

Deteksi *Edwardsiella tarda* Secara Imunohistokimia Pada Ikan Patin (*Pangasius pangasius*)

Detection of *Edwardsiella tarda* by immunohistochemistry in catfish (*Pangasius pangasius*)

S. Andriyanto^{1,*}, Haririah¹, Y. Yulianti¹, S. H. I. Purnomo¹, S. T. Astuti¹, Nurlaila¹, T. Samudro¹, dan B. P. Priosoeryanto²

Balai Uji Standar Karantina Ikan, Departemen Kelautan dan Perikanan, JAKARTA¹;
Bagian Patologi, Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan – IPB²

Abstract

Detection of *Edwardsiella tarda* antigen on the 20 heads of experimentally infected-catfish tissue (*Pangasius pangasius*) by immunohistochemistry was done. Clinical sign of the infected fish were weak response, swelling, haemorrhages in the anal, abdomen and tail fin regions, ulcer in the above of linea lateralis. Gross findings of the internal organs were swelling, pale and bad smell. Histopathologically, there were necrotic area with infiltration of inflammatory cells, melanomacrophages in the muscle, liver, kidney and spleen and some eosinophilic materials in the kidney was also found. Immunohistochemical detection using specific antibody to *E. tarda* showed positive reaction in the internal organs. Immunohistochemistry assay is one of the suitable methods for detection and diagnose of *E. tarda* infection in fish.

Keywords : Catfish, *Edwardsiella tarda*, immunohistochemistry

Pendahuluan

Tingginya frekuensi lalu lintas perikanan di Indonesia, baik masuk atau keluar dari wilayah Indonesia ataupun didalam wilayah Indonesia sendiri sangat memungkinkan untuk menyebarnya Hama Penyakit Ikan (HPI) dan Hama Penyakit Ikan Karantina (HPIK). Menyebar dan mewabahnya Hama Penyakit Ikan (HPI) dan Hama Penyakit Ikan Karantina akan sangat merugikan perekonomian masyarakat. Salah satu bakteri yang merupakan Hama dan Penyakit Ikan Karantina adalah *E. tarda*.

E. tarda dilaporkan menyerang ikan-ikan air tawar dan laut antara lain Channel catfish (*Ictalurus punctatus*), Chinook salmon (*Onchorhynchus tshawytscha*), Common carp (*Cyprinus carpio*), Crimson seabream (*Evynnis japonicus*), Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), Japanese eel (*Anguilla japonica*), Largemouth bass (*Micropterus salmoides*), Mullet (*Mugil cephalus*), Red sea bream (*Chrysophrys major*), Striped bass (*Morone saxatilis*), Tilapia (*Tilapia nilotica*), Yellow tail (*Seriolla quinquiradiata*), ular, buaya dan siunga laut (Puskari, 2004 ; Pressley et.al 2005).

Di Amerika Serikat pernah dilaporkan bahwa penyakit ini merupakan penyakit ekonomis penting yang umumnya menyerang ikan channel catfish. Walaupun tidak dilaporkan menyerang American eels di Amerika Serikat, tetapi menyebabkan masalah yang serius terhadap Japanese eels di Jepang dan Taiwan (Noga, 1996). Dari hasil pemantauan Hama dan Penyakit Ikan Karantina di Indonesia, bakteri *E. tarda* telah ditemukan di Pulau Jawa, Sumatera dan Kalimantan.

Serangan *E. tarda* pada ikan dalam tahap infeksi ringan hanya menampakkan luka-luka kecil, sebagai perkembangan penyakit lebih lanjut, luka bernanah berkembang dalam otot rusuk dan lambung. Pada kasus akut, luka bernanah secara cepat bertambah dengan berbagai ukuran, kemudian luka-luka terisi gas dan terlihat bentuk cembung menyebar ke seluruh tubuh. Warna tubuh hilang, dan luka-luka merata diseluruh tubuh, jika luka digores, akan tercium bau busuk (H₂S). Pada channel cat fish tampak pendarahan pada organ viseral. Sedangkan pada tilapia adanya pendarahan pada anus, nodul putih pada insang, ginjal, hati, limpa dan saluran pencernaan (Austin, 1999).

*) Alamat untuk korespondensi

Saat ini tersedia beberapa metoda pemeriksaan untuk mengidentifikasi penyakit ikan yang disebabkan oleh bakteri *E. tarda*. Deteksi penyakit bakterial pada ikan yang disebabkan oleh bakteri *E. tarda* sejauh ini masih mengandalkan teknik isolasi dan identifikasi secara mikrobiologis. Pengujian ini dirasakan membutuhkan waktu yang cukup panjang, sehingga diperlukan metode deteksi yang lebih akurat, cepat dan mempunyai sensitifitas yang tinggi. Salah satu teknik peka dan akurat dalam deteksi infeksi *E. tarda* yang dapat digunakan adalah teknik immunohistokimia (IHK).

Teknik immunohistokimia mempunyai sensitifitas, spesifitas yang tinggi dan cepat; metode ini mampu mendeteksi antigen pada sediaan jaringan dengan menggunakan antibodi spesifik yang diberi tanda sehingga lokasi ikatan antibodi-antigen dapat diamati dengan menggunakan mikroskop (Ramos & Vara, 2005), namun demikian teknik ini hingga saat ini masih belum digunakan dalam membantu deteksi dan diagnosis penyakit akibat infeksi *E. tarda* di lapangan karena ketersediaan antibodi spesifik terhadap *E. tarda* yang masih sulit didapat. Berkaitan dengan kendala di atas, maka tujuan dari studi ini adalah untuk mengetahui deteksi *E. tarda* secara immunohistokimia pada ikan patin yang terinfeksi *E. tarda*.

Bahan Dan Metode

Isolat Bakteri

Bakteri *E. tarda* yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat yang berasal dari Balai Besar Karantina Ikan (BBKI) Soekarno Hatta, yang didapat dari hasil isolasi dari sampel ikan patin yang dilalulintaskan melalui BBKI Soekarno – Hatta tahun 2007. Bakteri disolasi pada media *Triptic Soy Broth* (TSB) dengan inkubasi selama 24 jam pada suhu 25°C. Selain karakterisasi berdasarkan morfologi dan biokimia juga dilakukan sequencing gen 16S rRNA bakteri *E. tarda* dan dibandingkan dengan sequen yang sama dari bakteri *E. tarda* yang tersimpan di genbank.

Ikan Percobaan

Ikan patin (*Pangasius pangasius*) yang digunakan berasal dari lokasi budidaya ikan “Mina Tirta” yang terdapat di daerah Cimanggis – Depok yang dipelihara dalam karamba jaring apung dengan sistem perairan tertutup (waduk). Sebanyak 20 ekor patin (*Pangasius* sp.) berukuran 15 – 20 cm dibagi dalam dua kelompok yaitu kelompok infeksi dan kelompok non-infeksi (kontrol negatif), semua ikan dipelihara dalam akuarium sesuai standar

pemeliharaan yang berukuran 70 x 40 x 50 cm. Air yang digunakan adalah air tanah bervolume 70 liter yang telah melalui proses penyaringan (filtrasi). Selama pengujian ikan diberikan pakan dan aerasi cukup untuk kelangsungan hidupnya

Pada kelompok infeksi (I), ikan diinfeksi dengan bakteri *E. tarda* secara intraperitoneal dengan konsentrasi bakteri 10⁸ sel/ml; sedangkan kelompok kontrol negatif (K) tidak diinfeksi. Gejala klinis yang timbul diamati pada hari ke-3, 5 dan 7 pasca infeksi (PI). Pada hari ke 7 PI seluruh ikan baik ikan kelompok infeksi dan kontrol negatif dibunuh, kemudian dilakukan nekropsi dan diamati semua perubahan patologi anatomi (makroskopis) yang terjadi. Organ target (insang, ginjal, hati, limpa, isi perut) diambil secara aseptis dengan ketebalan 0.5 cm guna proses lebih lanjut untuk pengujian PCR dan histopatologis. Untuk pengujian histopatologis semua jaringan dari organ target difiksasi dalam larutan 10% Neutral Buffer Formalin (NBF).

Teknik Histopatologi

Semua organ yang sudah difiksasi dalam larutan 10% Neutral Buffer Formalin (NBF) kemudian diproses untuk pembuatan sediaan histopatologi menurut cara (Humason 1967). Sediaan kemudian diwarnai dengan pewarna umum Hematoksilin dan Eosin (HE). Sebagian sediaan lainnya kemudian diwarnai secara imunohistokimia menggunakan antibodi terhadap *E. tarda*.

Teknik Imunohistokimia (IHK)

Preparasi slide sebelum digunakan untuk IHK mulai dari deparafinasi hingga rehidrasi dilakukan sesuai cara Humason (1967). Jaringan organ target dari sediaan histologi direaksikan dengan antibodi primer terhadap *E. tarda* yang berasal dari AbCam Cat ab 54204 selama 30 – 60 menit. Reaksi positif berwarna coklat divisualisasikan dengan sistem kompleks IHK yang berasal dari Zymed Invitrogen Cat 95-9643. Semua prosedur IHK yang dilakukan sesuai dengan petunjuk dari Kit yang digunakan (Zymed Invitrogen). Sediaan jaringan kemudian diwarnai dengan Hematoksilin sebagai *counter stain*. Setelah melalui proses dehidrasi dan penjernihan sediaan siap untuk diamati dengan menggunakan mikroskop.

Hasil Dan Pembahasan

Pemeriksaan Awal Isolat

Pada pemeriksaan awal, isolat bakteri *E. tarda* (biotype 2) yang didapat dari BBKI Soekarno – Hatta dikultur kembali pada media tumbuh *Triptic*

Soy Agar (TSA) kemudian diinkubasi pada suhu 25°C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh selanjutnya dilakukan karakterisasi sesuai dengan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (1994). Hasil karakterisasi menunjukkan kemiripan 93% dengan acuan dalam *Bergey's Manual*, yaitu dari 30 karakter yang diujikan hanya 28 karakter yang hasilnya sama dengan acuan. Perbedaan uji terlihat pada uji mannitol dan arabinose. Namun secara definitif karakter yang sangat menentukan bagi bakteri *E. tarda* sudah sesuai yaitu adanya produksi H₂S dan indol yang positif. Seperti yang telah dilakukan oleh Ismail *et al.*, (2005) karakter bakteri *E. tarda* serupa dengan gram negatif, aerobik, motil, positif pada indol, produksi H₂S dan negatif pada oksidase dan VP.

Hasil sequencing gen 16S rRNA bakteri *E. tarda* kemudian dibandingkan dengan sequen yang

sama dari bakteri *E. tarda* yang tersimpan di genbank, dan berdasarkan sequen gen 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat *E. tarda* yang didapat dari BBKI Soekarno - Hatta memiliki tingkat kesamaan sequen 99-100% dengan strain *E. tarda* yang tersimpan di genbank (Tabel 1). Dari hasil penelusuran dalam pohon filogenetik juga diketahui bahwa kekerabatan dari *E. tarda* yang digunakan dalam uji coba ini sangat dekat dengan *Edwardsiella* sp. dan strain *E. tarda* yang sudah ada di dunia. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar *E. tarda*, baik dari segi fenotif maupun molekulernya. Menurut Madigan & Martindo (2006) dengan tingkat kesamaan (similiritas) sequen gen 16S rRNA lebih dari 97% sudah dapat diterima sebagai satu spesies.

Tabel 1. Homologi sequen gen 16S rRNA bakteri *E.tarda* dalam ujicoba ini dengan sequen bakteri sejenis yang tersimpan di genbank

No.	Sampel	Max Ident
1	<i>E. tarda</i> 16S ribosomal RNA gene	99%
2	<i>E. tarda</i> strain TX1 16S ribosomal RNA gene	99%
3	<i>E. tarda</i> strain SMW7 16S ribosomal RNA gene	99%
4	<i>E. tarda</i> strain QL-S 16S ribosomal RNA gene	99%
5	<i>E. tarda</i> strain HC010907-1 16S ribosomal RNA gene	99%
6	<i>E. tarda</i> CW-7 16S ribosomal RNA gene	99%
7	<i>E. tarda</i> isolat LH031120-1 16S ribosomal RNA gene	100%
8	<i>E. tarda</i> gene for 16S rRNA strain:E381	99%
9	<i>E. tarda</i> gene for 16S rRNA strain:NE8003	99%
10	<i>E. tarda</i> gene for 16S rRNA strain:NB8031	99%
11	<i>E. tarda</i> 16S ribosomal RNA gene	99%
12	<i>E. tarda</i> strain LTB-4 16S ribosomal RNA gene	99%
13	<i>E. tarda</i> strain EH-202 16S ribosomal RNA gene	99%
14	<i>E. tarda</i> strain WY28 16S ribosomal RNA gene	99%
15	<i>E. tarda</i> strain WY37 16S ribosomal RNA gene	99%

Gejala Klinis Gambaran Patologi Anatomi pada Ikan Percobaan

Gejala klinis baru mulai muncul pada hari ke-5 pasca infeksi hingga akhir pengamatan (hari ke-7) dengan ditandai timbulnya luka-luka (*ulcer*) dari "muscular" sampai "peduncle", pendarahan pada sirip anus, perut membesar, sirip geripis, *ulcer* yang terjadi menimbulkan bau (Gambar 1). Gejala

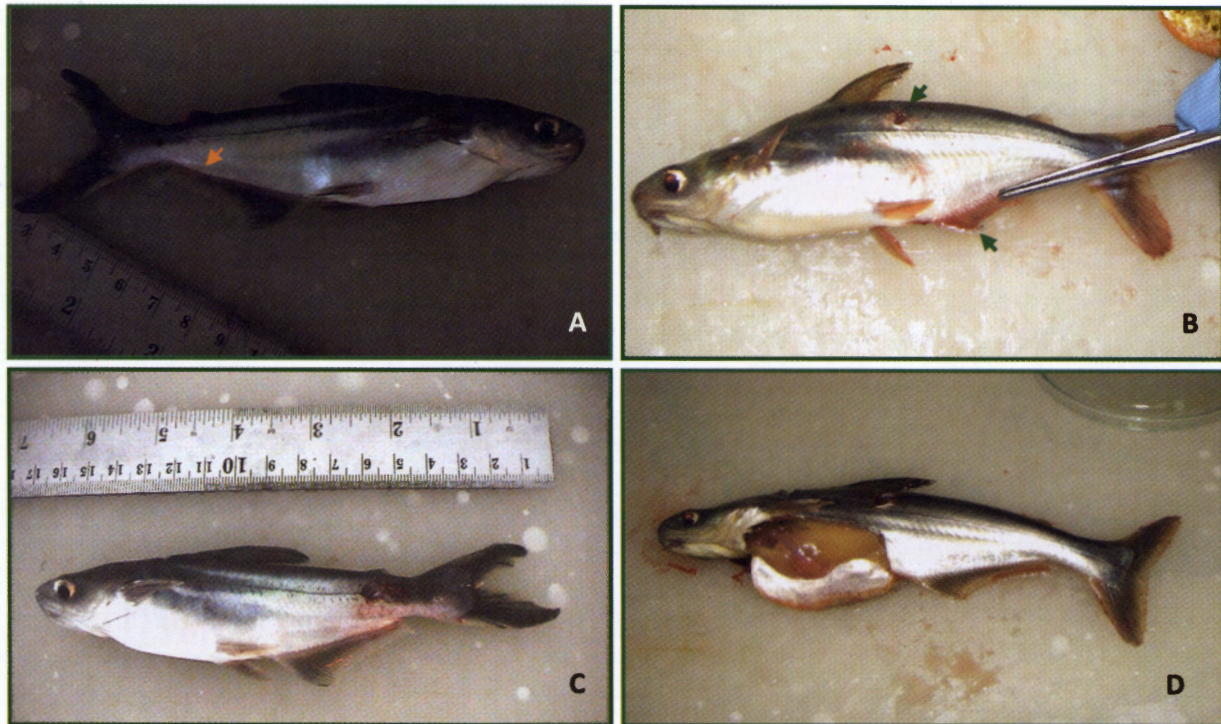
klinis tampak semakin parah dengan bertambahnya waktu. Hasil ini sesuai dengan yang lakukan oleh Ismail *et al.* (2005) pada *Oreocromis niloticus* yang diinfeksi oleh *E. tarda*, yang melaporkan bahwa gejala klinis mulai muncul setelah hari ke-7. Lesi patologi anatomi yang terjadi tampak bahwa organ interna (hati ginjal dan limpa) bengkak dan pucat (Tabel 2) dan lesio patologis yang terjadi tampak semakin hebat dengan bertambahnya waktu.

Tabel 2. Gejala klinis dan Lesio Patologi Anatomi (PA)

Hari ke-	Gejala klinis & Lesio PA organ tubuh bagian luar	Lesio PA organ tubuh bagian dalam
3	Respon mulai melemah, hemoragi pada sirip anus.	Tidak ada lesio pada organ interna
5	Respon lemah, bengkak, terdapat ulcer diatas linea lateralis, hemoragi pada sirip perut, sirip anal, dan sirip ekor	Organ interna bengkak dan pucat
7	Respon lemah, bengkak, terdapat ulcer yang lebar pada caudal peduncle, hemoragi pada sirip anus.	Organ interna bengkak dan pucat

Gejala penyakit pada ikan yang terserang biasanya ditandai dengan *small cutaneous lesions* dan berkembang menjadi *necrotic abscesses*, pembengkakan anus dan abdomen, warna kulit pucat, ginjal membesar dan adanya abses pada organ dalam. Menurut Noga (1996), gejala klinis yang ditimbulkan oleh infeksi *E. tarda* pada setiap spesies cenderung bervariasi, tetapi seringkali ditemukan kumpulan bakteri pada *inflammatory* sel dan di dalam lesi. Pada *channel catfish*, lesi dapat terlihat dengan ukuran 3 – 5 mm, berupa

bintik berwarna merah pada bagian sisi pedungula kaudalis. Hal ini disebabkan oleh pembentukan *festulas* sampai ke dalam otot yang melebar dari bagian subdermal. Adanya nekrosis likuefaktif *malodorous* dan *petechia* yang disebabkan karena produksi H_2S dari bakteri tersebut. Bila dilihat dari perilaku ikan, nafsu makan ikan semakin bertambah walaupun serangan bakteri dalam kondisi akut. Ikan yang paling sering terinfeksi adalah ikan besar ukuran lebih dari 40 cm, yang umumnya adalah ikan indukan (*broodfish*) (Noga, 1996).



Gambar 1. Gambaran klinis dan patologis ikan yang terinfeksi *E. tarda*. 3 hari pasca infeksi menunjukkan perdarahan pada pangkal sirip anus (panah) (A); pasca infeksi hari ke-5 menunjukkan adanya *ulcer* dibagian *linea lateralis*, perdarahan pada pangkal sirip anus, sirip perut dan sirip ekor (panah) (B); pasca infeksi hari ke-7 menunjukkan adanya *ulcer* yang lebar pada *caudal peduncle* dan perdarahan pada sirip anus (C); lesi patologi anatomi organ dalam membengkak dan warna agak pucat (D).

Tiga spesies enterobacter dari dua genus *Edwardsiella* dan *Yersinia* merupakan penyakit yang penting bagi ikan. *E. ictaluri* dan *E. tarda* dapat menyebabkan pendarahan akut dan kondisi abses, terutama untuk *catfish* dan *eels* (Frerichs and Millar, 1993). *Edwardsiella tarda* adalah bakteri yang menyebabkan penyakit Edwardsiellosis pada ikan. Bakteri ini merupakan bakteri sistemik yang dapat menyerang ikan dalam berbagai tingkatan dan memiliki distribusi pada air tawar maupun air laut (Austin & Austin, 1999). Menurut Joo Oh and Kyu Chun (1989), edwardsiellosis disebabkan oleh bakteri septisemik yang seringkali menyerang akibat dari rendahnya kualitas air dan tingkat stressing yang tinggi. Menurut Plumb (1993), *E. tarda* dapat menginfeksi reptil, amphibi, mamalia laut dan ikan berdarah panas lainnya. Bakteri ini juga pernah dilaporkan menyerang ikan ekonomis penting seperti ikan patin (*channel catfish*), Ikan

kakap (*striped bass*), sidat, dan ikan tilapia pada area geografis yang berbeda (Plumb, 1993). Bakteri ini patogenik terhadap sidat, *catfish*, dan hewan lainnya juga merupakan patogen yang *opportunistic* terhadap manusia (Holt *et al.*, 1994).

Gambaran Histopatologi dan Imunohistokimia

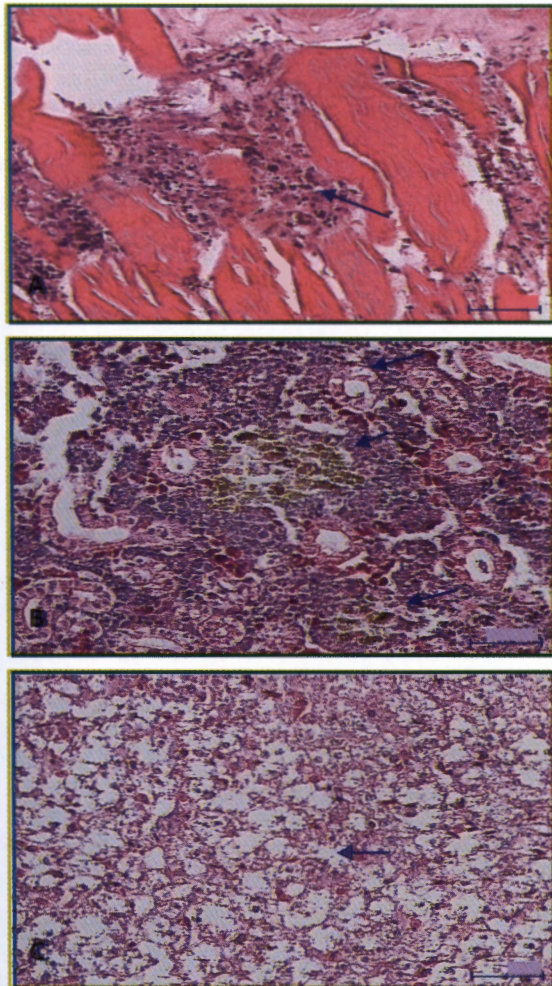
Pengamatan histopatologi dengan menggunakan pewarnaan H&E menunjukkan bahwa perubahan patologis akibat infeksi *E. tarda* pada jaringan otot tampak adanya area nekrotik disertai dengan infiltrasi sel-sel radang yang hebat, demikian pula pada organ internal seperti hati, ginjal dan otot sudah mulai muncul pada hari ke-3 (Tabel 3). Hal ini ditunjukkan dengan munculnya nekrosis pada hati, nekrosis sel epitel tubulus dan melanomakrofag pada ginjal. Pada hari ke-5 dan ke-7 kerusakan jaringan hati ditandai dengan area nekrosis serta

vakuolisasi, demikian pula pada ginjal dan otot lesio tampak semakin berat (Gambar 2). Penelitian yang dilakukan oleh Ismail *et al* (2005) pada ikan *Oreochromis niloticus* juga mendapatkan bahwa

gejala perubahan patologis akibat infeksi *E. tarda* ditunjukkan dengan adanya nekrosis pada hati, nekrosis sel epitel pada tubulus dan degenerasi hidrofik pada ginjal, adanya melanomakrofag pada limpa, dan infiltrasi limfosit pada otot.

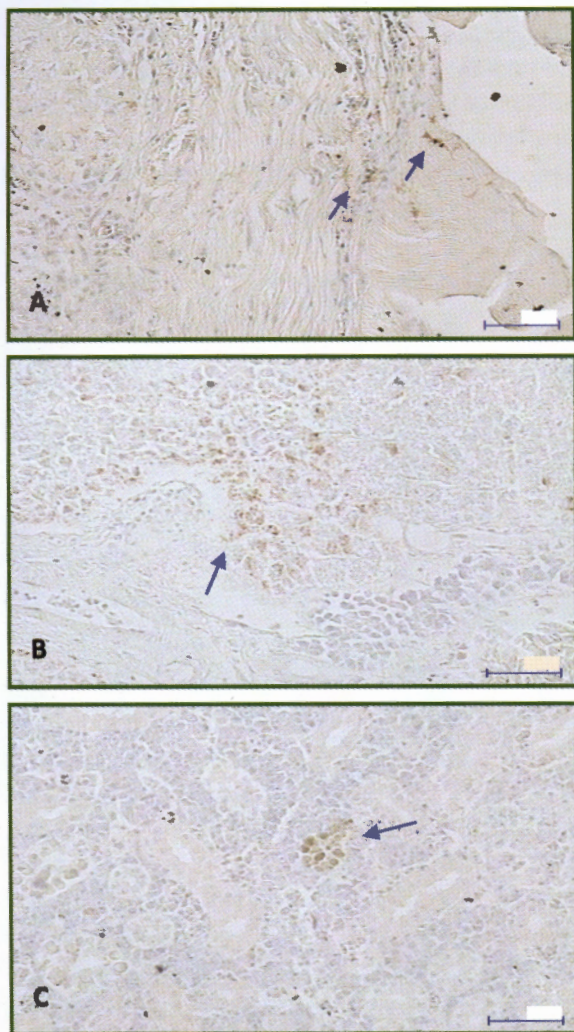
Tabel 3. Lesio Histopatologi dan Hasil Immunohistokimia Pada Organ Internal.

Hari ke-	Organ target	Lesio Histopatologi	Reaksi Immunohistokimia
3	Ginjal	Nekrosis sel epitel dan melanomakrofag.	Positif
	Hati	Nekrosis dan melanomakrofag.	
	Otot	Peradangan dan nekrosis	
5	Ginjal	Nekrosis sel epitel, melanomakrofag dan eosinofilik	Positif
	Hati	Nekrosis, degenerasi hidrofik dan melanomakrofag pada pankreas.	
	Otot	Nekrosis dan infiltrasi limfosit	
7	Ginjal	Nekrosis sel epitel, melanomakrofag dan eosinofilik.	Positif
	Hati	Nekrosis dan melanomakrofag.	
	Otot	Nekrosis dan infiltrasi limfosit.	
	Limpa	Hemoragge dan melanomakrofag	



Gambar 2. Lesio histopatologis pada jaringan otot tampak adanya infiltrasi sel-sel radang dan daerah yang mengalami nekrosis, pasca infeksi hari ke-3 (A); pada jaringan ginjal tampak sel epitel tubulus mengalami nekrosis dan banyak ditemukan melanomakrofag pasca infeksi hari ke-3 (B); hati mengalami nekrosis dan vakuolisasi pasca infeksi hari ke-7 (C); (H&E, Bar 40 µm)

Gambaran hasil analisis imunohistokimia tampak bahwa reaksi positif dengan ditandai adanya warna coklat pada jaringan sediaan histopatologis otot dan organ internal lainnya. Reaksi yang intens terdeteksi hampir pada semua jaringan ikan yang terinfeksi mulai pada pasca infeksi hari ke-3 hingga hari ke-7 (Gambar 3). Gambaran ini menunjukkan bahwa terjadi reaksi spesifik antara antibodi yang digunakan dengan antigen *E. tarda* yang berada di dalam jaringan. Hasil pengamatan imunohistokimia kami sejalan dengan hasil studi yang dilakukan oleh Pirarat *et al.* (2007) pada ikan Tilapia dengan menggunakan metode IHK untuk mendeteksi adanya *E. tarda*.



Gambar 3. Reaksi positif imunohistokimia (IHK) pada jaringan otot pasca infeksi hari ke-7, tampak reaksi berwarna coklat (panah) (A); antigen *E. tarda* terdeteksi di dalam sel hati pasca infeksi hari ke-5 (panah) (B); reaksi positif dalam jaringan ginjal pasca infeksi hari ke-3 (C); (Bar 40 µm).

Berdasarkan dari hasil keseluruhan data yang diperoleh maka dapat ditarik kesimpulan bahwa *E. tarda* dapat dideteksi menggunakan metode histopatologi terutama imunohistokimia yang dapat digunakan sebagai metode standar dalam menentukan diagnosa penyakit edwardsiellosis pada ikan akibat infeksi bakteri *Edwardsiella tarda*.

Daftar Pustaka

Anonim. (2008) *IHC-Paraffin Protocol (IHC-P)*. Abcam Corporation. Cambridge UK.

Baya, A.M., Romalde, D.L., Green, D.E., Navaro, R.B., Evans, J., May, E.B., and Toranzo, A.E. (1997) Edwardsiellosis in Wild Striped Bass From The Chesapeake Bay. *Journal of Wildlife Diseases*, Vol: 33 (3) (517-525).

Bevelander, G., and Judith, A.R. (1988) *Dasar-dasar Histologi*. Edisi ke-8. Erlangga. (2-3).

Elliot, D. (2005) Applying Immunohistochemistry & Reverse Transcription PCR to Intervertebral Disc Degeneration In An Animal Model. *SUNFEST Technical Report*.

Ismail, S.G.M., Galal, N.F., Khalil, R.H., and Soliman, M.K. (2005) Studies On Edwardsiella Infection In *Oreochromis niloticus*. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. Vol : 31 (460-471)

Pirarat, N., Katagiri, T., Maita, M., Endo, M., and Sailasuta, A. (2008) Distribution of *Edwardsiella tarda* Antigens and IgM Containing Cells in Tilapia Immune Organs during Septicemia: an Immunohistochemical Study. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, Vol : 38 (45-52)

Pressley, M.E., Phelan III, P.E., Witten, P.E., Mellon, M.T., and Kim, C.H. (2004) Pathogenesis and inflammatory response to *Edwardsiella tarda* infection in the zebrafish. *Development & Comparative Immunology*, Vol : 29 (501-513).

Ramos, J.A., and Vara. (2005) Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Vet Pathol*, Vol : 42 (405-426)

Sahoo, P.K., Swain, P., Sahoo, S.K., Mukherjee, S.C., and Sahu, A.K. (2000) Pathology Caused by the Bacterium *Edwardsiella tarda* in *Anabas testudineus (bloch)*. *Asian Fisheries Science*, Vol : 13 (357-362).

Savan, R., Igarashi, A., Matsuoka, S., and Sakai, M. (2004) Sensitive and Rapid Detection of Edwardsiellosis in Fish by a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol : 70 (621-624)

Swain, P., Mukherjee, S.C., Sahoo, P.K., Das, B.K., Pattnaik, P., Murjani, G., and Nayak, S.K. (2001) Dot-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Dot-ELISA) for the Diagnosis of *Edwardsiella tarda* infection in Fish. *Asian Fisheries Science*, Vol : 14 (89-93).

Anonim. (2005) *Manual Zymed LAB-SA Detection System*. Invitrogen Corporation.

Wasito, R. (1997) *Pengembangan Antibodi Beberapa Hama dan Penyakit Ikan Karantina Untuk Diagnosa dan Identifikasi Secara Cepat, Akurat dan Standar*. Seminar Karantina Ikan, Manado, (1-16)