

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/ma>

FREKUENSI VENTILASI DAN EKSPRESI GEN COI IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) POPULASI SINTETIK KONDISI AMONIA TINGGI

Yogi Himawan^{*)#}, Alimuddin^{**)}, Kukuh Nirmala^{**)}, Imron^{*)}, Suharyanto^{*)}

^{*)}Balai Riset Pemuliaan Ikan

Jl. Raya Patok Besi, Subang No.2, Kec. Patokbeusi, Kabupaten Subang, Jawa Barat 41263

^{**)}Institut Pertanian Bogor

Jl. Raya Dramaga, Kampus IPB Dramaga Bogor, 16680 West Java, Indonesia

(Naskah diterima: 05 April 2021; Revisi final: 05 Juli 2022; Disetujui publikasi: 04 November 2022)

ABSTRAK

Ikan mas populasi sintetis dibentuk melalui pencampuran (*blending*) dari 5 strain ikan mas Indonesia, yakni Majalaya, Rajadana, Sutisna, Wildan, dan Sinyonya. Ikan mas sintetis potensial untuk dikembangkan menjadi strain tahan amonia. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis performa ikan mas populasi sintetis sebagai kandidat pembentuk ikan mas tahan amonia tinggi. Evaluasi toleransi terhadap amonia tinggi dilakukan melalui uji tantang NH_4Cl sebanyak 200 ppm pada media pengujian benih ikan mas populasi sintetis dan sebagai kontrol ikan mas populasi sintetis tanpa penambahan NH_4Cl . Dalam penelitian ini digunakan akuarium dengan ukuran 60x40x40 cm sebanyak tiga unit untuk pengujian frekuensi ventilasi dan dua unit untuk pengambilan sampel. Perlakuan diulang sebanyak 3 kali dengan ikan uji berjumlah 30 ekor tiap akuarium dan bobot 18.32 ± 3.29 g per ekor. Pengukuran ekspresi gen COI dilakukan dengan metode qPCR. Hasil penelitian menunjukkan frekuensi ventilasi ikan mas sintetis tahan amonia tinggi mencapai 34.00 ± 10.54 bukaan menit⁻¹, lebih tinggi dibanding kelompok pingsan dan kontrol. Tingkat ekspresi gen COI ikan mas populasi sintetis yang tahan amonia tinggi memiliki level ekspresi lebih tinggi daripada kelompok pingsan dan kontrol. Sementara itu, kualitas air uji tantang masih berada pada level normal untuk pemeliharaan.

KATA KUNCI : ammonia; frekuensi ventilasi; gen COI; ikan mas; populasi sintetis

ABSTRACT : *Ventilation rate and COI gene expressions of a synthetic carp (*Cyprinus carpio*) population reared at high concentrations of environmental ammonia. By: Yogi Himawan, Alimudin, Kukuh Nirmala, Imron, Suharyanto*

A synthetic carp population was formed by combining five Indonesian carp strains, namely Majalaya, Rajadana, Sutisna, Wildan, and Sinyonya. The synthetic carp has the potential to be developed as strains resistant to ammonia. This study aimed to analyze the performance of the synthetic carp population as a candidate to form high ammonia-resistant carp. Evaluation of tolerance to high concentrations of environmental ammonia was carried out by adding 200 ppm NH_4Cl to the synthetic carp seed's rearing media. The control treatment was rearing the seed without the addition of NH_4Cl . The research used three units of aquarium sized 60x40x40 cm to measure the fish's gills ventilation rate and two units for sampling. The treatments were repeated three times with 30 test fish per aquarium with an average weight of 18.32 ± 3.29 g per fish. The measurement of COI gene expression was performed using the qPCR method. The results showed that the ventilation rate of the synthetic carp with high ammonia resistance was 34.00 ± 10.54 per minute aperture, higher than the unconscious and control groups. The level of COI gene expression in the synthetic population of high ammonia resistant carp was higher than in the unconscious and control groups. In addition, the water quality parameters of the treatments rearing media were within the normal values for carp farming.

KEYWORDS: ammonia; frequency of ventilation; COI gene; carp; synthetic population

Korespondensi: Balai Riset Pemuliaan Ikan.

Jl. Raya 2 Sukamandi, Subang 41263, Jawa Barat, Indonesia

E-mail: yogihimawan@yahoo.com

PENDAHULUAN

Ikan mas merupakan salah satu komoditas ikan air tawar yang digemari masyarakat dan potensial untuk terus dikembangkan produksinya. Salah satu kendala dalam pembesaran ikan mas adalah tingginya kematian ikan yang disebabkan meningkatnya kadar amonia dalam perairan pada waktu tertentu khususnya di area waduk atau danau. Pencegahan kematian ikan mas yang dibudidayakan di sentra pembesaran dapat dilakukan melalui perbaikan performa ikan mas, salah satunya adalah melalui penggunaan benih ikan mas yang tahan tekanan lingkungan terutama amonia tinggi. Salah satu populasi ikan mas yang potensial untuk dikembangkan sebagai kandidat ikan mas tahan amonia tinggi (*high environmental amonia*) adalah ikan mas populasi sintetik. Potensi tersebut dapat diekspresikan karena ikan mas sintetik merupakan populasi dengan keragaman genetik yang tinggi. Ikan mas populasi sintetik dibentuk melalui pencampuran (*blending*) dari 5 strain ikan mas Indonesia, yakni Majalaya, Rajadanu, Sutisna, Wildan, dan Sinyonya.

Frekuensi ventilasi umumnya digunakan sebagai indikator respons stres pada ikan. Pengujian frekuensi ventilasi dilakukan untuk menganalisis kebutuhan oksigen dan reaksi fisiologis lainnya terkait dengan proses adaptasi terhadap kondisi amonia tinggi. *High environmental amonia* (HEA) mempengaruhi tingkat stres oksidasi pada ikan (Ching *et al.*, 2009) melalui aktivasi *reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen species* (RNS) (Murthy *et al.*, 2001). Salah satu gen yang berperan dan dapat digunakan sebagai indikator dalam mengantisipasi stres oksidasi adalah CO1 (*Cytochrome oxydase* subunit 1) yang bekerja dengan cara mencegah berkurangnya aliran elektron (Benzi *et al.*, 1992) atau dengan cara memisahkan transpor elektron pada transfer proton (Richter, 1997). Ekspresi gen CO1 merupakan mekanisme kompensasi untuk memunculkan kembali aktivitas mitokondria dan mengefisienkan konsumsi oksigen (Achard-Joris *et al.*, 2006). Beberapa hasil penelitian terkait ketahanan terhadap stres pada beberapa spesies ikan menunjukkan masih terdapat individu yang ternyata mampu bertahan terhadap tekanan lingkungan. Hal tersebut menunjukkan terdapat variasi secara genetik yang mampu bekerja dan mengkompensasi energi metabolisme untuk menghadapi stres akibat tekanan lingkungan agar dapat bertahan hidup. Kondisi tersebut tentu memunculkan potensi didapatkannya populasi ikan yang memiliki ketahanan tertentu terhadap stres yang mana dapat diwariskan pada generasi selanjutnya. Penelitian terkait aktivitas gen ketahanan terhadap stres sudah dilakukan pada beberapa spesies ikan, diantaranya pada *Anguilla marmorata* (Wang *et al.*, 2016), *Cyprinus carpio* var.

Jian (Wu *et al.*, 2014) dan *Ctenopharyngodon idella* (Shi *et al.*, 2015).

Berdasarkan hal tersebut, evaluasi performa ikan mas populasi sintetik terkait ketahanan terhadap amonia tinggi perlu dilakukan melalui mekanisme uji tantang dan analisis ekspresi gen sebagai langkah awal pembentukan ikan mas tahan amonia tinggi.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan September 2018-Juli 2019 di *hatchery* ikan mas, kolam penelitian, dan Laboratorium Molekuler Balai Riset Pemuliaan Ikan (BRPI) Sukamandi. Evaluasi toleransi terhadap amonia tinggi dilakukan melalui penambahan NH_4Cl sebanyak 200 ppm pada media pengujian benih ikan mas populasi sintetik dan sebagai kontrol ikan mas populasi sintetik tanpa penambahan NH_4Cl . Dalam penelitian ini digunakan wadah berupa akuarium ukuran 60x40x40 cm sebanyak tiga unit untuk pengujian frekuensi ventilasi dan dua unit untuk pengambilan sampel. Perlakuan diulang sebanyak 3 kali dengan ikan uji berjumlah 30 ekor tiap akuarium dan bobot 18.32 ± 3.29 g per ekor. Uji toleransi terhadap amonia tinggi diawali tahap aklimatisasi dengan menempatkan benih ikan mas populasi sintetik dalam akuarium volume air 30 L dengan *dissolved oxygen* (DO) dipertahankan pada level >2 ppm melalui penambahan instalasi aerasi. Setelah masa aklimatisasi selama empat hari, selanjutnya dilakukan peningkatan kandungan amonia dalam media pemeliharaan melalui penambahan NH_4Cl *stock solution* (Merck, Darmstadt, Germany). Frekuensi ventilasi insang diukur dengan menghitung seberapa banyak operkulum terbuka dalam waktu satu menit. Mekanisme pelaksanaan dilakukan dengan mengamati ikan mas pada wadah yang sudah ditambahkan 200 ppm NH_4Cl dan tanpa penambahan NH_4Cl mengingat amonia yang tinggi akan mengurangi kemampuan insang untuk menyerap oksigen. Selanjutnya dilakukan penghitungan jumlah operkulum yang terbuka dan menutup selama satu menit.

Tahap awal pengukuran ekspresi gen ikan mas populasi sintetik yang diberi perlakuan amonia tinggi adalah melakukan pengumpulan sampel. Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah dari organ hati yang diambil pada saat uji tantang dengan kriteria ikan pingsan, kuat bertahan, dan kontrol masing-masing 10 ekor yang selanjutnya organ tersebut disimpan pada suhu -80°C hingga siap digunakan untuk ekstraksi RNA. Selanjutnya dilakukan kegiatan ekstraksi RNA dari organ hati yang sudah dikumpulkan dan diambil sebanyak 20 mg dari tiap ulangan lalu diisolasi menggunakan bahan Trizol (Invitrogen, Merelbeke, Belgium). Sampel RNA yang sudah diekstraksi

selanjutnya ditreatmen dengan DNA-free (DNase) untuk menghilangkan kontaminasi genomik DNA. Langkah selanjutnya adalah evaluasi kuantitas RNA menggunakan *Nano-Drop spectrophotometry* (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) dan kualitasnya dievaluasi dengan denaturasi gel elektroforesis (1% agarose gel) serta kemurnian dengan OD_{260}/OD_{280}^{-1} nm. Tahapan selanjutnya adalah sejumlah 1 μ g RNA ditranskripsikan menjadi *First strand* cDNA mengacu pada “Revert Aid H minus First strand cDNA synthesis kit” (Fermentas, Cambridgeshire). Volume awal 20 μ L ditambahkan menjadi 100 μ L untuk mendapatkan jumlah yang dibutuhkan atau setara dengan 50 ng RNA setiap reaksi.

Tahapan selanjutnya adalah untuk reaksi quantitative (qPCR) untuk analisis ekspresi gen HSP70 dan CO1 terkait ketahanan terhadap stres akibat amonia tinggi menggunakan primer (Sinha *et al.*, 2012) seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Sekuen pimer PCR yang digunakan dalam qPCR.

Table 1. Primer sequence of PCR used in the qPCR

Gen	Sekuen Primer (5' → 3')
Cytochrome oxidase subunit1(CO1)	F: 5'-GGAAGTTAGCCACGCA-3' R: 5'-AAGCACGGATCAGACGA-3'
Beta Aktin	F: 5'-CCCTGGCCCCCAGCACAATG-3' R: 5'-TCTGCGCAGTTGAGTCGGCG-3'

Mastermix untuk qPCR disiapkan melalui beberapa bahan diantaranya: 10 μ L *Maxima SYBR Green qPCR Master mix* (Fermentas, Cambridgeshire), primer sebanyak 1 μ L *forward* dan 1 μ L *reverse*, 4 μ L *nuclease free water* (NFW) dan jumlah sampel masing-masing 4 μ L sehingga didapatkan volume total tiap tube 20 μ L. Empat tahapan protokol eksperimental digunakan pada *light cycler* (Roche version 3.5): denaturasi (10 min at 95 °C); amplifikasi dan kuantifikasi 40 siklus (15 detik suhu 95 °C, 30 detik suhu 60 °C, 30 detik suhu 72 °C); kurva leleh (55–95 °C) dengan tingkat pemanasan 0.10 °C s⁻¹ dan pengukuran *fluorescence* secara berkelanjutan, dan yang terakhir adalah tahap pendinginan (4 °C).

Kuantifikasi ekspresi relatif dari transkrip gen target dengan gen referensi dilakukan dengan metode *Rotor-Gene Q Series Software* dengan rumus:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_T}_{\text{target}(\text{control}-\text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_T}_{\text{ref}(\text{control}-\text{sample})}}$$

di mana nilai C_T (*cycle threshold*) sesuai dengan jumlah siklus di mana emisi fluoresensi yang dipantau secara real time melebihi ambang batas. Sebagai gen

referensi lebih dipilih beta-aktin karena memiliki tingkat ekspresi stabil dalam kondisi pengujian.

HASIL DAN BAHASAN

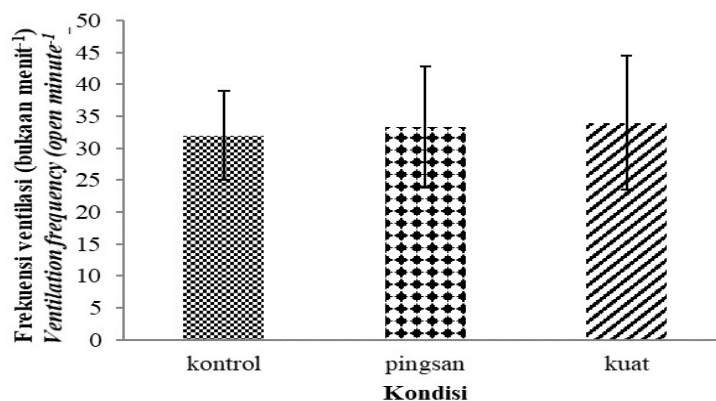
Frekuensi Ventilasi

Hasil pengamatan frekuensi ventilasi ikan mas populasi sintetik pada uji tantangan amonia tinggi tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0.05$) dibanding pada ikan yang pingsan dan kontrol (Gambar 1).

Menurut Perry dan Tzaneva (2016), ikan memiliki refleksi yang dapat berkembang dengan baik untuk mengatur fungsi dari respirasi dalam menghadapi perubahan lingkungan, khususnya ketika terjadi perubahan level pada tiga gas terkait respirasi yakni oksigen, karbondioksida, dan amonia. Ikan mas populasi sintetik kelompok kuat memiliki frekuensi ventilasi paling tinggi dibanding kelompok pingsan dan kontrol. Hal tersebut diduga karena pada kelompok ikan mas kuat memiliki energi dan

kemampuan lebih besar untuk menjalankan mekanisme pengambilan oksigen serta ekskresi amonia lebih cepat dan mempertahankan transportasi oksigen dalam darah. Pada ikan *rainbow trout*, meningkatnya frekuensi ventilasi operkulum pada kondisi amonia tinggi dapat disebabkan oleh peningkatan kebutuhan oksigen pada jaringan akibat terganggunya metabolisme sel sehingga terjadi perubahan volume ventilasi dan jumlah oksigen yang dapat diekstraksi dari air (Knoph, 1996).

Sebagian ikan berventilasi terus-menerus untuk memenuhi kebutuhan metabolisme oksigen, ekskresi karbon dioksida dan amonia yang dapat menginduksi terjadinya hiperventilasi seperti yang terjadi pada ikan *rainbow trout* (Zhang dan Wood, 2009). Bucking dan Wood (2008) melaporkan bahwa amonia dapat menyebabkan hiperventilasi meskipun tidak terjadi gangguan status oksigen pada arteri dan karena efeknya yang toksik maka amonia juga harus terus dikeluarkan ikan melalui insang. Karena amonia sangat beracun bagi ikan maka aktivitas hiperventilasi dilakukan sebagai mekanisme untuk memfasilitasi penghilangan amonia itu sendiri.



Gambar 1. Frekuensi ventilasi ikan mas populasi sintetik pada uji tantang amonia tinggi

Figure 1. Ventilation rate of synthetic common carp population reared in high concentrations of environmental ammonia

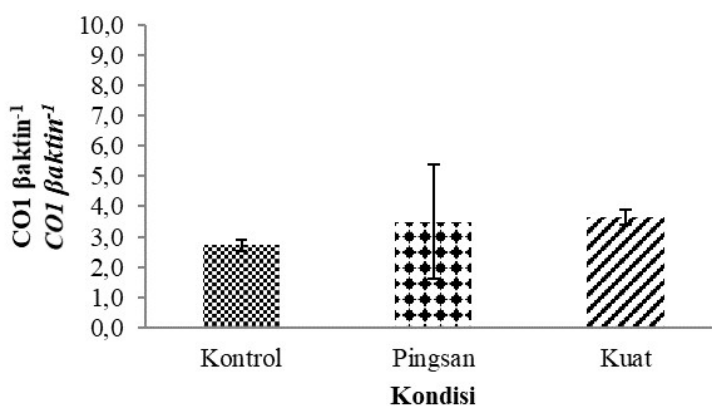
Tidak terdapatnya perbedaan nyata pada mekanisme ventilasi antar tiga kondisi ikan menunjukkan bahwa peningkatan aktivitas ventilasi operkulum bukan merupakan strategi utama ikan dalam mengurangi tingkat toksisitas amonia. Secara umum, ventilasi dianggap memadai untuk mempertahankan ekskresi amonia dalam sebagian besar kondisi karena laju ekskresi amonia jauh lebih rendah daripada tingkat serapan O₂ atau ekskresi CO₂. Menurut Randall & IP (2006), hiperventilasi merupakan mekanisme untuk memfasilitasi ekskresi amonia lebih cepat. Namun demikian, hiperventilasi juga memiliki keterbatasan dalam hal mekanismenya terkait dengan osmoregulasi dan kompromi dalam mekanisme osmo respirasi.

Ekspresi Gen CO1

Hasil pengamatan ekspresi gen CO1 (Gambar 2) yang merupakan gen yang memberi respons ikan mas terhadap stres akibat amonia tinggi dengan metode qPCR menunjukkan nilai ekspresi relatif gen yang berbeda pada tiap kelompok ikan mas.

Ekspresi gen CO1 merupakan respons terhadap stres dan dapat menandakan reaksi adaptif pada ikan mas untuk meminimalkan kerusakan oksidatif. Menurut Chowdhury & Saikia (2020), kerusakan oksidatif sendiri disebabkan karena terbentuknya ROS (*reactive oxygen species*) yang dapat dinetralisir melalui reaksi antioksidan secara enzimatis dan non enzimatis. CO1 berperan kritis selama respirasi dengan mentransfer elektron dari sitokrom C ke oksigen dan berkontribusi pada pembentukan ATP, yang mana apabila terjadi penurunan tingkat aktivitas CO1 akan menyebabkan menurunnya kapasitas Na⁺-K⁺-ATPase dan berkurangnya kapasitas ATP.

Penelitian Wang *et al.* (2004) terkait uji toksik Cd menunjukkan bahwa Cd dapat merangsang pembentukan ROS (*reactive oxygen species*) pada mitokondria karena dapat menghambat transpor elektron, terutama transpor elektron melalui kompleks III yang merupakan situs utama produksi ROS. Meningkatnya CO1 merupakan upaya untuk mencegah melambatnya elektron dan mekanisme untuk menghindari produksi ROS. Hal tersebut



Gambar 2. Tingkat ekspresi relatif gen CO1 ß-aktin⁻¹ menggunakan metode qPCR pada ikan mas populasi sintetik pasca uji stres pada amonia tinggi.

Figure 2. Level of relative expression of CO1 ß-aktin⁻¹ using qPCR method of synthetic common carp population reared in high concentrations of environmental ammonia.

menunjukkan bahwa gen tersebut berperan dalam menunjang kemampuan adaptasi ikan mas kelompok kuat melalui mekanisme pencegahan kerusakan protein dan efisiensi respirasi mitokondria akibat stres yang disebabkan amonia tinggi.

Kualitas Air

Hasil pengukuran kualitas air pada saat uji tantang menunjukkan bahwa nilai pH, suhu, *dissolved oxygen* (DO), dan TAN (Tabel 2) berfluktuasi, namun tidak berbeda secara signifikan.

tidak stabil dan bergeser ke dalam bentuk molekul. Di sisi lain, dengan menurunnya pH maka akan menyebabkan pengkayaan proton dalam air dan bersaing dengan kation amonium untuk diadsorpsi. Ketika pH di dalam air mencapai nilai 7 maka kurang dari 1% dari amonia akan berbentuk NHS dan NH₃, yang mana ketika diekskresikan oleh ikan ke dalam air akan diubah oleh pH menjadi NH₄⁺. Konversi NH₃ menjadi NH₄⁺ (*ammonia trapping*) akan mengendalikan NH yang dikeluarkan melalui insang dan meningkatkan ekskresi amonia. Pada pH 8 dan suhu 25°C, media

Tabel 2. Parameter kualitas air pada uji tantang amonia tinggi ikan mas populasi sintetik

Table 2. Water quality parameters of the rearing media of synthetic common carp population reared in high concentrations of environmental ammonia.

Waktu pengamatan	Parameter	Rata-rata
09.00	pH	8.14±0.04
	DO	2.56±0.15
	Suhu	27.40±0.10
	Amonia	3.20±0.04
11.00	pH	8.16±0.05
	DO	1.96±0.05
	Suhu	27.62±0.08
	Amonia	3.48±0.03
15.00	pH	8.47±0.10
	DO	2.32±0.04
	Suhu	28.44±0.11
	Amonia	3.45±0.02

Dalam pengujian amonia tinggi pada penelitian kali ini, parameter kualitas air utama yang diamati dan dapat mempengaruhi toksisitas amonia dalam media pemeliharaan diantaranya adalah pH dan suhu air. Perubahan nilai kedua parameter kualitas air tersebut dapat ikut mengubah toksisitas amonia dalam media uji sehingga diharapkan keduanya berada dalam batas normal sehingga dapat mempertahankan toksisitas amonia sebagai tujuan utama pengujian ini. Di dalam perairan, persentase amonia yang tidak terionisasi (NH₃) akan meningkat seiring dengan peningkatan pH dan suhu air (Emerson *et al.*, 1975). Menurut USEPA (2013), toksisitas total dari amonia akan meningkat seiring dengan meningkatnya pH atau suhu melalui mekanisme pengaturan konsentrasi relatif NH₄⁺ dan NH₃.

Hasil pengamatan pada parameter pH menunjukkan nilainya berada pada kisaran 8.14 - 8.47. Nilai tersebut dapat dikatakan relatif stabil dan tidak berpotensi menurunkan toksisitas amonia media pemeliharaan. Pada pH yang tinggi akan menyebabkan ion menjadi

pemeliharaan akan memiliki minimal 4% dari total amonia dalam bentuk yang tidak terionisasi. Peningkatan pH akan mengakibatkan peningkatan toksisitas amonia yang dinyatakan sebagai amonia total, yang disebabkan oleh adanya peningkatan persentase amonia di dalam air.

Pengukuran suhu air dalam penelitian ini menunjukkan nilai yang relatif stabil, yakni 27.40 - 28.44 °C. Suhu juga berperan dalam peningkatan toksisitas dari amonia pada lingkungan perairan. Liu *et al.* (2010) melaporkan bahwa penelitian pengaruh suhu pada pengurangan amonia melalui mekanisme adsorpsi dengan suhu berbeda dari 15°C hingga 35°C menunjukkan bahwa kapasitas adsorpsi berubah ketika suhu meningkat karena adsorpsi amonia bersifat endotermik. Berbeda dengan pH, peranan suhu dalam peningkatan toksisitas amonia relatif kecil bila dibandingkan dengan pH karena suhu lebih bersifat kuantitatif dan lebih berpengaruh pada metabolisme ikan. Ikan merupakan kelompok hewan poikilotermal

yang mana metabolisme nitrogen dan ekskresi amoniaknya dipengaruhi secara langsung oleh peningkatan suhu air dan apabila suhu air melebihi kisaran suhu yang bisa ditoleransi ikan tersebut maka laju ekskresi amonia akan berkurang (Nerici *et al.*, 2012). Pada suhu tinggi melebihi batas toleransi ikan tersebut, maka akan terjadi peningkatan laju metabolisme yang sebagian dicapai melalui transaminasi dan deaminasi asam amino dari pakan, menghasilkan ekskresi amonium dan pelepasan sisa karbon yang digunakan sebagai sumber energi (Forsberg & Summerfelt, 1992).

KESIMPULAN

Frekuensi ventilasi ikan mas populasi sintetik pada ujiantang amonia tinggi tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0.05$) dibanding pada ikan yang pingsan dan kontrol. Tingkat ekspresi gen CO1 ikan mas tidak terdapat perbedaan nyata antar perlakuan ($p > 0.05$).

UCAPAN TERIMA KASIH

Apresiasi dan penghargaan yang setinggi-tingginya pada Pak Flandrianto Sih Palimirmo, SSi, Listio Dharmawantho, Kusnadi, dan Bapak Kamlawi di tim ikan mas BRPI yang telah membantu terlaksananya penelitian. Terima kasih kepada PUSDIK KP selaku sponsor tugas belajar dan Balai Riset Pemuliaan Ikan yang telah memfasilitasi penelitian di lapangan, serta pihak lainnya yang membantu terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR ACUAN

- Achard-Joris M., Gonzalez P., Marie V., Baudrimont M., & Bourdineaud J.P. (2006). Cytochrome oxydase subunit I gene is up-regulated by cadmium in freshwater and marine bivalves. *Biometals*, 19, 237–244.
- Benzi G., Pastoris O., Marzatico R.F., Villa R.F., & Curti D. (1992). The mitochondrial electron transfer alteration as a factor involved in the aging brain. *Neurobiology of Aging*, 13, 61–368.
- Bucking C.P., & Wood C.M. (2008). The alkaline tide and ammonia excretion after voluntary feeding in freshwater rainbow trout. *J. Exp. Biol*, 211, 2533–2541.
- Ching B.Y., Chew S.F., Wong W.P., & Ip Y.K. (2009). Environmental ammonia exposure induces oxidative stress in gills and brain of *Boleophthalmus boddarti* (mudskipper). *Aquatic Toxicology*, 95, 203–212.
- Chowdhury & Saikia. (2020). Oxidative Stress in Fish: A Review. *J. Sci. Res*, 12, 145–160
- Emerson K., Russo R.C., Lund R.E., & Thurston R.V. (1975). Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature. *J. Fish. Res. Board Can*, 32, 2379–2383.
- Forsberg J.A., & Summerfelt R.C. (1992). Effect of temperature on diet ammonia excretion of fingerling walleye. *Aquaculture*, 102, 115–126.
- Knoph M.B. (1996). Gill ventilation frequency and mortality of Atlantic salmon (*Salmo salar* L) exposed to high ammonia levels in seawater. *Water research*, 30(4), 837–842.
- Liu H., Dong Y., Liu Y., & Wang H. (2010). Screening of novel lowcost adsorbent from agricultural residues to remove ammonia nitrogen from aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials*, 178(3), 1132–1136.
- Murthy C.R.K., Rama Rao K.V., Bai G., & Norenberg M.D. (2001). Ammonia-induced production of free radicals in primary cultures of rat astrocytes. *Journal of Neuroscience Research*, 66, 282–288.
- Nerici C., Silva A., & Merino G. (2012). Effect two temperatures on ammonia excretion rates of *Seriola lalandi* (Palm fish) juvenile under rearing conditions. *Aquacultural Engineering*, 46, 47–52.
- Perry S.F. & Tzaneva V. (2016). The sensing of respiratory gases in fish: Mechanisms and signaling pathways. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 224, 71–79.
- Randall D.J., & IP Y.K. (2006). Ammonia as respiratory gas in water air breathing fishes. *Respir. Physiol. Neurobiol*, 154, 216–225.
- Richter C. (1997). Reactive oxygen species and nitrogen species regulate mitochondrial Ca^{2+} homeostasis and respiration. *Bioscience Reports*, 17:53–66.
- Shi L., Feng L., Jian W.D., Liu Y., Jiang J., Wu P., Zhao J., Kuang S.Y., Tang L., Tang W.N., Zhang Y.A., & Zhou X.Q. (2015). Folic acid deficiency impairs the gill health status associated with the NFκB, MLCK and Nrf2 signaling pathways in the gills of young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish Shellfish Immunol*, 47, 289–301.
- USEPA [United States Environmental Protection Agency]. (2013). *Update of Ambient Water Quality Criteria for Ammonia*. Office of Science and Technology, Office of Water, US. Environmental Protection Agency. Washington DC, USA.
- Wang L., Wang X., & Yin S. (2016). Effect of salinity change on two superoxide dismutases (SODs) in juvenile marbled eel (*Anguilla marmorata*). *PeerJ*,

- 4, 2149.
- Wang Y., Fang J., Leonard S.S., & Krishna Rao K.M. (2004). Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radical Biol Med*, 36, 1434–1443.
- Wirdateti, Indriana E., & Handayani. (2016). Analisis Sekuen DNA Mitokondria Cytochrome Oxidase I (COI) mtDNA Pada Kukang Indonesia (*Nycticebus spp*) sebagai Penanda Guna Pengembangan Identifikasi Spesies. *Jurnal Biologi Indonesia*, 12(1), 119-128.
- Wu P., Jiang W.D., Liu Y., Chen G.F., Jiang J., & Li S.H. (2014). Effect of choline on antioxidant defenses and gene expressions of Nrf2 signaling molecule in the spleen and head kidney of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Fish Shellfish Immunol*, 38, 374-382.
- Zhang J.G., Tirmenstein M.A., Nicholls-Grzemeski F.A., & Fariss M.W. (2001) Mitochondrial electron transport inhibitors cause lipid peroxidation-dependent and -independent cell death: protective role of antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys*, 393, 87–96.
- Zhang L., & Wood C. (2009). Ammonia as stimulant to ventilation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 168(3), 261-271.