

MINERAL BESI SEBAGAI PENINGKAT VITALITAS IKAN KERAPU BEBEK (*Cromileptes altivelis*) SAAT KONDISI STRES HIPOKSIA

Mia Setiawati¹⁾, TI Winarno¹⁾, MA Suprayudi¹⁾, I Mokoginta¹⁾, W Manalu²⁾

ABSTRACT

IRON SUPPLEMENT AS VITALITY ENHANCER FOR HUMPBACK GROUPER FISH (*Cromileptes altivelis*) AT HYPOXIA STRESS CONDITION

Humpback grouper (*Chromileptes altivelis*) is sensitive to stress that caused low growth rate, mortality, and harvest. Iron is micronutrient that can enhance the immunity. This experiment was conducted to determine the iron supplement in the feed for humpback grouper fish to vitality increase at hypoxia stress condition. The fish weight 4.14 ± 0.01 g/ind. and was cultured in $60 \times 40 \times 50$ cm aquarium and stocked at a density of 10 ind./aquarium. After reared for 61 days, the fish was fed by diet that contained inorganic-iron supplementation at 0, 50, 100, and 200 ppm respectively. The feed was given three times daily at a satiation. The fish was exposed two hours during hypoxic condition and the rearing period were 25 days at normoxia. The results of this study showed that growth performance of fish not significantly different among iron supplement levels, but during and after hypoxia exposure, 50 ppm Fe supplement in the diet of humpback grouper showed the most vitality and healthy condition of fish, while the survival rate of fish was 100% and the growth relative was 82%. However, the humpback grouper fish grew negatively if iron supplement in the diet was more than 50 ppm.

Key words: iron (Fe), humpback grouper, feed, vitality, hypoxia

ABSTRAK

Ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) rentan terhadap stres sehingga menyebabkan pertumbuhan rendah, kematian, dan penurunan produksi. Zat besi (Fe) merupakan salah satu mikro-nutrien yang mampu meningkatkan daya tahan tubuh. Penelitian ini dilakukan untuk menentukan level penambahan Fe dalam pakan ikan yang mampu meningkatkan vitalitas kerapu bebek saat kondisi stres hipoksia. Ikan yang digunakan berbobot awal rata-rata 4.14 ± 0.01 g, dipelihara pada akuarium berukuran $60 \times 40 \times 50$ cm dengan kepadatan 10 ekor/akuarium. Selama pemeliharaan 61 hari, ikan diberi pakan tambahan Fe-anorganik 0, 50, 100, dan 200 ppm, tiga kali sehari secara *at-satiation*. Ikan diberi stres hipoksia selama 2 jam, dan dipelihara kembali pada kondisi oksigen normal selama 25 hari. Hasil penelitian menunjukkan performan pertumbuhan ikan kerapu bebek sama untuk 3 level Fe berbeda. Namun, pada saat dan sesudah pengujian

hipoksia, penambahan suplementasi Fe 50 ppm dalam pakan menunjukkan vitalitas dan kesehatan ikan kerapu bebek tertinggi dengan laju sintasan (*survival rate*) 100% dan pertumbuhan relatif mencapai 82%, tetapi penambahan Fe di atas 50 ppm berdampak negatif pada pertumbuhan ikan kerapu bebek.

Kata kunci: zat besi, ikan kerapu bebek, pakan, vitalitas, hipoksia

PENDAHULUAN

Salah satu upaya peningkatan produktivitas pembesaran ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) dilakukan melalui perbaikan mutu pakan. Manajemen pakan berhasil meningkatkan pertumbuhan, namun kerapu bebek masih rentan terhadap perubahan lingkungan dan mudah stres, menyebabkan pertumbuhan rendah, kematian, dan penurunan produksi.

Suatu strategi yang dapat dilakukan untuk meningkatkan produktivitas budi daya ikan ialah dengan

¹⁾ Departemen Budidaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor. Telp. 0251 628755, Faks 0251 622941, Email miasetia@ipb.ac.id

²⁾ Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor.

memanfaatkan respons imunitas ikan terhadap stres dan berperan penting terhadap daya imunitas (Brock dan Mulero 2000). Unsur besi (Fe) sangat erat kaitannya dengan nilai hematologi. Mineral Fe merupakan unsur esensial yang berperan dalam transpor oksigen dan respirasi sel melalui aktivitas oksidasi-reduksi dan transfer elektron (Bhaskaram *et al.* 1989), serta berposisi dalam hemoglobin yang mampu meningkatkan oksigen ke darah (Bury dan Grosell 2003). Fe juga dibutuhkan oleh semua sel hidup pada beberapa reaksi biokimia, khususnya metabolisme energi aerob dan anerob serta sel proliferasi. Perubahan kondisi lingkungan fisik maupun kimia perairan dapat mempengaruhi status sel darah merah ikan serta *erythropoiesis* (Rehulka dan Adamec 2004). Menurunnya sirkulasi sel darah merah dapat digambarkan oleh nilai hematokrit dan hemoglobin dari Fe yang masuk ke dalam tubuh ikan (Gatlin dan Wilson 1986).

Penelitian ini bertujuan menentukan penambahan Fe dalam pakan ikan yang mampu meningkatkan vitalitas ikan kerapu bebek saat kondisi stres hipoksia.

METODE

Metode Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Stasiun Lapangan Pusat Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan IPB, Ancol, Jakarta. Penelitian dilakukan melalui 2 tahap eksperimen. Tahap pertama ialah pemberian pakan Fe-sulfat pada ikan uji selama 61 hari untuk mengamati laju pertumbuhan dan ciri darah ikan uji sebelum pemberian stres. Tahap kedua merupakan uji respons vitalitas ikan melalui stres hipoksia. Selanjutnya, ikan uji pascastres hipoksia dipelihara selama 25 hari pada kondisi normoksia.

Bahan dan Alat

Ikan uji yang digunakan ialah kerapu bebek hasil pembenihan Balai Budidaya Lampung (BBL) dengan bobot awal $4,14 \pm 0,01$ g. Ikan diadaptasikan selama 10 hari dengan pemberian pakan komersial. Selama pengujian, ikan dipelihara menggunakan sistem resirkulasi dalam akuarium berukuran $60 \times 40 \times 50$ cm dengan kepadatan 10 ekor. Media pemeliharaan menggunakan air laut bersalinitas 30-32 ppt, dengan kandungan Fe 0,048 ppm, suhu air $28-29^{\circ}\text{C}$, kandung-

an oksigen terlarut 3,3-6,6 ppm, pH 7,5, TAN 0,12-0,58 ppm, dan alkalinitas 112-128 ppm.

Pakan uji yang digunakan berupa pelet dengan kadar protein $48,5 \pm 0,4$ % yang tersusun dari bahan-bahan alami sumber protein (tepung ikan, tepung udang, tepung kedelai, dan tepung tulang-daging), sumber lemak (minyak ikan dan minyak cumi), serta sumber karbohidrat (*pollard*). Perlakuan pakan uji ialah pemberian $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 0, 50, 100, dan 200 mg/kg pakan (Tabel 1). Ikan diberi pakan sampai kenyang, tiga kali sehari: pagi, siang, dan sore. Penelitian disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 4 perlakuan dan 3 ulangan.

Tabel 1 Komposisi pakan uji dengan empat level Fe

Bahan makanan (%)	Fe-anorganik (ppm)			
	0	50	100	200
Tepung ikan	42,48	42,48	42,48	42,48
Tepung rebon	12,65	12,65	12,65	12,65
Tepung tulang daging	5,35	5,35	5,35	5,35
Tepung bungkil kedelai	16,95	16,95	16,95	16,95
Tepung <i>pollard</i>	0,46	0,46	0,46	0,46
Minyak cumi	6,30	6,30	6,30	6,30
Minyak ikan	6,25	6,25	6,25	6,25
Vitamin Mix	1,30	1,30	1,30	1,30
Mineral Mix tanpa Fe	1,30	1,28	1,25	1,20
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,000	0,025	0,049	0,099
Vitamin C	0,01	0,01	0,01	0,01
Aditif pakan	4,10	4,10	4,10	4,10
Kolin klorida	0,05	0,05	0,05	0,05
Karboksimetil selulosa	2,80	2,80	2,80	2,80
Hasil Analisis (%Bobot kering)				
Protein	49,10	48,21	48,34	48,45
Lemak	19,05	19,80	19,36	19,66
Serat Kasar	4,01	4,34	3,88	3,81
Abu	11,95	11,83	11,82	11,96
BETN	15,90	15,83	16,60	16,12
Energi (kkal/kg)	3658,75	3686,83	3674,75	3691,10
C/P (kkal/gr protein)	7,45	7,64	7,60	7,62
Kandungan Fe (ppm)	717,5499	730,5929	775,4225	872,3647

Pengumpulan Data

Performans ikan akibat pemberian Fe dilakukan dengan menimbang bobot ikan pada awal dan akhir penelitian serta menghitung jumlah pakan yang dikonsumsi. Status kesehatan ikan juga dianalisis dengan mengamati ciri darahnya.

Darah diambil dari 5 ekor ikan uji untuk setiap perlakuan. Sampel darah diambil dari vena kaudalis dengan menggunakan *syringe* yang telah diberi antikoagulan, kemudian disimpan dalam tabung

ependorf untuk pengamatan selanjutnya di laboratorium.

Pengamatan dan penghitungan jumlah sel darah merah, sel darah putih, hematokrit, dan diferensial leukosit menggunakan metode Anderson dan Swicki (1993), sedangkan pengukuran kadar hemoglobin mengikuti Wedermeyer dan Yasutake (1977). Selanjutnya ikan dibedah dan kandungan Fe diambil dari organ dan tubuhnya menggunakan pengabuan basah (AOAC 1990) yang kemudian dibaca pada spektrometer serapan atom.

Vitalitas ikan diamati dengan pemaparan tubuh ikan dalam lingkungan hipoksia (oksigen terlarut, DO \pm 1 ppm) selama 2 jam. Selanjutnya kondisi fisik dan aktivitas ikan sebagai respons stres diamati pada 5 menit pertama. Sebanyak 3 ekor ikan ada setiap perlakuan diambil darahnya dan diamati ciri darahnya. Pengamatan dilakukan juga setelah paparan dalam lingkungan hipoksia selama 2 jam.

Ikan kerapu bebek yang masih hidup setelah dalam paparan hipoksia dipelihara selama 25 hari untuk diamati pertumbuhannya. Ikan ditimbang, kemudian dipindahkan ke media semula (oksigen normal, DO \pm 6 ppm), dan pada akhir penelitian ditimbang bobotnya.

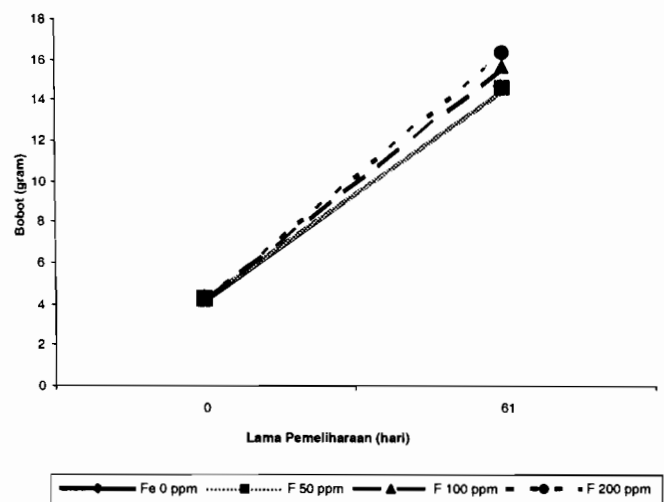
Analisis Data

Respons pertumbuhan ikan uji dan efisiensi pakan pada setiap perlakuan pemberian Fe dianalisis keragamannya dengan analisis varians, sedangkan respons gambaran darah (sel darah merah, sel darah putih, hematokrit, dan hemoglobin) serta status Fe pada hati dan tubuh ikan ditampilkan secara deskriptif. Respons fisiologi saat kondisi hipoksia terhadap vitalitas ikan dianalisis berdasarkan pada persentase

laju sintasan selama pengujian, kemudian dihubungkan dengan kondisi kesehatan ikan pada waktu yang sama berdasarkan pada ciri darah sebelum dan saat pengujian.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Selama 61 hari pemeliharaan, bobot ikan uji meningkat sebesar 350-391% dari bobot awal (Gambar 1). Akan tetapi pertumbuhan dan laju sintasan ikan kerapu bebek yang diberi pakan dengan perlakuan pemberian $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0, 50, 100, dan 200 Fe/kg pakan) tidak berbeda Tabel 2. Hal ini sama dengan hasil penelitian Sakamoto dan Yone (1976) pada ikan *red sea bream*, Andersen *et al.* (1998) pada ikan *Salmo salar*, Shim dan Ong (1999) pada ikan *guppy*.



Gambar 1 Bobot rata-rata individu ikan kerapu bebek pada pemberian pakan uji dengan level Fe berbeda (ppm), selama 61 hari pemeliharaan

Tabel 2 Konsumsi pakan, laju pertumbuhan harian, efisiensi pakan dan kelangsungan hidup ikan kerapu bebek pada pemberian pakan uji dengan level Fe berbeda (ppm), selama 61 hari pemeliharaan

Parameter Uji	Fe-anorganik (ppm)			
	0	50	100	200
Konsumsi pakan (g)	164,19 \pm 52,78 ^a	182,64 \pm 27,72 ^a	171,27 \pm 29,13 ^a	184,67 \pm 5,27 ^a
Laju pertumbuhan harian (%)	1,99 \pm 0,65 ^a	2,06 \pm 0,25 ^a	2,19 \pm 0,09 ^a	2,27 \pm 0,04 ^a
Efisiensi pakan (%)	60,12 \pm 14,53 ^a	56,49 \pm 6,21 ^a	62,31 \pm 3,43 ^a	65,48 \pm 1,24 ^a
Laju sintasan	100 \pm 0 ^a	100 \pm 0 ^a	93,33 \pm 11,54 ^a	100 \pm 0 ^a

Keterangan : a – huruf *superscript* di belakang nilai simpangan baku menunjukkan tidak berbeda antarperlakuan ($p > 0,05$).

Fe berperan sebagai metaloenzim sehingga berbagai aktivitas metabolik tidak terlalu dipengaruhi, sedangkan pertumbuhan merupakan hasil kombinasi berbagai aktivitas metabolik. Berdasarkan hasil analisis komposisi pakan uji tanpa penambahan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pakan tersebut sudah mengandung Fe sebanyak 717,55 ppm yang berasal dari bahan-bahan alami seperti tepung ikan, tepung rebon, tepung tulang, dan daging. Oleh karena itu, ikan tidak mengalami defisiensi Fe.

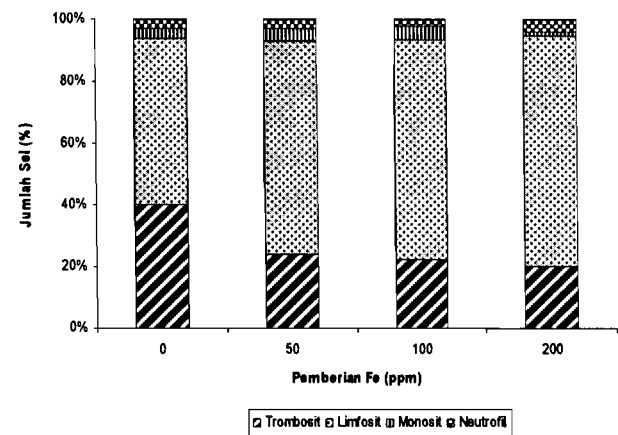
Berdasarkan pada pengamatan sampel darah ikan uji di akhir pemeliharaan tahap penelitian pertama, hemoglobin, hematokrit, jumlah sel darah merah, dan jumlah sel darah putih ikan uji tanpa pemberian Fe mempunyai nilai paling rendah (Tabel 3).

Pada kasus ini tidak tampak gejala klinis anemi, sesuai dengan penelitian Shim dan Ong (1999) yang menyatakan bahwa telah terjadi peningkatan hemoglobin akibat meningkatnya asupan Fe melalui pakan. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian Fe diperlukan dalam pakan ikan, walaupun pada pakan tersebut telah terkandung zat besi yang berasal dari bahan baku pakan. Parameter ciri darah dapat digunakan untuk mendiagnosis patologi dan status fisiologi ikan, walaupun alat ini sangat rendah penerapannya karena nilai yang normal dan adanya interval antarspesies masih tidak jelas pada kondisi kultur yang berbeda. Namun, jumlah sel darah dan biokimia darah dapat mengindikasikan adanya faktor stres pada ikan (Barcellos *et al.* 2004). Hemoglobin, hematokrit, dan eritrosit ikan uji pada pemberian Fe 50 ppm mempunyai nilai tertinggi dan diduga memiliki status kesehatan ikan terbaik. Hemoglobin di dalam eritrosit diduga mengikat oksigen melalui suatu ikatan kimia khusus sehingga kinerja metabolisme dapat berjalan

lancar, dan akibatnya sel dalam tubuh mendapat pasokan energi cukup.

Berdasarkan pengamatan deferensial leukosit, terjadi peningkatan persentase limfosit dan penurunan trombosit dengan semakin tingginya pemberian Fe dalam pakan (Gambar 2). Limfosit berperan sangat penting dalam mekanisme pertahanan atau imunitas spesifik, sedangkan trombosit berfungsi penting dalam usaha tubuh untuk mempertahankan keutuhan jaringan bila terjadi luka. Pada kondisi normal (lingkungan layak untuk kehidupan ikan), perbedaan gambaran darah yang terjadi dapat menunjukkan status kesehatan ikan akibat perlakuan pemberian Fe berbeda pada pakan uji. Ikan uji yang diberi pakan tanpa Fe diduga lebih rentan apabila terjadi stres lingkungan dibandingkan dengan perlakuan lainnya.

Ikan yang diberi pakan dengan Fe 50 ppm memiliki indeks hepatosomatik $1,92 \pm 0,14\%$; perlakuan ini menunjukkan indeks yang lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Hal ini



Gambar 2 Deferensial leukosit ikan kerapu bebek pada pemberian pakan uji dengan level Fe berbeda (ppm), selama 61 hari pemeliharaan

Tabel 3 Rata-rata hemoglobin, hematokrit, jumlah sel darah merah, dan sel darah putih ikan kerapu bebek pada pemberian pakan uji dengan level Fe berbeda (ppm), selama 61 hari pemeliharaan

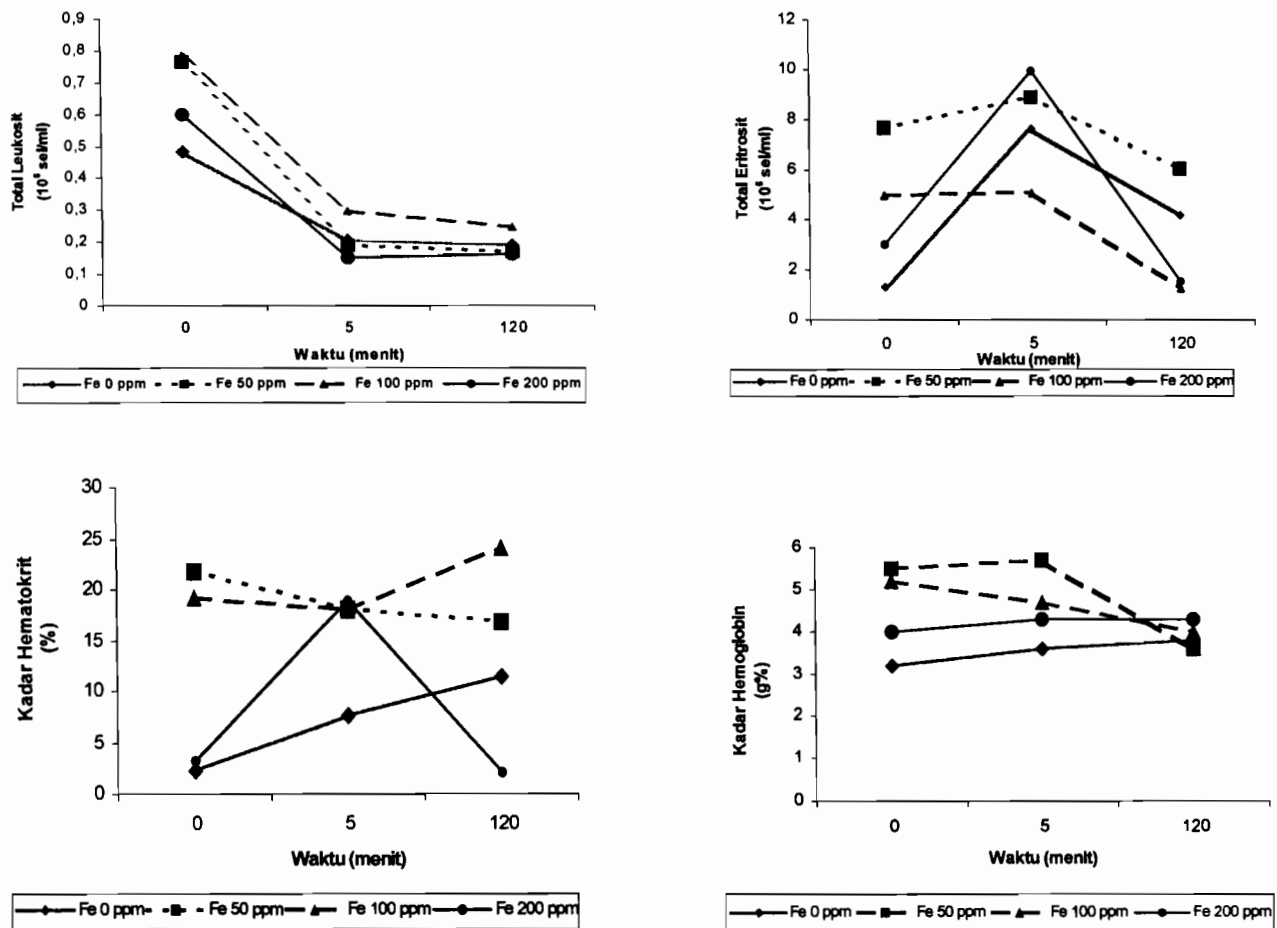
Parameter Darah	Fe-anorganik (ppm)			
	0	50	100	200
Hemoglobin (g%)	3,2	5,5	5,2	4,0
Hematokrit (%)	2,3	21,7	19,2	3,2
Sel darah merah (sel/ml)	$1,3 \times 10^6$	$7,65 \times 10^6$	$4,96 \times 10^6$	3×10^6
Sel darah putih (sel/ml)	$4,84 \times 10^5$	$7,65 \times 10^5$	$7,83 \times 10^5$	6×10^5

diduga karena hati ikan pada perlakuan tersebut berkembang lebih baik dan merupakan gudang penyimpanan nutrisi yang dapat segera diregulasi jika diperlukan. Konsentrasi Fe di hati ikan yang tidak diberi Fe dalam pakannya mempunyai nilai terendah ($105,91 \pm 1,22$ ppm), sedangkan pemberian Fe 50, 100, dan 200 ppm meningkatkan konsentrasi Fe di hati, yang merupakan salah satu gudang penyimpanan Fe di dalam tubuh. Proses penyerapan Fe pada jaringan tubuh ikan dipengaruhi oleh kondisi ikan, status Fe, jumlah dan bentuk kimiawi asupan Fe, serta proporsi komponen inorganik dan organik yang ada dalam pakan.

Vitalitas ikan terhadap paparan stres hipoksia menunjukkan pada lima menit pertama paparan hipoksia, ikan uji umumnya mengalami stres, yang dicirikan oleh beberapa ikan diam di dasar, tiduran, bahkan ada yang meloncat dan warna tubuh me-

mutat. Setelah 120 menit paparan hipoksia, ikan yang diberi pakan dengan Fe 50 ppm menunjukkan laju sintasan 100%, berbeda dengan perlakuan lainnya yang mengalami mortalitas 15-20%. Berdasarkan pengamatan pada ciri darahnya, tampak terdapat perbedaan gambaran darah sebagai respons kondisi hipoksia setelah menit ke-5 dan menit ke-120 (Gambar 3).

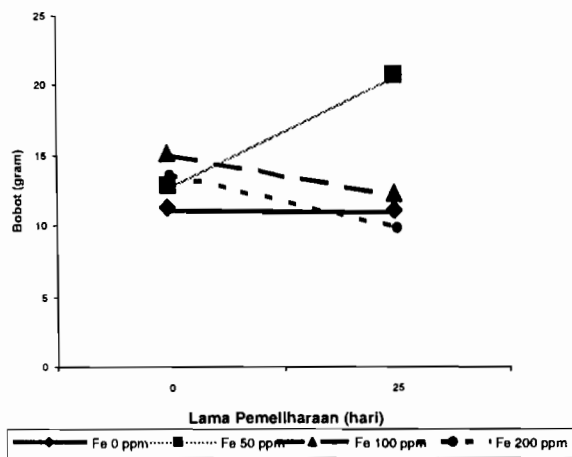
Fluktuasi ciri darah yang berbeda menunjukkan respons ikan terhadap kondisi stres. Peningkatan sel darah merah merupakan usaha homeostasi tubuh ikan dalam upaya untuk memperbanyak sel dan hemoglobin guna mengikat oksigen (Kawatsu 1972). Ikan yang hidup di air rendah-oksigen akan mengalami hematopoiesis dan mikrositoti sehingga eritrositnya meningkat sebagai upaya penyesuaian penambahan oksigen. Selain itu terjadinya peningkatan dan penurunan hemoglobin, diduga akibat peningkatan



Gambar 3 Rata-rata hemoglobin, hematokrit, jumlah sel darah merah dan sel darah putih ikan kerapu bebek pada pemberian pakan uji dengan level Fe berbeda (ppm), selama 5 menit dan 120 menit paparan hipoksia

dan penurunan ukuran sel darah. Peningkatan hematokrit pada setiap perlakuan saat paparan hipoksia diduga akibat peningkatan aktivitas pembentukan atau pemecahan sel darah sehingga volume sel darah meningkat. Pada menit ke-120, umumnya terjadi penurunan semua komponen ciri darah. Hal ini menunjukkan bahwa kemampuan sel untuk melakukan proliferasi terbatas dan pada kondisi tersebut diduga ikan telah kehabisan energi.

Hasil pengamatan pertumbuhan ikan uji pascahipoksia dapat dilihat pada Gambar 4. Setelah masa pemeliharaan 25 hari, perubahan bobot badan ikan uji terlihat jelas. Pemberian Fe 50 ppm dalam pakan menunjukkan pertumbuhan relatif 82% lebih tinggi dibandingkan bobot awal dan berbeda nyata dibandingkan dengan pemberian Fe 0, 100, dan 200 ppm yang memberikan pertumbuhan negatif. Hal ini membuktikan bahwa regulasi metabolisme cukup baik pada perlakuan Fe 50 ppm akibat retensi Fe di organ hati ikan cukup memadai. Proses penyerapan Fe dapat terjadi secara aktif dan pasif, yaitu walaupun asupan Fe rendah dalam pakan, total Fe di serum relatif konstan dan telah menunjukkan adanya transfer aktif dengan tingkat aktivitas ferireduktase cukup tinggi (Carriquiriborde *et al.* 2004). Pada kasus ini, berbagai jaringan penyimpan Fe yang terikat sebagai ferritin/transferrin diduga dapat digunakan sebagai sumber Fe saat dibutuhkan dalam kondisi stres.



Gambar 4 Pertumbuhan bobot rerata individu ikan kerapu bebek pada pemberian pakan uji dengan level Fe berbeda (ppm), selama pemeliharaan 25 hari pasca hipoksia

Kondisi stres pada ikan ternyata telah mempengaruhi nafsu makan ikan. Ikan yang diberi Fe 100 dan 200 ppm pascahipoksia diduga kekurangan energi karena terlalu banyak energi yang digunakan untuk bertahan saat paparan hipoksia. Kelebihan Fe dapat menyebabkan keracunan pada sel yang dapat mengganggu atau mengurangi fungsi imunitas. Fe adalah satu dari logam utama yang melibatkan oksidasi lemak (Lee *et al.* 1981). Kelebihan Fe menyebabkan stres oksidatif, mempengaruhi pembentukan katalase pada hidroperoksida dan radikal bebas peroksidase oleh asam lemak takjenuh dan oksigen.

Ikan mampu mengatasi kelebihan asupan Fe yang dikenal dengan hipotesis mukosal blok, yaitu terjadi peningkatan konsentrasi Fe dalam jaringan sampai batas tertentu, kemudian konsentrasi relatif konstan (Shim dan Ong 1999). Namun, mekanisme ini dapat gagal bila Fe melebihi toleransinya. Pada kasus ini, stres hipoksia telah mengganggu mekanisme biokimiawi dan fisiologi pada tubuh ikan. Diduga sel mukus menjadi jenuh dengan Fe sehingga ikan tidak mampu meregulasi konsentrasi Fe untuk menuju keseimbangan. Baker *et al.* (1997) mengemukakan kelebihan Fe (6,3 g/kg pakan) pada *African catfish*, menyebabkan terjadinya stres oksidatif sebagai indikasi hasil peroksidasi lemak di hati.

KESIMPULAN

Penambahan suplementasi Fe 50 ppm dalam pakan buatan ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) menunjukkan vitalitas dan kesehatan ikan tertinggi saat pengujian stres hipoksia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih diucapkan kepada Lembaga Penelitian dan Pemberdayaan Masyarakat, Institut Pertanian Bogor atas dana Penelitian Dosen Muda tahun 2006.

DAFTAR PUSTAKA

- Andersen F, Lygren B, Maage A, Waagbo R. 1998. Interaction between two dietary levels of iron and two forms of ascorbic acid and the effect on growth, antioxidant status and some non-specific immune parameters in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. *Aquaculture* 161:437-451.

- Anderson DP, Siwick A. 1994. Basic hematology and serology for fish health programs. Second Symposium on Disease in Asia Aquaculture "Aquatic Animal Health and Environment". Asia Fisheries Society. Phuket, Thailand.
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemists. 1990. Helrich K. Editor. *Official Methods of Analysis*. Ed ke-15. Washington DC: AOAC.
- Barcellos LJG, Kreutz LC, de Souza C, Rodrigues LB, Fioreze I, Quevedo RM, Cericato L, Soso AU, Faguendes M, Conrad J, Lacerda L de A, Terra S. 2004. Hematological changes in Jundia (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard *Pimelodidae*) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. *Aquaculture* 237: 229-226.
- Bhaskaram P, Sherada K, Sivakumar B, Rao KV, Nair M. 1989. Effect of iron and vitamin A deficiencies on macrophage function in children. *Nutr Res* 9:35-45.
- Baker RTM, Martin P, Davies SJ. 1997. Ingestion of sub-lethal levels of iron sulphate by African catfish affects growth and tissue lipid peroxidation. *Aquat Toxicol* 30:51-56.
- Bury N, Grosell M. 2003. Iron acquisition by teleost fish. *Comparative Biochem Physiol Part C*, 135:97-105.
- Brock JH, Mulero V. 2000. Cellular and molecular aspects of iron and immune function. *Proc Nutr Soc* 59:537-540.
- Carriquiriborde P, Handy RD, Davies SJ. 2004. Physiological modulation of iron metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed low and high iron diets. *J Experim Biol* 207:75-86.
- Gatlin DM, Wilson RP. 1986. Characterization of iron deficiency and the dietary iron requirement of fingerling channel catfish. *Aquaculture* 52:191-198.
- Kawatsu S. 1972. Studies on the anemia of fish-V. Dietary iron deficient anemia in brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *Bull Freshw Fish Res Lab* 22:59-67.
- Lee YH, Layman DK, Bell RR, Norton HW. 1981. Response of glutathione peroxidase and catalase to excess iron in rats. *J Nutr* 111:2195-2202.
- Rehulka J, Adamec V. 2004. Red blood cell indices for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) reared in cage and raceway culture. *ACTA Vet BRNO* 73:105-114.
- Sakamoto S, Yone Y. 1976. Requirement of red sea bream for dietary Fe-I. Report of Fishery Research Laboratory. Fukukoka. Kyushu University, 3:53-58.
- Shim KF, Ong SI. 1999. Iron requirement of the guppy (*Poecilia reticulata* Peters). <http://go.compuserve.com/fishnet> [4 Sep 2005]
- Wedemeyer GA, Yasutake WT. 1977. Clinical methods for assessment of the effect environmental stress on the fish health. Technical papers of The US Fish and Wildlife Service 89:1-7. Connecticut. Fish and Wildlife Service.