiap 10 hari selama 30 hari pemeliharaan dengan mengukur titer antibodi ikan yang divaksin dibandingkan dengan ikan yang tidak divaksin. Hasil uji tangant menunjukkan bahwa sintasan ikan yang divaksin lebih tinggi (100,00% dan 98,89%) daripada kontrol (88,89%). Titer antibodi kelompok ikan yang divaksin juga lebih tinggi (1:32 dan 1:16) dibanding kontrol (1:2). Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa vaksin parasit inaktif mampu meningkatkan kekebalan ikan kerapu pasir terhadap infeksi parasit *Benedenia*.

ABSTRACT: *Application and effectiveness of antiparasite vaccine on coral grouper, Epinephelus corallicola at hatchery. By: Fris Johnny, Des Roza, and Zafran*

Parasite infestation is one of serious problems that have to be faced in marine fish culture in Indonesia. Mass mortality may occur when fish are infected with this disease. Experiment with aim to evaluate effectiveness of inactivated vaccine against parasite has been conducted at Fish Pathology Laboratory of Research Institute for Mariculture, Gondol-Bali. The juveniles of coral grouper, Epinephelus corallicola were intraperitoneally injected with inactivated vaccine against parasite (A). 0.1 mL/fish (100 µg vaccine/fish), (B). 0.1 mL/fish (10 µg vaccine/fish), and (C). 0.1 mL of PBS solution as a control. Booster was delivered 15 days post first vaccination. The immunogenicity of vaccine were evaluated every 10 days for one month of rearing period by looking at the production of antibody titer level of vaccinated fish compared to unvaccinated fish group. The results of challenge test with live Benedenia parasites showed that the survival rates of vaccinated fish were higher (100.00% and 98.89%) than that of unvaccinated fish (88.89%). Antibody titer levels of vaccinated groups ranged from 1:32 to 1:16, while in the control group was only 1:2. It is suggested that inactivated parasite vaccine is effective against Benedenia parasite.

KEYWORDS: *anti-parasite vaccine, coral grouper, hatchery, Epinephelus corallicola*

¹⁾ Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol

PENDAHULUAN

Usaha budidaya ikan kerapu di Indonesia sudah semakin banyak dilakukan, namun masih banyak kendala yang ditemukan, di antaranya masih tingginya angka kematian. Di antara penyebab kematian tersebut adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh parasit. Penyakit infeksi parasit yang telah dilaporkan di Indonesia di antaranya adalah investasi parasit *Hirudenia* pada induk ikan kerapu lumpur, *Epinephelus bleckeri* dan kerapu batik, *Epinephelus polyphemadion* (Roza & Johnny, 2006), infeksi parasit protozoa *Scuticociliata* pada benih kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus* (Zafran *et al.*, 2005), investasi parasit insang *Amyloodinium ocellatum* pada calon induk ikan kue, *Carangoides malabaricus* (Johnny & Setiadharna, 2007), dan investasi parasit *Amyloodinium ocellatum* dan *Neobenedenia* pada induk ikan cobia, *Rachycentron canadum* (Johnny *et al.*, 2007). Penyakit akibat investasi parasit merupakan penyakit yang sering dijumpai pada kegiatan budidaya ikan laut. Penyakit infeksi ini di antaranya disebabkan oleh parasit monogeneran capsalid yang merupakan salah satu patogen yang paling penting dan memiliki pengaruh yang serius terhadap akuakultur. Penyakit ini sangat menular dari satu ikan ke ikan lainnya, distribusinya luas, tidak membedakan inang yang spesifik, baik jenis maupun tingkat pertumbuhan, dan tingkat virulensi yang tinggi. Serangan penyakit ini dapat berlangsung dalam waktu yang cepat dan biasanya menyebabkan tingkat kematian yang tinggi terutama pada pemeliharaan ikan secara intensif, bahkan bila terlambat ditangani dapat menyebabkan kematian yang tinggi (Koesharyani *et al.*, 2001).

Penyakit pada ikan dapat ditanggulangi dengan berbagai cara, antara lain dengan perbaikan lingkungan karena penyakit biasanya berkembang apabila lingkungan buruk sehingga ikan stres. Selain itu, perbaikan nutrisi juga memegang peran penting dalam meningkatkan ketahanan ikan terhadap penyakit. Imunostimulan juga dilaporkan efektif meningkatkan kekebalan non-spesifik ikan terhadap penyakit (Johnny *et al.*, 2001; 2005; Johnny & Roza, 2002; Roza & Johnny, 2006). Vaksin diyakini dapat memberikan kekebalan spesifik pada ikan terhadap penyakit tertentu. Beberapa penelitian pendahuluan skala laboratorium telah membuktikan bahwa ikan kerapu

memberikan respons positif terhadap vaksin inaktif anti VNN, vaksin anti virus irido, dan vaksin anti bakteri polivalen dengan menggunakan tiga spesies *Vibrio* (Roza *et al.*, 2004; Johnny *et al.*, 2005).

Karena kejadian infeksi parasit sepanjang waktu, maka upaya pengendalian penyakit infeksi yang efektif adalah dengan tindakan pencegahan. Upaya pencegahan yang paling ampuh yaitu dengan cara vaksinasi. Tetapi, penelitian penggunaan vaksin anti parasit sampai saat ini masih minim. Di Indonesia belum ada laporan penelitian penggunaan vaksin anti parasit pada ikan. Sejauh ini masih diragukan apakah vaksin anti parasit mampu membangkitkan sistem kekebalan tubuh ikan. Padahal, untuk memutus rantai siklus kehidupan parasit diperlukan sistem kekebalan tubuh yang aktif di setiap tahapan kehidupan parasit tersebut. Dengan vaksinasi diharapkan terbentuknya antibodi untuk menangkal parasit yang menginfeksi inang. Berdasarkan masalah tersebut perlu dilakukan suatu penelitian untuk melihat efektivitas vaksin anti parasit pada ikan laut budidaya di hatcheri. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melihat kemampuan vaksin anti parasit *Benedenia* serta uji efektivitasnya dalam meningkatkan kekebalan spesifik ikan.

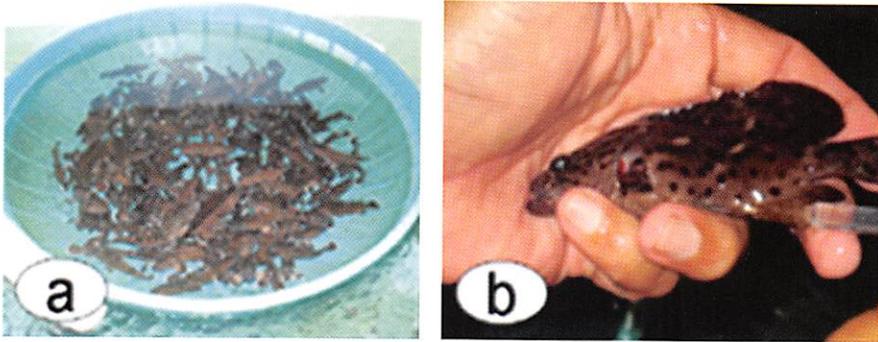
BAHAN DAN METODE

Ikan Uji

Ikan uji yang digunakan adalah benih ikan kerapu pasir (*Epinephelus corallicola*) (Gambar 1a) dengan bobot sekitar 25 g sebanyak 270 ekor. Benih ikan kerapu pasir dipelihara dalam bak polikarbonat volume 200 L sebanyak 9 bak dengan kepadatan 30 ekor/bak dan dilengkapi dengan aerasi. Pakan pelet diberikan sebanyak 2 kali pada pagi dan sore hari, dan penyiponan dilakukan sekali pada pagi hari.

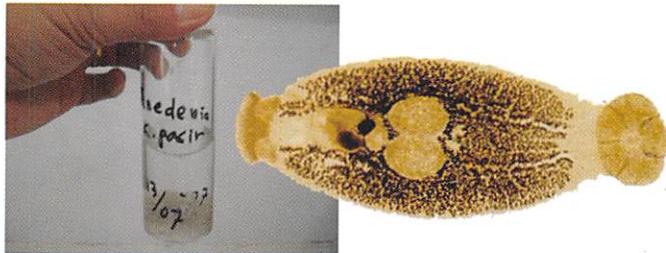
Pembuatan Vaksin Parasit Benedenia

Parasit *Benedenia* diperoleh dari ikan yang terserang *Benedenia* dengan cara merendam ikan tersebut dalam air tawar selama sekitar 15 menit sampai parasit tersebut terlepas dari tubuh ikan (Gambar 2). Parasit selanjutnya dikumpulkan dan dicuci dengan air laut steril dan dimatikan dengan 8% *neutral buffered* formalin selama 2 jam (Yambot & Song, 2006). Setelah dicuci sebanyak 3 kali dengan PBS melalui sentrifugasi guna menghilangkan



Gambar 1. Benih ikan kerapu pasir (*Epinephelus corallicola*) sebagai ikan uji (a) dan vaksinasi menggunakan vaksin anti parasit *Benedenia* melalui injeksi secara intraperitoneal (b)

Figure 1. Juvenile of coral grouper (*Epinephelus corallicola*) used in the experiment (a) and vaccination of fish by intraperitoneal injection (b)



Gambar 2. Koleksi parasit *Benedenia* sebagai bahan vaksin anti parasit

Figure 2. Collection of *Benedenia* parasites for vaccine material

formalin, parasit tersebut digerus dalam tabung *homogenizer* sampai halus. Pelet *Benedenia* yang dihasilkan dipisahkan sebanyak 1 g dan selanjutnya disimpan dalam *freezer* (-20°C) sampai digunakan.

Uji Aplikasi

Masing-masing 30 ekor benih ikan kerapu pasir setiap perlakuan dengan bobot sekitar 25 g disuntik secara intra-peritoneal dengan vaksin *Benedenia* dengan dua konsentrasi berbeda mengikuti metode Yambot & Song (2006), yaitu untuk konsentrasi tinggi diambil pelet parasit basah dari *freezer* sebanyak 10 mg dan dilarutkan dengan 10 mL PBS, dalam larutan vaksin ini terdapat 100 µg parasit per 0,1 mL vaksin. Sedangkan untuk konsentrasi rendah diambil pelet parasit basah dari *freezer* sebanyak 1 mg dan dilarutkan dengan 10 mL PBS, dalam larutan vaksin ini terdapat 10 µg parasit per 0,1 mL vaksin. Aplikasi vaksin parasit digunakan sebagai berikut:

- (A) Konsentrasi tinggi 0,1 mL/ekor ikan (100 µg vaksin/ekor ikan)
- (B) Konsentrasi rendah 0,1 mL/ekor ikan (10 µg/ekor ikan)
- (C) Ikan yang disuntik dengan PBS 0,1 mL/ekor ikan sebagai kontrol

Masing-masing perlakuan diulang 3 kali dengan rancangan acak lengkap.

Koleksi Serum

Setiap kali *sampling*, sebanyak 3 ekor ikan dari masing-masing perlakuan dikoleksi darahnya untuk memperoleh serum sebagai bahan uji titer. Darah ikan uji dikoleksi dari vena anterior (Gambar 3). Sampel darah disedot dengan spuit plastik steril volume 1 cc dengan jarum no. 18. Selanjutnya koleksi darah disimpan dalam tabung *evendoff*. Koleksi darah pada tabung *evendoff* didiamkan dulu sekitar 3 jam, kemudian disentrifuse dengan minisentrifusa kecepatan 6.000 rpm selama 10



Gambar 3. Koleksi darah melalui vena anterior benih ikan kerapu pasir (*Epinephelus corallicola*)

Figure 3. Blood collection from anterior vein of juvenile of coral grouper (*Epinephelus corallicola*)

menit, setelah disentrifuse dipisahkan serum darah ke tabung *evendoff* baru dengan mikropipet. Serum ini siap digunakan untuk uji titer.

Uji Titer

Uji titer atau titrasi adalah prosedur yang disusun dalam seri pengenceran bertingkat dari semua yang diuji. Setiap pengenceran kemudian diuji aktivitasnya dalam sistem pengujian. Perbandingan terbalik pengenceran tertinggi yang memberi reaksi positif disebut titer dan merupakan ukuran jumlah antibodi dalam serum. Uji titer dilakukan dalam wadah uji titer 96 sumur. Uji titer menggunakan sistem penghambatan hemaglutinasi dengan prosedur inokulum parasit *Benedenia* yang ditambahkan ke masing-masing sumur berjumlah konstan sedang serum yang diuji diencerkan seri. Pada sumur no. 1 dimasukkan 100 μ L serum, kemudian sebanyak 50 μ L dipindahkan pada sumur no. 2, ditambahkan 50 μ L PBS pada sumur no. 2 dan diaduk rata, selanjutnya dipindahkan 50 μ L ke sumur no. 3 dengan perlakuan yang sama pada sumur no. 2 dilanjutkan sampai sumur no. 8. Pada masing-masing sumur mulai no.1 sampai no. 9 diisikan antigen parasit sebanyak 50 μ L, dan pada sumur no. 9 hanya berisikan antigen parasit saja. Antigen parasit diperoleh dari pemisahan parasit dengan ikan yang terinfeksi sebanyak

1 g, dicuci bersih 3x dengan air laut steril, parasit tersebut digerus dalam tabung *homogenizer* sampai halus, kemudian ditambahkan air laut steril sebanyak 10 mL, dan siap digunakan. Setelah inokulum parasit dan serum dicampur, digoyang dengan *rotator plate* selama 1—3 menit, kemudian didiamkan selama 4—6 jam pada suhu kamar. Terakhir hemaglutinasi diamati dengan mikroskop sampai sumur yang beberapa terjadinya hemaglutinasi. Antibodi dinyatakan positif bila terjadi reaksi hemaglutinasi (Tizard, 1988 yang dimodifikasi). Reaksi hemaglutinasi yang positif terjadi diamati di mikroskop dengan memperhatikan agglutinas yang terlihat seperti gelembung bening.

Uji Tantang

Setelah 30 hari pemeliharaan terhadap ikan yang telah divaksinasi dilakukan uji tantang dengan menggunakan parasit *Benedenia* hidup. Ikan dari setiap perlakuan sebanyak 30 ekor ditempatkan dalam bak beton volume 1 m³ sebanyak 9 bak, dan masing-masing perlakuan dengan tiga ulangan. Pada setiap bak perlakuan vaksinasi dan kontrol selanjutnya dimasukkan 20 ekor ikan sejenis yang telah terinfeksi *Benedenia* antara 5—10 ekor/ikan. Ikan dipelihara selama 21 hari, pemberian pakan sebanyak 2 kali pada pagi dan sore hari dengan pakan pelet, serta tanpa penyiponan. Pengamatan dilakukan terhadap

tingkat investasi parasit seperti luka dan borok, kematian ikan uji, dan penghitungan berapa banyaknya rata-rata parasit *Benedenia* menginfeksi ikan uji.

HASIL DAN BAHASAN

Hasil uji imunogenik titrasi disajikan secara lengkap pada Tabel 1.

Hasil uji imunogenik menunjukkan bahwa terjadi peningkatan titer antibodi pada kelompok ikan yang diberi perlakuan vaksinasi anti parasit *Benedenia*. Sebaliknya pada kelompok kontrol tidak terjadi peningkatan (Tabel 1). Pada *sampling* pertama hari ke-10 pemeliharaan nilai titrasi sama 8x pada perlakuan vaksin dan 2x pada kontrol. Pada hari ke-20 pemeliharaan uji titrasi terjadi peningkatan 16x pada vaksinasi parasit konsentrasi tinggi, dan pada kontrol nilai yang tetap sebesar 2x pengenceran. Sedangkan pada hari ke-30 pemeliharaan kembali terjadi peningkatan nilai titrasi pada vaksinasi parasit

konsentrasi tinggi sebesar 32x, pada vaksinasi parasit konsentrasi rendah sebesar 16x dan pada kontrol masih tetap bertahan pada 2x pengenceran. Dalam hal ini ternyata vaksin parasit mampu meningkatkan titrasi hemaglutinasi.

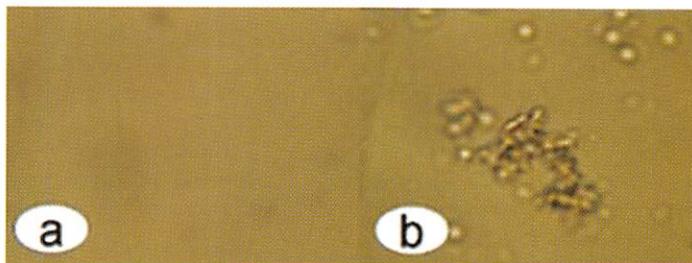
Pengamatan hemaglutinasi melalui mikroskop cukup mengalami kesulitan karena masih adanya serat-serat kasar parasit mengganggu pemandangan. Namun dalam pengamatan hemaglutinasi dapat dibedakan antara serat-serat kasar parasit dengan agglutinasi dari gelembung-gelembung agglutinasi yang terbentuk seperti yang tersaji pada Gambar 4b.

Hasil uji tantang dengan parasit *Benedenia* tidak memberikan perbedaan sintasan yang signifikan setelah 21 hari pengamatan (Tabel 2). Pada Tabel 2 terlihat bahwa selama uji tantang pada vaksinasi parasit konsentrasi tinggi memberikan nilai tertinggi (100%) untuk sintasan, diikuti dengan vaksinasi konsentrasi

Tabel 1. Titer antibodi yuwana ikan kerapu pasir (*Epinephelus corallicola*) pasca vaksinasi

Table 1. Antibody titer levels of juveniles of coral grouper (*Epinephelus corallicola*) post vaccination

Perlakuan <i>Treatment</i>	Hari ke-10 <i>Day 10</i>	Hari ke-20 <i>Day 20</i>	Hari ke-30 <i>Day 30</i>
Konsentrasi tinggi <i>High concentration</i>	1:08	1:16	1:32
Konsentrasi rendah <i>Low concentration</i>	1:08	1:08	1:16
Kontrol <i>Control</i>	1:02	1:02	1:02



Gambar 4. Tidak terjadinya hemaglutinasi pada uji titer (a) dan hemaglutinasi (b)

Figure 4. Negative hemagglutination (a) and positive hemagglutination (b)

Tabel 2. Sintasan (%) yuwana ikan kerapu pasir (*Epinephelus corallicola*) setelah uji tantang dengan *Benedenia*
 Table 2. Survival rates (%) of juvenile of coral grouper (*Epinephelus corallicola*) following challenge test with *Benedenia*

Perlakuan Treatment	Sintasan (%) Survival rate (%)
Konsentrasi tinggi (<i>High concentration</i>)	100 ± 0 ^a
Konsentrasi rendah (<i>Low concentration</i>)	98.89 ± 1.92 ^a
Kontrol (<i>Control</i>)	88.89 ± 5.09 ^a

Keterangan (*Remark*): Perbandingan adalah vertikal, angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda secara statistik (*Comparison is vertical, values with the same superscripts are not significantly different*) (P>0.05)

rendah (98,89%) dan terakhir kontrol sebesar 88,89%. Dari penelitian ini terlihat bahwa secara deskriptif vaksinasi parasit dapat meningkatkan sintasan walau secara statistik tidak berbeda nyata, tetapi terdapat perbedaan yang signifikan pada jumlah parasit per ekor ikan dari masing-masing kelompok perlakuan (Tabel 3). Jumlah parasit pada setiap ekor ikan pada Tabel 3, terbanyak (rata-rata 38 parasit/ekor ikan) didapatkan pada kelompok kontrol diikuti oleh kelompok ikan yang diberi perlakuan vaksin konsentrasi rendah (5,8 parasit/ekor ikan) dan yang terendah pada kelompok ikan yang diberi vaksin konsentrasi tinggi (1,79 parasit/ekor ikan). Dari data jumlah parasit ini dapat diduga bahwa ikan yang tidak divaksin akan sangat berpotensi mengalami stres dan luka fisik akibat parasit sehingga pada akhirnya dapat menyebabkan kematian. Selain itu, ikan yang tidak divaksin akan memerlukan tindakan pencegahan, antara lain dengan perendaman dalam air tawar yang lebih sering dibanding kelompok ikan yang diberi vaksin atau dengan pemberian anti parasit.

Xu *et al.* (2005) melaporkan bahwa parasit ciliata *Ichthyophthirius multifiliis* Rafinesque yang dikenal dengan sebutan "Ich", apabila menginfeksi ikan akan menunjukkan apoptosis theront dapat terjadi melalui pengaturan immobilisasi theront yang bereaksi dengan antibodi. Selanjutnya antibodi dapat mengikat sel parasit dan antigen permukaan ciliata yang menyebabkan immobilisasi (Wang & Dickerson, 2002). Ikan yang pernah mengalami serangan infeksi Ich akan memperoleh antibodi untuk melawan serangan Ich selanjutnya, seperti yang sudah teramat pada ikan *channel catfish*, *Ictalurus punctatus*; ikan *trout*, *Salmo gairdneri* dan ikan *mas*, *Cyprinus carpio* (Lin *et al.*, 1996, Maki & Dickerson, 2003). Studi secara *in vitro* menunjukkan bahwa antibodi dari ikan yang tahan terhadap Ich memiliki pengaruh yang merusak terhadap theront yang menyebabkan penghentian aktivitas berenang, tenggelam ke dasar wadah dan membentuk agregat (Xu *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2005). Ekspose theront immobil terhadap konsentrasi antibodi yang tinggi atau konsen-

Tabel 3. Rata-rata jumlah parasit pada yuwana ikan kerapu pasir (*Epinephelus corallicola*) setelah uji tantang dengan *Benedenia*
 Table 3. Average number of parasites of juveniles coral grouper (*Epinephelus corallicola*) following challenge test with *Benedenia*

Perlakuan Treatment	Jumlah parasit/ekor Number of parasites/fish
Konsentrasi tinggi (<i>High concentration</i>)	1.79 ^a
Konsentrasi rendah (<i>Low concentration</i>)	5.8 ^b
Kontrol (<i>Control</i>)	38.0 ^c

Keterangan (*Remark*): Perbandingan adalah vertikal, angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda secara statistik (*Comparison is vertical, values with the same superscripts are not significantly different*) (P>0.05)

trasi yang rendah secara berkepanjangan menyebabkan kematian theront yang tinggi. Serum dan mukus yang dikumpulkan dari ikan yang tahan serangan Ich mengandung antibodi yang dapat melawan parasit itu dan menyebabkan immobilisasi theront dan trophont secara *in vitro* (Xu & Klesius, 2002). Studi pada ikan mas yang memiliki imun aktif menunjukkan Ich dapat menyerang epitel tetapi sekitar 80% tidak terlihat infeksi dalam dua jam yang menandakan adanya pelepasan secara prematur parasit dari inangnya. Sedangkan ikan mas imun yang mengalami sistem imun ditekan (*immunosuppression*) dengan menggunakan corticosteroid tetap menimbulkan kematian setelah diekspose pada Ich meskipun titer antibodi tetap tinggi (Xu *et al.*, 2002).

Untuk skala laboratorium (Yambot & Song, 2006) melaporkan bahwa vaksin *Cryptocaryon irritans* ternyata mampu meningkatkan kekebalan ikan kerapu lumpur (*Epinephelus coioides*). Kim *et al.* (2006) dalam penelitian pendahuluan mereka menemukan β -tubulin dari parasit *Pseudocohnilembus persalinus* sebagai kandidat antigen untuk pembuatan vaksin anti scuticociliatosis.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa vaksin inaktif parasit *Benedenia* dapat meningkatkan ketahanan spesifik benih ikan kerapu pasir di hatcheri.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh APBN tahun anggaran 2007. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Saudara Slamet Haryanto dan Muhammad Anshori sebagai teknisi Laboratorium Patologi atas bantuannya selama penelitian ini berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Johnny, F., I. Koesharyani, D. Roza, Tridjoko, N.A. Giri, dan K. Suwiryana. 2001. Respon ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* terhadap imunostimulan peptidoglycan melalui pakan pellet. *J. Pen. Perik. Indonesia*. 7(4): 52—56.
- Johnny, F. dan D. Roza. 2002. Pengaruh penyuntikan imunostimulan peptidoglycan terhadap peningkatan tanggap kebal non-spesifik ikan kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus*. Laporan Penelitian Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol. 12 pp.
- Johnny, F., D. Roza, K. Mahardika, Zafran, dan A. Prijono. 2005. Penggunaan imunostimulan untuk meningkatkan kekebalan non-spesifik benih ikan kerapu Lumpur, *Epinephelus coioides* terhadap infeksi virus irido. *J. Pen. Perik. Indonesia*. 11(5): 75—83.
- Johnny, F. dan T. Setiadharna. 2007. Infeksi parasit insang *Amyloodinium ocellatum* pada calon induk ikan kue, *Carangoides malabaricus* di hatchery. *Prosiding Konferensi Aquaculture Indonesia*, Surabaya 5—7 Juni 2007. p. 53—57.
- Johnny, F., A. Prijono, dan D. Roza. 2007. Infeksi parasit pada induk ikan cobia, *Rachycentron canadum* dan upaya pengendaliannya. Buku Pengembangan Teknologi Budidaya Perikanan (*Eds.*). Ahmad, T., *et al.* p. 269—277.
- Kim, S.M., E.H. Lee, S.R. Kwon, S.J. Lee, S.K. Kim, Y.K. Nam, and K.H. Kim. 2006. Preliminary analysis of recombinant β -tubulin of *Pseudocohnilembus persalinus* (Ciliophora: Scuticociliatida) as a vaccine antigen candidate against scuticociliatosis. *Aquaculture*. 260: 21—26.
- Koesharyani, I., D. Roza, K. Mahardika, F. Johnny, Zafran, and K. Yuasa. 2001. Marine Fish and Crustaceans Diseases in Indonesia *In Manual for Fish Diseases Diagnosis II* (*Ed.* by K. Sugama, K. Hatai, and T. Nakai). Gondol Research Station for Coastal Fisheries, CRIFI and Japan International Cooperation Agency. 49 pp.
- Lin, T.L., T.G. Clark, and H.W. Dickerson. 1996. Passive Immunization of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) against the Ciliated Protozoan Parasite *Ichthyophthirius multifiliis* by Use of Murine Monoclonal Antibodies. *Infection and Immunity*. 64(10): 4,085—4,090.
- Maki, J.L. and H.W. Dickerson. 2003. Systemic and Cutaneous Mucus Antibody Responses of Channel Catfish Immunized against the Protozoan Parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10(5): 876—881.
- Roza, D., F. Johnny, dan Tridjoko. 2004. Peningkatan imunitas yuwana ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* terhadap infeksi viral nervous necrosis (VNN). *J. Pen. Perik. Indonesia*. 10(1): 61—70.

- Roza, D. dan F. Johnny. 2006. Infeksi parasit hirudenia pada induk ikan kerapu lumpur, *Epinephelus bleckeri* dan kerapu batik, *Epinephelus polyphkadion* serta upaya penanggulangannya. *Prosiding Seminar Nasional Tahunan III Hasil Penelitian Perikanan dan Kelautan*, Yogyakarta, 27 Juli 2006. p. 201—206.
- Wang, X. and H.W. Dickerson. 2002. Surface Immobilization Antigen of the Parasitic Ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* Elicits Protective Immunity in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 9(1): 176—181.
- Xu, D-H., P.H. Klesius, and R.A. Shelby. 2002. Cutaneous antibodies in excised skin from channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque, immune to *Ichthyophthirius multifiliis*. *Journal of Fish Diseases*. 25: 45—52.
- Xu, D-H. and P.H. Klesius. 2002. Antibody mediated immune response against *Ichthyophthirius multifiliis* using excised skin from channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque, immune to *Ichthyophthirius*. *Journal of Fish Diseases*. 25: 299—306.
- Xu, D-H., P.H. Klesius, and C.A. Shoemaker. 2005. Cutaneous antibodies from channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), immune to *Ichthyophthirius multifiliis* (Ich) may induce apoptosis of Ich theronts. *Journal of Fish Diseases*. 28: 213—220.
- Yambot, A.V. and Y.Y. Song. 2006. Immunization of grouper, *Epinephelus coioides*, confers protection against a protozoan parasite, *Cryptocaryon irritans*. *Aquaculture*. 260: 1—9.
- Zafran, W. Andriyanto, dan T. Sutarmat. 2005. Infeksi protozoa *Scuticociliata* pada benih kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus* dan upaya penanggulangannya. *Prosiding Seminar Nasional dan Kongres Biologi XIII*. Yogyakarta, 16—17 September 2005. p. 281—284.