

DETEKSI PENYAKIT *MOTILE AEROMONAS SEPTICEMIA* PADA IKAN PATIN SIAM (*PANGASIVS HYPOPHthalmus*) MENGGUNAKAN METODE ELISA

DISEASE DETECTION OF *MOTILE AEROMONAS SEPTICEMIA* AT SIAMESE CATFISH (*PANGASIVS HYPOPHthalmus*) USING ELISA METHOD

Herlina Maulina^{1a}, Mulyana¹, Angela M. Lusastuti²

^{1a,1} Jurusan Perikanan, Fakultas Pertanian, Universitas Djuanda Bogor
Jl. Tol Ciawi No.1, Kotak Pos 35, Kode Pos 16720

²Kepala Peneliti Kesehatan Ikan, Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar (BPPBAT) Bogor.

Korespondensi: Herlina Maulina, E-mail: h.maulinaa@gmail.com

ABSTRACT

This study was conducted to determine the prevalence of Motile Aeromonas Septicemia of Siamese catfish farming at Cibereum Subdistrict, Ciseeng Subdistrict, Kemang Subdistrict, and Parung Subdistrict (in Bogor Region) using antigen supernatant with concentration of RAC 1:200 and antigen pellet with concentration of RAC 1:5,000. Samples of serum obtained from 10 Siamese catfish per district have weight 300-400 g/fish. The collection of serum as much 1-4 mL obtained from 3-5 mL of blood per fish. Collection of serum which had been collected from each district then was tested using indirect ELISA method. The indirect ELISA method use the two types of dilution of serum RAC (Rabbit Anti-Catfish) and two types of antigens, i.e dilution of RAC 1:200 with antigen supernatant (group A) and dilution of RAC 1:5000 with antigen pellet (group B). Determination of the sample area exposed to positive or negative MAS disease was known of cut-off values that has been defined as a comparison, the results of the test sample with a value of OD (Optical Density) ≤ 0.011 ; 0,015; 0.006; 0.004; 0.000; 0.005 showed positive of MAS attacked and value of OD ≥ 0.017 ; 0.025; 0.018; 0.016; 0.016; 0.014 showed negative of MAS attacked. The results of research showed the prevalence 60-100% on RAC 1:5,000 dilution with antigen pellet, and the prevalence 20-60 % on RAC 1:200 dilution with antigen supernatant.

Keywords: *Motile Aeromonas Septicemia*, ELISA, *Cut-off*, Siamese Catfish

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui metode ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) sebagai metode pendeteksi penyakit MAS (*Motile Aeromonas Septicemia*) pada ikan patin siam (*Pangasivus hypophthalmus*) secara cepat dan tepat. Sampel uji diperoleh dari 4 kecamatan berbeda (Cibereum, Ciseeng, Kemang dan Parung) di Kabupaten Bogor sebagai sentra budidaya ikan patin. Sebanyak 10 sampel ikan uji dari setiap kecamatan (total 40 ekor ikan, rataan bobot ikan 300 – 400 gram/ekor). Darah ikan patin siam diambil sebanyak 3-5 mL/ekor ikan melalui *vena caudalis*. Diperoleh sebanyak 1-4 mL serum. Koleksi serum yang telah terkumpul dari setiap kecamatan diuji menggunakan metode ELISA untuk mengetahui daerah sampel di Kabupaten Bogor yang terpapar bakteri *Aeromonas hydrophila* penyebab penyakit MAS dengan prevalensi tinggi, pada tahap pengujiannya menggunakan serum RAC pengenceran 1:200 Antigen supernatan sehingga diperoleh nilai prevalensi 20-60%, sedangkan pada RAC pengenceran 1:5000 dengan Antigen pelet nilai prevalensi berkisar 60-100%. Penentuan daerah sampel positif terpapar atau negatif terpapar *A. hydrophila*, diketahui dari nilai (*cut-off*) yang telah ditentukan, jika nilai sampel

pada setiap lubang $\leq 0,011$; 0,015; 0,006; 0,004; 0,000; 0,005 maka sampel dinyatakan positif terserang *Aeromonas hydrophila* dan bernilai $\geq 0,017$; 0,025; 0,018; 0,016; 0,016; 0,014 sampel dinyatakan negatif *Aeromonas hydrophila*.

Kata Kunci : *Aeromonas hydrophila*, ELISA, Cut-off, patin Siam

Herlina Maulina et.al. 2015. Deteksi Penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* Pada Ikan Patin Siam (*Pangasius Hypophthalmus*) Memnggunakan Metode Elisa. Jurnal Mina Sains 1 (2) : 39-47.

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Ikan patin merupakan salah satu jenis ikan air tawar yang bernilai ekonomis di Indonesia dan merupakan komoditas perikanan yang sangat diandalkan di daerah-daerah seperti Sumatera Selatan, Jambi dan Riau (Setijaningsih *et al.* 2006 dalam Fitriani 2009). Untuk wilayah Bogor, Dinas Peternakan dan Perikanan Kabupaten Bogor menerangkan bahwa produksi ikan patin pada tahun 2011 mencapai 2.570 ton dan pada tahun 2012 mengalami kenaikan produksi hingga mencapai 2.645 ton. Komoditas ikan patin siam (*Pangasius hypophthalmus*) merupakan salah satu spesies ikan air tawar yang mendominasi budidaya jenis ikan patin, baik dalam ukuran benih maupun konsumsi.

Dalam memenuhi permintaan produk perikanan yang terus mengalami peningkatan, penerapan intensifikasi budidaya harus dilakukan. Namun, keberhasilan suatu usaha budidaya tidak terlepas dari masalah serangan hama dan

penyakit. Meskipun jarang terjadi pada kolam-kolam yang terawat dengan baik, wabah penyakit dan parasit yang menyerang ikan dapat menimbulkan kerugian besar bagi petani ikan karena sering menyebabkan kematian secara massal. Adapun organisme penyebab penyakit yang biasa menyerang ikan umumnya berasal dari golongan jamur, virus, parasit dan hewan invertebrata lainnya (Yuliartati 2011).

Selama proses pembenihan ikan patin, kemungkinan timbulnya hama dan penyakit membahayakan dapat terjadi hingga menyebabkan kerugian materi yang cukup besar, salah satu kendala yang menghambat budidaya perikanan karena adanya kehadiran pathogen yaitu *Aeromonas hydrophila*. Bakteri ini menyebabkan penyakit MAS (*Motile Aeromonas Septicemia*) atau penyakit bercak merah. Bakteri ini menyerang berbagai jenis ikan air tawar seperti lele dumbo (*Clarias gariepinus*), ikan mas (*Cyprinus carpio*), gurami (*Osphronemus gouramy*) dan udang galah

(*Macrobrachium rosenbergii*) (Angka *et al.* 1995). Bakteri tersebut dapat menimbulkan penyakit dengan tingkat kematian yang tinggi 80-100% dalam waktu 1 - 2 minggu. Terjadi kasus kematian massal pada tahun 1980 di beberapa daerah di Jawa Barat mengenai bakteri *Aeromonas hydrophila* yang menyerang ikan lele (*Clarias sp.*) (Angka *et al.* 1995).

Oleh sebab itu diperlukan tindakan pengawasan yang tepat dalam mendeteksi masalah ini, yang dilakukan melalui pengujian laboratorium. Standar pengujian laboratorium salah satunya menggunakan metode kultur atau biakan pada media agar (BAM 2006 *dalam* Zainuddin 2009). Metode ini membutuhkan waktu yang cukup lama, serta menggunakan berbagai uji. Untuk itu diperlukan metode pengujian yang cepat untuk mendeteksi penyakit MAS, salah satu diantaranya adalah metode ELISA sebagai uji serologis yang bekerja dengan cara mendeteksi adanya ikatan antigen-antibodi pada sampel uji.

Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui metode ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) sebagai metode cepat dan tepat untuk mendeteksi dan mengetahui nilai prevalensi terpaparnya penyakit MAS (*Motile Aeromonas Septicemia*).

MATERI DAN METODE

Penelitian ini menggunakan metode survei (lapangan) dan metode eksperimental yang mengacu pada panduan tahapan pengerjaan ELISA di Laboratorium Kesehatan Ikan BPPBAT Bogor, pada bulan Maret hingga April 2013.

Bahan yang diperlukan yaitu sampel ikan patin dari 4 kecamatan di Kabupaten Bogor, masing-masing 10 ekor sampel per kecamatan, 5 ekor ikan sampel yang dijadikan sebagai standar *cut-off* positif dan negatif, isolat bakteri AH₂₆, media TSA (*Tryptic Soya Agar*), larutan Saline 0,845%, antigen jenis pelet dan supernatan, antibodi sampel, serum *Rabbit Anti-Catfish* RAC pengenceran 1:5000 dan 1:200, *peroksidase conjugate anti-rabbit IgG*, *carbonat-bicarbonat buffer* pH 9,6, *Bovine Serum Albumin*, *Sigma* (BSA) 3%, *Phosphate Buffer Saline-Tween* (PBS-T) pH 7,4 dan PBS-T pH 7,2, TMB-ELISA serta H₂SO₄ 1 M. Sedangkan peralatan yang diperlukan antara lain spuit, tabung vakum dan rak, tabung *eppendorf*, *refrigerator*, akuarium, cawan petri, *freezer*, sentrifus, *sonifier*, *vortex stirrer*, *Laminar Air Flow* (LAF), alat ELISA, *marker* dan label.

Ikan patin yang akan dideteksi diambil secara *stratified random sampling* yaitu dengan mendata sentra petani

budidaya ikan patin pada 4 Kecamatan di Kabupaten Bogor, yaitu Kecamatan Parung (Pr), Kecamatan Ciseeng (Cs), Kecamatan Kemang (Km) dan Kecamatan Cibereum (Cb). Diperlukan 10 ekor ikan sampel dari masing-masing kecamatan, 3 ekor sebagai *cut-off positif*, 3 ekor sebagai *cut-off negatif*. Ikan yang dijadikan *cut-off negatif* diamati secara fisiologis, dengan penampang tubuh yang tidak menunjukkan tanda-tanda terserang *Aeromonas hydrophila*, dipisahkan dan disimpan di dalam akuarium. Sedangkan, ikan yang dijadikan *cut-off positif* disuntik menggunakan 0,1 mL bakteri *Aeromonas hydrophila* hingga tampak gejala klinis. Ikan patin diambil darahnya melalui *vena caudalis* sebanyak 3 - 5 mL. Serum dipisahkan dan disimpan pada suhu -20°C .

Bakteri *Aeromonas hydrophila* ditumbuhkan pada media TSA selama 24 jam. Kemudian, dilakukan pemanenan dari 1 (satu) cawan ke dalam 10 mL larutan *Saline* 0,845%. Sonikasi dengan frekuensi 40 Hz selama 5 menit (*on ice*), hasil sonikasi disentrifus selama 60 menit, pada kecepatan $3000 \times g$, 4°C . Uji ELISA yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan metode *indirect* ELISA melalui beberapa tahapan diantaranya: 100 μL antigen (pelet/supernatan dan larutan *saline* 0,845%) dimasukkan ke 8 sumur *microtiter plate* berbahan polistiren,

selanjutnya ditambahkan 100 μL *Carbonat-bicarbonat Buffer* dengan pH 9,6 ke masing-masing sumur yang telah dilapisi antigen sebelumnya, ditutup menggunakan *aluminium foil*. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 4°C . Selanjutnya larutan dibuang, *microtiter plate* ELISA dicuci menggunakan PBS-T dengan pH 7,4 dan sumur dikeringkan. Kemudian ditambahkan 3% BSA sebanyak 200 μL ke dalam masing-masing sumur, ditutup menggunakan *aluminium foil* inkubasi selama 60 menit pada suhu 25°C . Larutan dibuang dan *microtiter* ELISA dicuci kembali menggunakan PBS-T pH 7,4. Setelah proses pencucian dan pengeringan, ditambahkan sebanyak 100 μL PBS-T pH 7,2 ke dalam masing-masing sumur kemudian ditambahkan sampel serum (antibodi sampel) ikan patin yang dilarutkan dalam PBS-T pH 7,2 dengan pengenceran 1:50 sebanyak 100 μL ke sumur pertama pada setiap *microplate*, kemudian dilakukan *serial dilution*, diinkubasi selama 60 menit pada suhu 25°C , sumur ditutup menggunakan *aluminium foil*. Larutan dibuang dan *microtiter plate* ELISA dicuci dengan PBS-T pH 7,4 kemudian dikeringkan. Tahap selanjutnya, serum RAC pengenceran 1:200 antigen jenis supernatan yang dilarutkan dalam PBS-T pH 7,2 dimasukkan ke dalam masing-

masing sumur sebanyak 100 µl (pada sampel uji antigen jenis supernatan) dan sebanyak 100 µl serum RAC pengenceran 1:5000 dalam PBS-T pH 7,2 dimasukkan ke dalam masing-masing sumur (pada sampel uji antigen jenis pelet), sumur ditutup menggunakan *aluminium foil*. Dilakukan inkubasi selama 60 menit pada suhu 25°C. Larutan dibuang kembali dan *microtiter plate* ELISA dicuci menggunakan PBS-T pH 7,4 kemudian dikeringkan. Setelah proses pengeringan *microtiter plate*, ditambahkan 100 µl *peroksidase conjugate anti-rabbit IgG* dengan pengenceran 1:5000 ke dalam masing-masing sumur kemudian ditutup menggunakan *aluminium foil*, inkubasi selama 60 menit pada suhu 25°C. Selanjutnya larutan dibuang, diikuti pencucian *microtiter plate* ELISA menggunakan PBS-T pH 7,4 kemudian dikeringkan.

Ditambahkan *one step ultra TMB-ELISA* sebanyak 100 µl ke dalam masing-masing sumur, kemudian sumur ditutup menggunakan *aluminium foil*, inkubasi selama 20 menit pada suhu 25°C. Untuk blanko ditambahkan terlebih dahulu 100 µl, 1 M H₂SO₄ diinkubasi selama 20 menit kemudian ditambahkan TMB-ELISA. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 100 µl, 1M H₂SO₄ ke semua sumur. Kemudian dilakukan pembacaan

menggunakan ELISA *strip reader* tipe EL 301 dengan panjang gelombang 405 nm. Hasil pembacaan berupa nilai kerapatan optik (OD) sebagai data numerik yang akan mempresentasikan kadar ikatan antibodi dengan antigen dalam sampel serum.

Proses yang dilakukan pada tahap di atas, diterapkan pada tahap penentuan *cut-off positif* dan *negatif* yang dijadikan sebagai standar acuan deteksi menggunakan ELISA. Hanya saja, serum yang digunakan berasal dari ikan patin yang diinfeksi *A. hydrophila* sebagai kontrol positif dan serum ikan patin tanpa infeksi sebagai kontrol negatif (*cut-off*). Nilai akhir yang diperoleh dari pembacaan ELISA absorbansi 405 nm.

Sampel ikan yang menunjukkan hasil positif *Aeromonas hydrophila* penyebab penyakit MAS berdasarkan standar acuan *cut-off positif* dan *negatif*, prevalensinya dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

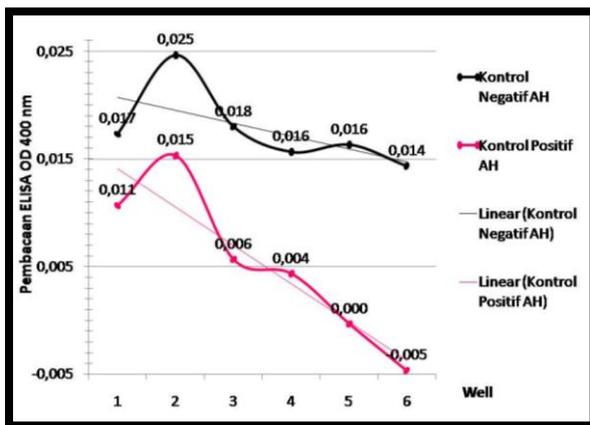
$$\text{Prevalensi} = \frac{\text{Jumlah Ikan Sakit}}{\text{Jumlah Populasi}} \times 100\%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Jumlah sampel ikan patin dari masing-masing Kecamatan sebanyak 10 ekor ikan, dengan total bobot satu kecamatan sebesar 3 - 4 kg dan bobot rata-rata ikan adalah 300 – 400 gram. Total darah yang diperoleh berkisar antara 37,5 -

52,0 mL dari masing-masing kecamatan. Darah yang diambil sebanyak 3 – 5 mL per ekor ikan, diperoleh $\pm 1 - 4$ mL serum.

Sampel ikan yang dijadikan standar *cut-off positif* dan *negatif* sebanyak 3 ekor dengan bobot rata-rata 300 – 400 gram per ekor ikan, diperoleh 1 - 4 mL serum per ekor. Hasil pembacaan berupa rata-rata nilai kerapatan optik (OD) dari 3 sampel, terdiri dari 6 sumur yang dijadikan sebagai *cut-off*, acuan batas standar terpaparnya *A. hydrophila* pada masing-masing sampel, disajikan dalam bentuk grafik (Gambar 1).



Gambar 1 Grafik nilai rata-rata (*cut-off*) kontrol negatif *Aeromonas hydrophila* (garis hitam) dan positif *Aeromonas hydrophila* (garis merah muda).

Nilai rata-rata OD dari sampel masing-masing kecamatan berada di bawah garis merah muda (pada gambar) atau nilai sampel $\leq 0,011$; $0,015$; $0,006$; $0,004$; $0,000$; $0,005$ maka sampel tersebut dinyatakan positif terserang *Aeromonas hydrophila* dan bernilai $\geq 0,017$; $0,025$; $0,018$; $0,016$; $0,016$; $0,014$ atau berada di atas garis hitam, maka sampel tersebut dinyatakan negatif *Aeromonas hydrophila*.

Hasil pembacaan dari masing-masing sampel kecamatan, menunjukkan kisaran angka yang berbeda-beda dapat dilihat pada Tabel Lampiran 1 dan Tabel Lampiran 2).

Pengujian sampel menggunakan metode ELISA tidak langsung (*indirect ELISA*) melalui empat tahapan yang perlu dilakukan. Tahap pertama, antigen yang telah dibuat dilekatkan dalam sumur, selanjutnya ditambahkan sampel (antibodi sampel), jika sampel mengandung antibodi maka akan terjadi ikatan antara antigen dengan antibodi sampel. Tahap pencucian, bertujuan untuk membuang materi yang tidak diperlukan yang masuk ke dalam sumuran dan menghilangkan antigen atau antibodi yang tidak berikatan. Tahap penambahan konjugat, konjugat merupakan antibodi yang dilabel dengan enzim, florokrom atau reagen lainnya yang jika bereaksi akan menghasilkan warna, konjugat akan berikatan dengan antibodi dan kelebihan akan terbuang pada pencucian berikutnya, konjugat yang digunakan dalam uji ini yaitu *Peroksidase conjugate anti-rabbit*. Selanjutnya penambahan substrat, dimana penambahan substrat tergantung pada jenis konjugatnya karena substrat bersifat peka terhadap cahaya maka inkubasi proses tersebut

dilakukan dalam keadaan gelap yaitu dengan menutup seluruh permukaan lempeng sumuran menggunakan *aluminium foil* dan pada suhu ruangan antara 24°C - 26°C. Jika konjugat yang digunakan bereaksi dengan ikatan antigen-antibodi, maka enzim dalam konjugat mampu membuat kromogen pada substrat yang akan menghasilkan perubahan warna, yang dapat dideteksi secara visual dan diukur menggunakan alat yang bekerja seperti spektrofotometer.

Semakin kuat warna yang dihasilkan, menunjukkan ikatan antibodi sampel semakin tinggi, sedangkan semakin lemah warna yang dihasilkan menunjukkan adanya sedikit substrat yang bereaksi, hal ini diakibatkan sedikit sekali konjugat yang berikatan dengan ikatan antigen-antibodi sehingga menunjukkan nilai OD (*Optical Density*) rendah.

Deteksi penyakit terhadap *Motile Aeromonas Septicemia* yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila*, dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 405 nm, menunjukkan tingkat keterpaparan terhadap *Aeromonas hydrophila* yang berbeda-beda di setiap sampel daerah. Pada hasil uji tahap penggunaan RAC Poliklonal dengan pengenceran 1:5000 berupa antigen pelet menunjukkan keterpaparan *Aeromonas hydrophila* dengan prevalensi tinggi, berkisar antara 60% - 100%, sedangkan

penggunaan RAC Poliklonal dengan pengenceran 1:200 berupa antigen supernatan menunjukkan keterpaparan *Aeromonas hydrophila* dengan prevalensi tidak terlalu tinggi yaitu berkisar antara 20% - 60%. Hal ini dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya pada tahap penyiapan antigen meliputi asal antigen dan sifat antigennya. Materi yang digunakan berasal dari antigen bakteri, dengan perlakuan sonikasi yang diikuti dengan pemusingan untuk memisahkan komponen sel yang dibutuhkan dalam uji ELISA (Malcolm, 1995). Antigen merupakan substansi yang dapat dikenali dan diikat dengan baik oleh sistem imun, antigen bakteri yang digunakan merupakan bakteri utuh yang dirusak secara mekanis, fisik atau kimiawi seperti penggerusan, pengocokan, sonikasi, vortex homogenizer, pemanasan dengan suhu tinggi, dan pendidihan (Spencer, 1995).

Pada penelitian ini, digunakan antigen yang berasal dari bakteri *Aeromonas hydrophila*. Bakteri *A. hydrophila* menghasilkan enzim dan toksin yang dikenal dengan produk ekstraseluler atau ECP (*Extra Cellular Product*) yang mengandung sedikitnya aktivitas hemolisis dan protease, selain menghasilkan eksotoksin bakteri *A. hydrophila* dapat memproduksi endotoksin yang terdiri dari protein, lipid dan polisakarida (Angka, 2005). Untuk mendapatkan antigen pelet

dan supernatan, sebelumnya bakteri disonikasi dengan tujuan untuk memecah ikatan protein dari dinding sel bakteri sehingga dapat diekstraksi protein struktural pada bagian luar sel (*surface layer*), pemisahan bagian luar sel (*surface layer*) *A. hydrophila* sangat penting untuk menentukan tingkat kemurniannya, karena kemurnian *surface layer* sangat menentukan daya antigenitas (Bijanti, 2011), selanjutnya di sentrifus untuk mendapatkan produk pelet dan supernatan yang diperlukan dalam tahap pelapisan antigen pada ELISA. Pelet dan supernatan yang digunakan dalam uji dapat menghasilkan tingkat prevalensi yang berbeda, disebabkan produk tersebut memiliki kandungan protein yang berbeda pula, jika antigen tersebut memiliki epitop yang sama maka dapat berikatan dengan antibodi sampel pada uji ELISA serta penambahan konjugat dan substrat, sehingga menghasilkan nilai OD pembacaan yang disesuaikan dengan *cut-off*, sehingga dapat menentukan nilai prevalensi terserang *A. hydrophila* penyebab penyakit MAS di setiap daerah. (Tabel. 3).

Tabel 3 Tabel penghitungan prevalensi setiap kecamatan, perbandingan RAC 1:200 Ag supernatan & 1:5000 Ag pelet

Lokasi	Prevalensi (%)	
	RAC 1:200 Ag	RAC 1:5000 Ag

	supernatan	pelet
Kec.Cibeureum	40	100
Kec. Ciseeng	20	90
Kec. Kemang	60	70
Kec. Parung	40	60

Ag pelet memiliki tingkat prevalensi lebih tinggi dibandingkan dengan Ag supernatan. Hal ini dikarenakan di dalam pelet terkandung lebih banyak komponen sel dibandingkan dengan supernatan. Menurut Hirst (1995) bakteri mempunyai antigen permukaan yang disebut determinan virulensi yang memudahkan penempelan, penetrasi dan invasi, perlindungan terhadap pertahanan inang dan menyebabkan penyakit. Selain itu pada permukaan bakteri gram negatif juga terdapat lipopolisakarida yang merupakan sebagian besar antigen permukaan sehingga menjadi dasar untuk klasifikasi serologi berbagai spesies bakteri dan memiliki peranan penting dalam diagnosis.

KESIMPULAN

Pengenceran RAC 1:5000 antigen pelet, menunjukkan nilai keterpaparan yang lebih tinggi disetiap daerah dibandingkan penggunaan RAC 1:200 antigen supernatan.

Secara keseluruhan, kecamatan di kabupaten Bogor, telah terpapar bakteri *Aeromonas hydrophila* penyebab penyakit MAS dengan prevalensi berbeda, dengan menggunakan RAC 1:200 antigen

supernatan nilai prevalensinya berkisar antara 20 – 60%, sedangkan menggunakan RAC 1:5000 antigen pellet nilai prevalensi berkisar antara 60 - 100%.

DAFTAR PUSTAKA

- Angka SL. 2005. Kajian Penyakit *Motile Aeromonas Septicaemia* (MAS) pada Ikan Lele Dumbo (*Clarias* sp) : Patologi, Pencegahan dan Pengobatan dengan Fitofarmaka. Bogor : IPB.
- Angka SL, TJ Lam, YM Sin. 1995. Some Virulence Characteristics of *Aeromonas hydrophila* in walking catfish (*Clarias gariepinus*). *Journal Aquaculture* 130 : 103-112.
- Bijanti R, Yuliani MGA, Tyasningsih W. 2011. Antigenesity Protein of *Aeromonas hydrophila* Caused Ulcer Disease on Goldfish (*Cyprinus carpio* Linn) Using Indirect ELISA Technique. *Asosiasi Farmakologi dan Farmasi Veteriner Indonesia* [Poster-4]: 4.
- Fitrani M. 2009. *Rekayasa Lingkungan Budidaya Untuk Meningkatkan Kualitas Ikan Patin Siam: Peran Salinitas*. [Tesis]. Program Pascasarjana IPB. Bogor.
- Hirst RG. 1995. Antigen Bakteri dalam buku *Teknologi ELISA Dalam Diagnosis dan Penelitian*. James Cook University of North Queensland.
- Malcolm K. 1995. Preparasi Antigen-Pelapisan Matriks Padat dalam buku *Teknologi ELISA Dalam Diagnosis dan Penelitian*. James Cook University of North Queensland.
- Spencer TL. 1995. Pemblok, Pengencer dan Reaksi ELISA yang Menyimpang dalam buku *Teknologi ELISA Dalam Diagnosis dan Penelitian*. James Cook University of North Queensland.
- Yuliartati E. 2011. *Tingkat Serangan Ektoparasit pada Ikan Patin (Pangasius djambal) pada Beberapa Pembudidaya Ikan di Kota Makassar*. [Skripsi]. Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Zainuddin N. 2009. *Kajian Penggunaan ELISA sebagai Uji Cepat dalam Mendeteksi Salmonella spp pada Hati Sapi Impor*. [Tesis]. Program Pascasarjana IPB. Bogor.