

## Pemberian Vaksin *Ichthyophthirius multifiliis* untuk Mencegah *Ichthyophthiriasis* pada Ikan Mas

### (APPLICATION OF *ICHTHYOPHTHIRIUS MULTIFILIIS* VACCINE FOR PREVENTION OF *ICHTHYOPHTHIRIASIS* IN COMMON CARP)

Henni Syawal<sup>1</sup>, Nastiti Kusumorini<sup>2</sup>,  
Wasmen Manalu<sup>2</sup>, Ridwan Affandi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Riau

<sup>2</sup>Lab. Fisiologi, Dept. Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi.

Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

<sup>3</sup> Lab. Fisiologi Hewan Air, Dept. Manajemen Sumberdaya Perairan,

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB

Telpon : 0761-63275; Email: zeni\_ifoipb@yahoo.com

#### ABSTRAK

Penelitian tentang respons fisiologi ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang diberi vaksin *Ichthyophthirius multifiliis* dan dipelihara pada suhu media yang berbeda telah dilakukan dengan menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial. Jumlah ikan uji yang digunakan sebanyak 720 ekor dengan ukuran 5-7 cm. Pemberian vaksin *I. multifiliis* kepada ikan dilakukan secara perendaman selama 15 menit dengan dosis 3 mL<sup>-1</sup>. Selanjutnya ikan dipelihara selama 21 hari pada suhu media yang berbeda, yaitu suhu 18°C adalah suhu ruangan tanpa menggunakan *heater* dan ikan tidak diberi vaksin, sedangkan pada suhu 20, 24, dan 28°C ikan uji diberi vaksin dan pada media pemeliharaan dipasang pemanas listrik. Pada hari ke-15 setelah ikan uji diberi vaksin dilakukan uji tantang dengan *I. multifiliis* stadia *theront* dosis 5.000 sel *theront*/ekor ikan. Parameter yang diukur adalah uji immobilisasi, diferensiasi leukosit, tingkat prevalensi, dan kelulusanhidup ikan uji. Pengukuran parameter dilakukan empat kali, yaitu awal atau sebelum perlakuan (Hari ke-0), hari ke-7, ke-14, dan hari ke-21. Hasil menunjukkan bahwa ikan yang diberi vaksin dan dipelihara pada suhu media 20, 24, dan 28°C, dapat menurunkan tingkat prevalensi *I. multifiliis*, dan dapat meningkatkan kelulusanhidup ikan setelah dilakukan uji tantang. Kelulusanhidup yang tertinggi didapatkan dari perlakuan ikan yang dipelihara pada suhu 28°C, yaitu 100%.

Kata-kata kunci: *Cyprinus carpio* L, *I. multifiliis*, suhu, vaksin

#### ABSTRACT

This study was conducted to assess the physiological responses of common carp due to administration of ich vaccines and kept at different water temperatures. Completely Randomized Factorial Design was used in this study. The number and the size of the experimental fish was 720 and 5-7 cm, respectively. Fish was vaccinated by immersing the fish in water that contained 3 mL<sup>-1</sup> of ich vaccines for 15 minutes. Then, fish was kept for 21 days at various temperatures: at 18°C which was room temperature without heater and fish had not been vaccinated and at 20, 24, and 28°C where fish was given the vaccines and the aquarium is facilitated with electric heater. At day 15 post immunization, challenge test with 5.000 cells of life *theront* fish<sup>-1</sup> was performed. Immobilization test, differential leukocyte, prevalence rates, and survival rates were measured. The measurements of these parameters were performed four times: before the treatment (day 0), day 7, day 14, and day 21, respectively. The results showed that the vaccine could reduce the stress in the fish that were kept at 20, 24, and 28°C, and the prevalence of *ichthyophthiriasis*. In addition the vaccine increase the fish survival rates after challenge test. The highest survival rate (100%) was found in fish that were kept in 28°C.

Keywords: *Cyprinus carpio* L, *Ichthyophthirius multifiliis*, temperature, vaccine.

## PENDAHULUAN

Kendala utama dalam pengembangan usaha budi daya ikan air tawar adalah penyediaan benih yang masih terbatas baik secara kuantitas maupun kualitas. Salah satu penyebab tingginya angka kematian benih ikan adalah akibat serangan parasit *Ichthyophthirius multifiliis* (Ich). Penyakit yang ditimbulkannya dinamakan *Ichthyophthiriasis* atau sering juga disebut *White Spot*. Parasit *I. multifiliis* termasuk ektoparasit pada insang, kulit, sirip, dan mata. Patogenitas ich dapat menyebabkan kematian ikan hingga 100% dalam waktu yang relatif singkat sehingga menimbulkan kerugian secara ekonomis (Matthews, 2005).

Pengendalian terhadap penyakit *Ichthyophthiriasis* sudah dilakukan dengan menggunakan bahan kimia, namun hasilnya tidak efektif. Alasan pertama, bahan kimia tidak efektif apabila *I. multifiliis* telah melakukan penetrasi ke kulit dan insang membuat *I. multifiliis* sulit untuk lepas. Kedua, bahan kimia tersebut tidak dapat membunuh semua stadia dari *I. multifiliis*. Ketiga, penggunaan bahan kimia dapat mencemari lingkungan dan produk makanan. Oleh karena itu, perlu dilakukan pencegahan dengan cara pemberian vaksin *I. multifiliis*. Pemberian vaksin dapat melindungi ikan terhadap patogen tertentu dalam jangka waktu yang lama (Ellis, 1988).

Keberhasilan pemberian vaksin ke ikan dalam meningkatkan kekebalan atau dalam pembentukan antibodi sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan, seperti suhu. Pada suhu rendah, induksi pembentukan antibodi membutuhkan waktu lebih lama dan titer antibodi yang dihasilkan lebih sedikit. Hal ini disebabkan karena suhu dapat menimbulkan immunosupresi pada ikan. Akibatnya, terjadi hambatan dan penekanan sintesis antibodi untuk melawan antigen yang masuk.

Penelitian tentang pencegahan penyakit *Ichthyophthiriasis* pada ikan mas (*Cyprinus carpio*) dengan cara pemberian vaksin *I. multifiliis* dan dipelihara pada suhu media yang berbeda belum banyak dilaporkan, untuk itu perlu dilakukan penelitian tersebut. Tujuan penelitian adalah untuk mencegah terjadinya serangan *Ichthyophthiriasis* pada ikan mas dan manfaat hasil penelitian ini dapat dijadikan sebagai dasar untuk melakukan pencegahan dan pengendalian penyakit.

## METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di Labo-ratorium Fisiologi Hewan Air, FPIK dan Laboratorium Fisiologi, FKH - IPB. Sebanyak 720 ekor ikan mas berukuran 5-7 cm dengan rata-rata bobot  $6,00 \pm 1,65$  g diperoleh dari Balai Benih Ikan Cibitung, Kecamatan Ciampea, Bogor. Ikan dipelihara dalam akuarium berukuran  $60 \times 45 \times 35$  cm<sup>3</sup>, yang diisi dengan air sebanyak 60 L dengan padat tebar satu ekor per liter. Pemeliharaan dilakukan selama 21 hari, dan selama pemeliharaan ikan diberi pakan komersial secara *ad libitum*, tiga kali sehari.

**Persiapan antigen *I. multifiliis*.** Pertama dipersiapkan *trophozoid* dari ikan yang terinfeksi *Ich*, guna mendapatkan stadia *theront*. Kultur *trophozoid* mengikuti prosedur (Syawal dan Siregar, 2007). Stadia *theront* yang dihasilkan digunakan sebagai bahan antigen dalam pembuatan vaksin dan untuk ujiantang.

Metode pembuatan vaksin memodifikasi prosedur Sakai (1984), yaitu dengan cara menginaktifkan sel *theront* dalam penangas air pada suhu 47°C selama 30 menit. *Theront* dinyatakan tidak aktif apabila pada waktu pengamatan tidak ada yang bergerak (Uji viabilitas).

Pemberian vaksin kepada ikan dilakukan dengan metode perendaman. Dosis vaksin yang diberikan adalah 3 mL/L dengan kepadatan sel *theront* 8.000 sel mL<sup>-1</sup>, sedangkan lama perendaman 15 menit (Syawal dan Siregar, 2010).

Ikan yang telah diberi vaksin dikembalikan ke akuarium dan dipelihara selama 21 hari pada suhu 20, 24, dan 28° C. Untuk mempertahankan suhu, dipasang alat pemanas listrik (*heater*). Ikan yang dipelihara pada suhu 18° C (tanpa *heater*) dan diberi vaksin dijadikan sebagai kontrol.

Uji tantang untuk melihat efektivitas vaksin dilakukan pada hari ke-15 pasca-imunisasi dengan cara menginfeksi sel *theront* hidup sebanyak 5.000 sel ikan<sup>-1</sup> (Alishahi dan Buchmann, 2006). Penginfeksian dilakukan di dalam akuarium pemeliharaan. Pengamatan dilakukan hingga hari ke-7 setelah uji tantang dilakukan.

Darah ikan diambil dari vena kaudalis dengan menggunakan spuit 1 mL. Jumlah ikan yang diambil darahnya dari setiap perlakuan adalah 15 ekor. Sebelum darah diambil terlebih

dahulu ikan tersebut dibius dengan *phenoxyethanol* dosis 0,3 mL<sup>L</sup>-1 air (Rigal *et al.*, 2008). Serum didapatkan dari darah ikan yang diambil tanpa diberi antikoagulan kemudian dipusing/*centrifuge* dengan kecepatan 6000 rpm selama lima menit. Serum tersebut digunakan untuk uji imobilisasi. Uji imobilisasi mengikuti prosedur Sigh dan Buchmann (2002), sedangkan mengukur diferensiasi leukosit mengikuti prosedur Johnny *et al.* (2003).

Pengukuran parameter dilakukan empat kali, yaitu pada hari ke-0 sebelum dilakukan imunisasi, pada hari ke-7, hari ke-14, dan hari ke-21 pascaimunisasi atau hari ke-7 pasca-ujitantang. Adapun parameter yang diukur adalah uji imobilisasi, diferensiasi leukosit, prevalensi parasit *I. multifiliis*, dan kelulusanhidup ikan.

Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap pola faktorial dalam waktu. Faktor perlakuannya adalah suhu dan waktu pengamatan. Suhu yang digunakan adalah 18°C (tanpa dipasang *heater*), 20, 24, dan 28°C. Waktu pengamatan ialah hari ke-0 sebelum dilakukan imunisasi, hari ke-7, hari ke-14, dan hari ke-21 pascaimunisasi, masing-masing perlakuan memiliki tiga ulangan.

Data yang didapatkan disajikan dalam bentuk tabel, dan diuji secara statistika dengan sidik ragam, menggunakan perangkat lunak *software SAS 9.1,3*.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Uji Imobilisasi**

Hasil uji imobilisasi ikan sebelum dan sesudah pemberian vaksin serta ujiantang disajikan pada Tabel 1. Uji imobilisasi dilakukan untuk melihat titer antibodi. Titer antibodi pada kondisi awal atau hari ke-0 tidak ada terdeteksi antibodi ikan terhadap *I. multifiliis*. Titer antibodi baru terdeteksi pada hari ke-14 dari ikan yang dipelihara pada suhu 20, 24, dan 28° C. Hasil uji imobilisasi ditandai dengan tidak Bergeraknya sel *theront* pada saat ditambahkan serum yang berasal dari ikan yang telah diberi vaksin. Titer tertinggi didapatkan pada ikan yang dipelihara pada suhu 28° C, yaitu sebesar 0,78. Pembentukan antibodi dipengaruhi oleh suhu lingkungan pemeliharaan, yakni pada suhu tinggi mendekati suhu optimum titer antibodi akan cepat terbentuk dan titer yang dihasilkan juga tinggi. Sebaliknya, pada suhu

rendah, pembentukan antibodi lama dan titer yang dihasilkan juga rendah.

Tabel 1. Hasil uji imobilisasi pada serum ikan mas yang diberi vaksin *I. multifiliis*

Waktu	Suhu media pemeliharaan			
	18° C	20° C	24° C	28° C
H-0	0,00	0,00	0,00	0,00
H-14	0,00	0,48	0,60	0,78
H-21	0,30	0,60	0,70	0,78

Keterangan: Titer uji imobilisasi log (titer +1). Ho = hari ke-0 ; H-14= hari ke-14 ; H-21= hari ke-21

**Diferensiasi Leukosit Ikan Mas yang Diberi Vaksin *I. multifiliis***

Hasil pengamatan terhadap nilai diferensiasi leukosit disajikan pada Tabel 2. Diferensiasi leukosit perlu untuk diketahui guna melihat status kesehatan ikan.

Pada Tabel 2, terlihat bahwa limfosit dipengaruhi oleh hari pengamatan dan suhu media pemeliharaan (p<0,05). Hasil interaksi antara level hari pengamatan maupun suhu media pemeliharaan terlihat bahwa nilai limfosit dipengaruhi oleh hari pengamatan (p<0,05) tetapi tidak dipengaruhi oleh suhu media pemeliharaan. Nilai limfosit menurun sejalan dengan lama masa pemeliharaan dan cenderung meningkat dengan peningkatan suhu. Rendahnya nilai limfosit pada hari ke-21 menandakan ikan dalam kondisi terinfeksi akibat dilakukan ujiantang. Sesuai dengan fungsinya, sel limfosit berperan dalam pembentukan antibodi. Pada suhu 28° C pembentukan antibodi lebih cepat dan kadarnya lebih tinggi bila dibandingkan dengan suhu rendah.

Nilai neutrofil ikan yang diberi vaksin *I. multifiliis* dan diujiantang dengan *I. multifiliis* dipengaruhi oleh lama hari pengamatan dan suhu media pemeliharaan (p<0,01). Interaksi antara level hari pengamatan atau suhu media pemeliharaan terlihat bahwa nilai neutrofil dipengaruhi oleh hari pengamatan (p<0,01) dan suhu media pemeliharaan (p<0,01). Nilai persentase neutrofil tertinggi diperoleh pada hari ke-21. Hal ini diduga ada hubungannya dengan peningkatan respons imun ikan sebagai efek pemberian vaksin dan terjadinya infeksi akibat dilakukan ujiantang.

Tabel 2. Persentase nilai diferensiasi sel leukosit ikan mas yang diberi vaksin *I. multifiliis*

Respons	Waktu	Suhu media pemeliharaan				Nilai P
		18° C	20° C	24° C	28° C	
Limfosit	H0	48,00 ± 5,89	40,25 ± 7,93	42,50 ± 2,52	52,50 ± 4,43	A 0,0413
	H7	40,50 ± 5,74	39,50 ± 3,42	41,50 ± 1,52	38,75 ± 1,89	B
	H14	36,75 ± 3,60	38,50 ± 7,19	34,00 ± 1,55	39,00 ± 3,83	B
	H21	36,00 ± 7,30	42,00 ± 1,63	42,50 ± 1,91	32,00 ± 4,62	B
		A	A	A	A	
Monosit	H0	39,50 ± 3,42	46,50 ± 8,85	34,25 ± 3,50	35,25 ± 1,50	B <0,0001
	H7	43,75 ± 4,19	48,50 ± 2,52	34,52 ± 3,50	47,25 ± 1,50	A
	H14	44,50 ± 4,12	47,00 ± 6,00	40,50 ± 3,42	45,00 ± 6,22	A
	H21	14,00 ± 2,83	12,25 ± 1,26	13,50 ± 1,91	13,00 ± 2,58	C
		A	A	B	A	
Neutrofil	H0	7,75 ± 2,63	5,50 ± 1,91	12,50 ± 4,12	8,25 ± 2,87	C <0,0001
	H7	5,00 ± 1,15	7,50 ± 1,00	14,00 ± 2,83	5,75 ± 1,71	C
	H14	1,00 ± 2,00	8,75 ± 2,22	13,75 ± 2,06	13,00 ± 1,00	B
	H21	36,50 ± 3,42	37,00 ± 2,50	36,50 ± 2,52	45,00 ± 1,15	A
		B	B	A	A	

Keterangan : Data yang ditampilkan merupakan nilai rata-ran ± standar deviasi. Huruf yang sama pada baris yang sama atau kolom yang sama menunjukkan tidak beda nyata P < 0,05. H0= hari ke-0 ; H7= hari ke-7; H14= hari ke-14; H21= hari ke-21

Tabel 3. Persentase prevalensi dan sintasan ikan mas yang diberi vaksin *I. multifiliis*

Respon	Suhu media pemeliharaan				Nilai P
	18° C	20° C	24° C	28° C	
Prevalensi (%)	65,28±4,92 <sup>a</sup>	80,03±0,00 <sup>b</sup>	33,73±7,42 <sup>c</sup>	0,00 <sup>d</sup>	0,000
Sintasan (%)	69,90±1,48 <sup>a</sup>	82,00±3,36 <sup>b</sup>	89,66±3,53 <sup>c</sup>	100,00 <sup>d</sup>	0,000

Keterangan: Data yang ditampilkan merupakan nilai rata-ran ± standar deviasi. Huruf yang sama pada baris yang sama atau kolom yang sama menunjukkan tidak beda nyata , P < 0,05

**Prevalensi *I. multifiliis* dan Sintasan Ikan Mas yang Diberi Vaksin *I. multifiliis***

Data hasil pengamatan terhadap tingkat prevalensi *I. multifiliis* pada ikan mas yang diberi vaksin dan diuji tantangan, disajikan pada Tabel 3. Nilai prevalensi *I. multifiliis* dipengaruhi oleh suhu media pemeliharaan (p<0,01). Nilai prevalensi *I. multifiliis* tertinggi didapatkan pada suhu 20° C, yakni sebesar 80±10%. Tingginya prevalensi *I. multifiliis* pada ikan yang dipelihara pada suhu 20° C menandakan bahwa patogenitas *I. multifiliis* tinggi, sehingga berhasil menginfeksi ikan setelah dilakukan uji tantangan. Namun demikian, tingginya prevalensi *I. multifiliis* ini tidak menyebabkan angka sintasan menjadi

rendah. Hal ini diduga ada hubungannya dengan fungsi vaksin yang diberikan, yaitu dapat meningkatkan kekebalan spesifik ikan terhadap invasi *I. multifiliis*. Tingginya prevalensi *I. multifiliis* pada suhu 20° C dibandingkan pada suhu 18° C menandakan bahwa tingkat patogenitas lebih tinggi pada suhu 20° C bila dibandingkan dengan suhu 18° C. Dengan demikian, pemberian vaksin *I. multifiliis* telah mampu meningkatkan angka sintasan.

Pembentukan antibodi dipengaruhi oleh suhu lingkungan. Pada suhu rendah memerlukan waktu yang lebih lama untuk terbentuknya antibodi, sedangkan pada suhu tinggi antibodi lebih cepat terbentuk demikian juga

dengan titer yang dihasilkan juga lebih tinggi. Hal ini terbukti bahwa titer antibodi ikan pada hari ke-14 yang dipelihara pada suhu 28° C adalah lebih tinggi, apabila dibandingkan dengan ikan yang dipelihara pada suhu 20 dan 24° C. Pada suhu 28° C, yaitu sebesar 0,78, pada suhu 20° C, yakni sebesar 0,48, sedangkan pada suhu 24° C adalah sebesar 0,60. Menurut Ellis (1988), ikan salmon yang diberi vaksin *vibrio* pada suhu 10° C memerlukan waktu 14 hingga 21 hari, sedangkan pada suhu 5° C butuh 40 hari untuk terbentuknya kekebalan, berbeda lagi dengan ikan *carp* pada suhu 12° C dapat menekan respons kekebalan. Sementara itu Xu *et al.* (2007) menyatakan bahwa pemberian vaksin ich dapat meningkatkan produksi mukus (lendir) yang berfungsi dengan pemberian vaksin dapat meningkatkan kekebalan ikan melalui sistem pertahanan spesifik.

Tingkat prevalensi *I. multifiliis* ditemukan tinggi, pada suhu rendah. Hal ini dapat dimengerti karena ikan yang dipelihara pada suhu rendah membentuk antibodi lebih lama dan titer antibodi yang dihasilkannya pun juga rendah. Keberhasilan *I. multifiliis* menginfeksi ikan pada bagian kulit dan insang dapat menimbulkan gangguan ion-ion di dalam tubuh (Dickerson, 2006), karena kulit dan insang merupakan organ osmoregulasi pada ikan.

Tingginya angka prevalensi *I. multifiliis* pada suhu 20° C, yakni sebesar 80±10% tidak berdampak buruk pada angka sintasan di akhir masa pemeliharaan, bila dibandingkan dengan ikan yang dipelihara pada suhu 18° C. Hal ini diduga ada hubungannya dengan efektivitas pemberian vaksin. Dengan adanya pemberian vaksin pada ikan yang dipelihara pada suhu rendah, telah mampu mencegah terjadinya *Ichthyophthiriasis*.

Sintasan tertinggi didapatkan pada suhu 28° C, yaitu 100% sedangkan pada suhu 20 dan 24° C masih terjadi mortalitas meskipun sudah dilakukan vaksinasi. Hal ini diduga bahwa pada suhu 20 dan 24° C antibodi yang terbentuk masih rendah kadarnya sehingga belum mampu melindungi invasi *I. multifiliis* pada saat dilakukan ujiantang. Pada suhu 18° C angka sintasannya masih tinggi setelah dilakukan ujiantang, yaitu sebesar 71%. Hal ini diduga karena pada suhu rendah patogenitas *I. multifiliis* juga lebih rendah dan sesuai dengan pendapat Ellis (1988), bahwa suhu optimum untuk *I. multifiliis* adalah 21-24° C, sedangkan menurut Dickerson, 2006 suhu optimum untuk

*I. multifiliis* adalah 21-24° C, sedangkan menurut Dickerson, 2006 suhu optimum untuk *I. multifiliis* adalah 25-28° C.

## SIMPULAN

Berdasarkan hasil pengamatan terhadap parameter uji imobilisasi, prevalensi, dan keluluanhidup, maka ikan yang diberi vaksin *I. multifiliis* dan dipelihara pada suhu 28° C dapat meningkatkan keluluanhidup hingga 100% setelah dilakukan ujiantang.

## SARAN

Berdasarkan data hasil penelitian dapat disarankan, bahwa untuk mengatasi penyakit *Ichthyophthiriasis* pada ikan mas dapat diberikan vaksin *I. multifiliis* dan dipelihara pada suhu 28° C.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Lembaga Penelitian Universitas Riau yang telah menjembatani peneliti dengan DP2M Dikti yang telah memberi bantuan dana melalui kegiatan penelitian Hibah Bersaing tahun 2011.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alishahi M, Buchmann K. 2006. Temperature dependent protection against *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet) following immunization of rainbow trout using live theronts. *Diseases of Aquatic Organisms* 72: 269–273.
- Dickerson HW. 2006. *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (Phylum Ciliophora). Dalam Woo PTK. *Fish diseases and disorders*. Volume 1 Protozoa and metazoan infections 2<sup>nd</sup> edition. University of Guelph Canada. Hlm. 116-153.
- Ellis AE. 1988. *Fish vaccination*. London. Academic Press.
- Johnny F, Zafran, Rosa D, Mahardika K. 2003<sup>a</sup>. Hematologis beberapa spesies ikan laut budi daya. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia* 9(4): 63-71.

- Matthews RA. 2005. *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet and Ichthyophthiriasis in freshwater teleosts. *Advances Parasitology* 59: 159–241.
- Rigal F, Thibaud C, Catherine LN, Guy C, Jean-Antoine T, Fabien A, Patrick B. 2008. Osmoregulation as a potensial factor for the differential distribution of two cryptic gobiid spesies, *Pomatoschistus microps* and *P. marmoratus* in French Mediterranean lagoons. *Scientia Marina* 72(3): 469–476,
- Sakai DK. 1984. Opsonization by fish antibody and complement in the immune phagocytosis by peritoneal exudates cells from salmoned fish. *Journal Fish Diseases* 7: 29–38.
- Sigh J, Buchmann K. 2002. Comparative analysis of cross-reactivity between *Ichthyophthirius* and *Tetrahymena*. *Bull Eur Ass Fish Pathology* 22(1): 37-44.
- Syawal H, Siregar YI. 2010. Imunisasi ikan jambal siam dengan vaksin *Ichthyophthirius multifiliis*. *J Veteriner* 11(3): 163–167.
- Xu-DH, Klesius PH, Shoemaker CA. 2007. Evaluation of a cohabitation challenge model in immunization trials for channel catfish *Ictalurus punctatus* against *Ichthyophthirius mulifiliis*. *Journal Deseases of Aquatic Organisms* 74: 49-55.