

RESPON HISTOLOGIS TUBUH KODOK (*Rana catesbeiana* Shaw) TERHADAP INFEKSI BAKTERI PATOGEN DAN POTENSI *Saccharomyces cerevisiae* SEBAGAI IMUNOSTIMULAN

Taukhid, Pipik Taufik, dan Honorius Mundriyanto

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respon histologis tubuh kodok (*Rana catesbeiana* Shaw) terhadap infeksi bakteri patogen serta potensi ekstrak *Saccharomyces cerevisiae* terhadap peningkatan respon imunitas tubuh kodok yang diberikan melalui pakan didahului dengan *priming*. Uji respon histologis dilakukan melalui infeksi buatan terhadap bakteri patogen *Aeromonas hydrophila* pada dosis 10^6 dan 10^8 cfu/ekor. Pengamatan dilakukan terhadap gejala klinis dan respon histopatologis. Sedangkan uji potensi imunostimulan terhadap imunitas kodok dilakukan melalui perendaman dalam larutan tersebut pada konsentrasi 100 mg/L selama 60 menit sebagai *priming*, kemudian dilanjutkan dengan *booster* I & II yang diberikan melalui pakan. Dosis imunostimulan yang diberikan adalah (A) 500 mg/kg, (B) 750 mg/kg, (C) 1.000 mg/kg pakan, dan (D) tanpa imunostimulan sebagai kontrol. Parameter yang diamati meliputi diferensial leukosit, aktivitas fagositik dan titer antibodi terhadap bakteri *A. hydrophila*. Hasil percobaan menunjukkan bahwa model infeksi bakteri pada kedua konsentrasi tersebut tidak virulen, meskipun terjadi kerusakan jaringan. Hal ini diindikasikan dengan gambaran respon histopatologis organ hati dan ginjal yang menunjukkan adanya kerusakan seperti degenerasi lemak, melanisasi, nekrosis, dan piknosis. Sedangkan hasil percobaan peningkatan imunitas tubuh kodok menunjukkan bahwa pemberian imunostimulan dapat meningkatkan kekebalan non-spesifik yang diindikasikan dengan meningkatnya proporsi leukosit fungsional (limfosit dan netrofil), aktivitas fagositosis, serta titer antibodi.

ABSTRACT: *Histological response of bullfrog (Rana catesbeiana Shaw) against bacterial infection artificially, and potency of Saccharomyces cerevisiae as immunostimulant. By: Taukhid, Pipik Taufik, and Honorius Mundriyanto*

The experiment has an aim to study bullfrog histological response against pathogenic bacteria which were infected artificially, and the potency of applying immunostimulant (S. cerevisiae) to induce non-specific immune response of bullfrog. Challenge test was carried out by artificial infection with pathogenic bacteria, A. hydrophila at concentrations of 10^6 cfu and 10^8 cfu per frog. Parameters examined were clinical signs and histopathological response especially on the liver and kidney. Another trial, was carried out to know the potency of immunostimulant by immersing the frog into immunostimulant at a concentration of 100 mg/L for 60 minutes as priming, then continued by booster I & II which were administered via feed. Doses of immunostimulant applied were (A) 500 mg/kg, (B) 750 mg/kg, (C) 1000 mg/kg feed, and (D) without immunostimulant as a control. Parameters examined were differential leucocyte, phagocytic activity, and antibody titre against A. hydrophila. The results indicated that artificially infection to the bacterial model at defined doses was not virulence, although, histopathological changes were found on the liver and kidney i.e. fat degeneration, melanization, necrotic, piknotic, and kariorexis. Applying immunostimulant was found a promising strategy to induce non-specific immunity which was indicated by increasing of leucocyte proportion (lymphocyte and netrophyl), phagocytic activity, and antibody titre.

KEYWORDS: *bullfrog, histopathology, immunostimulant, bacterial*

PENDAHULUAN

Budi daya di Indonesia kodok benggala, *Rana catesbeiana* Shaw telah berlangsung sejak pertengahan tahun delapan puluhan di beberapa daerah, terutama di Pulau Jawa (Mundriyanto *et al.*, 1993). Kodok jenis ini mempunyai sifat yang lebih jinak, lebih adaptif terhadap lingkungan buatan, dan

mudah dilatih untuk mengkonsumsi pakan buatan serta umumnya berukuran lebih besar daripada kodok lokal.

Akhir-akhir ini sering dilaporkan adanya kematian kodok akibat infeksi jasad patogen. Umumnya kodok yang sakit menunjukkan gejala luka bercak kemerahan (*red plague*) dan *gripis-gripis* pada jari kaki,

¹⁾ Peneliti pada Balai Penelitian Perikanan Air Tawar, Sukamandi

dan penyakit ini menyerang pada seluruh stadia hidup kodok. Meskipun agen penyebab penyakit tersebut belum teridentifikasi secara pasti, namun dari beberapa jenis bakteri yang memiliki prevalensi tinggi terisolasi dari kodok yang mati dan *moribund* adalah spesies *Aeromonas hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. (Crumlish & English, 1999). Somsiri & Soontornvit (2000) telah mengisolasi bakteri dari kodok (*R. tigrina*) sakit yang berasal dari 173 peternak dengan gejala klinis: pendarahan pada kulit dan/atau organ-organ dalam, mata kabur atau putih, luka pada kulit, dan hilang nafsu makan. Dari hasil isolasi diperoleh jenis bakteri *Aeromonas* spp., *Achromobacter* sp., *Citrobacter freundii*, *Flexibacter columnaris*, *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., *Serratia* sp., *Staphylococcus* sp., dan *Streptococcus*. Namun dari beberapa jenis bakteri tersebut, prevalensi paling tinggi adalah dari kelompok *Aeromonas* yaitu sebesar 51,67%.

Penyakit dengan gejala klinis yang hampir serupa pada *R. tigrina* dapat mengakibatkan kematian antara 20-50% (Kanchanachan, 1998). Penyakit ini disebabkan oleh infeksi *Tiger Frog Iridovirus* (TFIV) yaitu virus dari famili Iridoviridae. Selanjutnya Kanchanachan *et al.* (2000) mengisolasi virus tersebut dari 170 sampel kodok sakit dan didapatkan 70 isolat virus. Virus-virus tersebut mengakibatkan flek lisis *cytopathic effect* yang sama pada sel lestar *Epithelioma Papulosum Cyprini* (EPC) dan memiliki genom, serta karakter meristik-morfometrik yang sama pula. Tipe gen protein capsid dari virus tersebut adalah spesifik *Ranavirus* genus FV3, sehingga untuk sementara virus tersebut dinamakan *Rana Tigrina Ranavirus* (RTRV).

Penggunaan vaksin dalam akuakultur untuk mengurangi risiko infeksi jasad patogen sudah berkembang sejalan dengan perkembangan imunologi ikan, namun tidak ada vaksin yang efisien untuk melawan sejumlah penyakit infeksi potensial secara simultan. Antibiotik dan bahan-bahan kimia dapat pula digunakan untuk menghindari infeksi akut, tetapi penggunaan material tersebut secara terus-menerus akan menimbulkan dampak lingkungan yang kurang baik, munculnya generasi bakteri yang resisten, serta akan menurunkan reputasi produk akuakultur di pasaran (Subasinghe *et al.*, 2000) terlebih lagi apabila produk tersebut adalah komoditas ekspor seperti kodok.

Informasi tentang sistem kekebalan pada *species ranid* sudah dilaporkan oleh Crumlish & English (1999) dan Taukhid *et al.* (2000), demikian pula dengan potensi imunogenik serta prospek penggunaan beberapa jenis imunostimulan seperti b-Glukan (Crumlish & English, 1999) dan Lipopolisakarida (Taukhid *et al.*, 2000) dalam kaitannya dengan strategi penanggulangan penyakit pada kodok.

Sejumlah materi biologis telah diketahui mempunyai potensi untuk menginduksi sistem kekebalan non-spesifik pada hewan, termasuk ikan dan udang; serta menunjukkan peningkatan ketahanannya secara simultan terhadap infeksi beberapa jenis patogen (Raa *et al.*, 1992). Ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dengan produk akhir berupa glukukan yang merupakan salah satu elemen struktural penting dari dinding sel adalah imunostimulan yang potensial, dan telah digunakan untuk merangsang mekanisme pertahanan non-spesifik pada organisme tingkat tinggi (Rosenberger, 1976 dalam Raa *et al.*, 1992). Struktur molekul materi tersebut adalah polisakarida yang tersusun atas unit-unit glukosa dengan ikatan b-1,3 dan b-1,6 (Duffus *et al.*, 1982 dalam Raa *et al.*, 1992). Pada tumbuhan, glukukan dapat merangsang produksi fitoaleksins yang merupakan bagian antibiotik dengan bobot molekul rendah, pada invertebrata akan mengaktifkan polifenoloksidase, dan pada tikus mampu meningkatkan mekanisme anti kanker (Robertsen *et al.*, 1990).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respon histologis tubuh kodok terhadap infeksi bakteri patogen *A. hydrophila* melalui teknik infeksi buatan serta penggunaan ekstrak *S. cerevisiae* sebagai imunostimulan yang diberikan melalui pakan didahului dengan *priming* melalui perendaman.

METODE PENELITIAN

Respon histopatologis tubuh kodok terhadap infeksi bakteri patogen

Isolat bakteri yang digunakan sebagai sumber infeksi merupakan hasil *screening* sederhana terhadap 4 (empat) isolat bakteri yang diperoleh dari kodok-kodok sakit di Instalasi Penelitian Perikanan Air Tawar, Depok dengan gejala klinis *red leg*. *Screening* tersebut dilakukan menurut teknik postulat Koch (Thrusfield, 1986); dan setelah diperoleh satu isolat tersangka selanjutnya diidentifikasi menurut Cowan & Steells (1993).

Kandidat isolat terpilih kemudian dikultur secara *in vitro* pada media *Tryptic Soy Agar* (TSA) dan dipanen secara kering, dilarutkan dalam pelarut saline, diestimasi nilai densitas optik (OD) dari beberapa sediaan konsentrasi dengan bantuan spektrofotometer. Selain itu juga dilakukan *total plate count bacteria* secara konvensional, sehingga didapatkan satu formula matematis sebagai standar isolat bakteri tersebut dalam bentuk persamaan regresi linier yang menggambarkan hubungan antara nilai densitas optik dengan konsentrasi bakteri.

Kodok uji berukuran antara 50–60 g/ekor berasal dari satu populasi hasil pemijahan terkontrol di

perbenihan Inlitkanwar, Depok. Aklimatisasi terhadap lingkungan baru dilakukan selama satu minggu sebelum perlakuan. Penggantian air baru dilakukan setiap tiga hari sekali, bersamaan pada saat sampling. Pakan yang diberikan selama percobaan berupa pakan komersial berbentuk *pellet* dengan rasio protein sebanyak 30%, dan diberikan dua kali sehari sebanyak 3% dari bobot tubuh.

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 (tiga) perlakuan yaitu konsentrasi bakteri sebagai faktor utama. Infeksi buatan diberikan melalui penyuntikan secara intra muskular, yaitu (A) 10^6 cfu, (B) 10^8 cfu, dan (C) satu perlakuan disuntik dengan saline 0,85% sebagai kontrol. Wadah percobaan berupa *fiber glass* berdiameter 0,5 m dan diisi kodok sebanyak 10 ekor/wadah. Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

Pengamatan dilakukan secara berkala setiap 3 hari sekali sebanyak 5 kali terhadap gejala klinis, respon histopatologis pada organ hati dan ginjal, reisolasi bakteri dari organ yang luka (borok) dilanjutkan dengan identifikasi, serta mortalitas selama pengujian. Organ hati dan ginjal untuk keperluan pengamatan respon histopatologis diambil secara acak dari tiga ekor kodok yang diambil secara acak untuk masing-masing perlakuan setiap kali sampling (satu ekor per ulangan). Fiksasi dilakukan dalam larutan netral *buffer* formalin 10% dan pewarnaan dengan hematoxilin dan eosin.

Potensi *Saccharomyces cerevisiae* sebagai imunostimulan

Imunostimulan yang digunakan adalah ekstrak *S. cerevisiae* yang diperoleh dari hasil kultur *in vitro*. Kultur biakan dilakukan dalam media modifikasi *Potato Broth Medium*, diinkubasi pada suhu 28°C selama 48–72 jam, dan pemanenan dilakukan melalui teknik penyaringan dan sentrifugasi. Ekstraksi *S. cerevisiae* dilakukan melalui pemecahan sel dengan menggunakan alat sonikator pada amplitudo normal selama 4 x 10 menit dengan interval 5 menit. Pemampatan ekstrak imunostimulan dilakukan melalui teknik sentrifugasi dingin (10°C) pada putaran 4.500 rpm, sedangkan konversi dan standardisasi sediaan dilakukan melalui teknik dehidrasi.

Kodok benggala yang digunakan dalam percobaan ini berukuran percil (10–15 g/ekor) berasal dari satu populasi hasil pemijahan terkontrol. Aklimatisasi terhadap lingkungan baru dilakukan selama satu minggu sebelum perlakuan. Ketinggian air dalam bak disesuaikan dengan tinggi dada kodok, disediakan tempat untuk mendarat, dan bak selalu ditutup 3/4 bagian dengan plastik gelombang. Penggantian air baru

dilakukan setiap dua hari sekali. Pakan yang diberikan selama percobaan berupa pakan komersial berbentuk pelet dengan rasio protein sebanyak 30%, dan diberikan tiga kali sehari sebanyak 3% dari bobot tubuh.

Pemberian imunostimulan dilakukan melalui teknik perendaman dalam larutan yang mengandung ekstrak *S. cerevisiae* pada konsentrasi 100 mg/L selama 60 menit. Perendaman pertama tersebut merupakan *priming* yang bertujuan untuk memberikan *memorizing* terhadap materi imunostimulan, sedangkan pada kelompok kontrol direndam dalam air sumur dalam tempo yang sama. Setelah proses perendaman yang dilakukan secara *pooling*, kemudian kodok-kodok tersebut dipelihara dalam bak-bak *fiber glass* berdiameter 0,5 meter sesuai dengan hasil pengacakan dengan kepadatan masing-masing 10 ekor/bak.

Pemberian imunostimulan berikutnya (*booster*) dilakukan sebanyak dua kali melalui pakan dan ditetapkan sebagai perlakuan. Dosis yang diterapkan yaitu: A (500 mg/kg pakan), B (750 mg/kg pakan), C (1.000 mg/kg pakan), dan D (tanpa pemberian imunostimulan) sebagai kontrol. Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

Rincian jadwal perlakuan tersebut disajikan pada Tabel 1. Selama sepuluh hari sejak *priming*, kodok diberi pakan biasa; kemudian pada hari ke-11 sampai hari ke-15 diberi pakan sesuai perlakuan (*booster I*); pada hari ke-16--25 diberi pakan biasa, dan pada hari ke-26--30 diberi pakan sesuai perlakuan (*booster II*), kemudian pada hari ke-31--40 diberi pakan biasa. Pada hari ke-41 dilakukan sampling I dan dilanjutkan dengan sampling II & III dengan interval 5 hari. Lima hari dari sampling terakhir dilakukan uji tantang dengan satu jenis bakteri patogen yaitu *Aeromonas hydrophila* (isolat yang digunakan pada percobaan I). Infeksi dilakukan melalui penyuntikan intraperitoneal pada konsentrasi 10^8 cfu sebanyak 0,2 mL dan pengamatan berlangsung selama 7 hari.

Pengamatan terhadap pengaruh pemberian perlakuan dilakukan melalui pengambilan darah yang dilakukan secara *cardiac puncture* dengan menggunakan syringe vol. 1,0 mL. Secara ringkas, prosedur pengamatan adalah sebagai berikut: Sebagian dari darah hasil *bleeding* disimpan dalam tabung *ependorf* dan diproses secara hematologis untuk mendapatkan serum darah yang akan digunakan untuk mengetahui ada-tidaknya reaksi silang (*cross-reactivity*) terhadap patogen potensial melalui uji titer antibodi. Pengamatan titer antibodi dilakukan dengan teknik aglutinasi langsung dalam objek *glass* atau *titertek plate* 96-lubang menurut metode yang dikembangkan oleh Carpenter (1975). Pengamatan terhadap sistem kekebalan non-spesifik dilakukan terhadap nilai indeks fagositosis menurut

Tabel 1. Jadwal perlakuan selama percobaan potensi *Saccharomyces cerevisiae* sebagai imunostimulan pada kodok benggala

Table 1. Treatment time schedule of immunostimulant *Saccharomyces cerevisiae* application to induce the frog immune response

Perlakuan (Treatment)	Hari ke- (Day)
Priming (Priming)	1
Booster I (First booster)	11-15
Booster II (Second booster)	26-30
Sampling I (First sampling)	41
Sampling II (Second sampling)	46
Sampling III (Third sampling)	51
Ujiantang (Challenge)	56-63

metode yang dikembangkan oleh Anderson & Siwicki (1993) dengan menggunakan *Staphylococcus aureus* sebagai organisme model dan pengamatan diferensial leukosit dilakukan menurut metode Wedemeyer & Yasutake (1989).

HASIL DAN BAHASAN

Respon histopatologis tubuh kodok terhadap infeksi bakteri patogen

Hasil identifikasi terhadap isolat bakteri uji yang diambil dari bagian luka kodok diketahui bahwa bakteri tersebut adalah jenis *Aeromonas hydrophila* dengan karakter: gram negatif, berbentuk batang pendek, bergerak atau memiliki sifat motil, koloni berwarna krem, bersifat katalase, mampu membentuk gas glukose, bersifat oksidatif-fermentatif, dan menunjukkan hasil positif pada uji *cytochrom oxidase*, *acid glukose*, *ornithin*, *arginin*, dan TSIA.

Gejala klinis setelah diinfeksi secara buatan menunjukkan adanya respon: nafsu makan menurun drastis dan lemah. Sedangkan pada kelompok kontrol tetap memperlihatkan respon yang normal, nafsu makan normal, serta tidak terdapat luka pada lokasi tempat injeksi. Munculnya luka pada kodok uji hanya terjadi pada kelompok yang diinfeksi bakteri dosis 10^8 cfu/ekor dan hal tersebut mulai terjadi pada hari kedua setelah penyuntikan, namun luka tersebut akhirnya berangsur-angsur mengalami proses penyembuhan.

Hingga akhir pengamatan yang dilakukan selama 15 hari sejak proses infeksi, hanya ditemukan 2 ekor kodok yang mengalami kematian, dan keduanya terjadi pada kelompok yang diinfeksi bakteri dosis tinggi. Kematian terjadi di antara hari ke-3 hingga ke-6 setelah proses infeksi, namun dari ke-2 spesimen kodok yang mati tersebut tidak dijumpai adanya gejala klinis yang spesifik berdasarkan pengamatan secara visual. Sedangkan dari hasil pengamatan histopatologis

terdapat indikasi adanya kerusakan pada organ hati maupun ginjal. Kerusakan jaringan sebagai respon histologis tersebut mulai ditemukan pada saat sampling ke-2 hingga akhir percobaan pada kelompok yang diinfeksi bakteri.

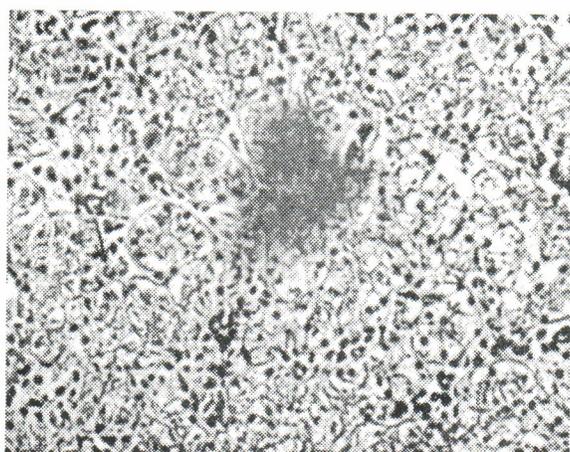
Kerusakan yang terjadi pada hati berupa degenerasi lemak yang ditandai dengan terbentuknya vakuola di antara sel hati, degenerasi pigmen (mela-nosis) dan nekrosis pada sel pembentuknya. Indikasi adanya kerusakan jaringan hati yang diduga akibat infeksi buatan dapat dilihat pada Gambar 1. Roberts (1978) menyatakan bahwa degenerasi lemak merupakan pengelembungan inti sel oleh tetesan lemak dan disebabkan oleh adanya pengendapan dari ceroid atau lipofusin akibat penyerbuan makrofag terhadap benda asing. Degenerasi pigmen ditandai dengan adanya gumpalan warna hitam terutama pada inti sel hati, sehingga nampak berukuran lebih besar dibandingkan dengan ukuran sel normal. Melanosis yang terbentuk diduga sebagai akibat dari respon seluler (monosit) terhadap bakteri, dan hasil dari aktivitas seluler ini terakumulasi membentuk gumpalan hitam pada inti sel. Nekrosis ditandai dengan pengerutan inti sel dan warna inti cenderung menghitam (piknosis), meluruhnya membran inti dan fragmentasi kromatin inti (kariorexis) dan struktur inti menjadi tidak beraturan serta berwarna hitam (kariolisis) (Roberts, 1978).

Kerusakan yang terjadi pada jaringan ginjal sebagian besar adalah terjadinya degenerasi lemak dan nekrosis. Nekrosis terlihat pada glomerulus, di mana dinding sel glomerulus tersebut pecah akibat adanya reaksi terhadap infeksi bakteri. Indikasi adanya kerusakan jaringan ginjal yang diduga akibat infeksi buatan dapat dilihat pada Gambar 2. Hanson & Martha (1983) menyatakan bahwa infeksi bakteri dapat mengakibatkan kematian, kerusakan sel dan fungsinya, serta perubahan keragaan, sedangkan degenerasi lemak dan piknosis pada tubuh ginjal akan berpengaruh terhadap aktivitas ekskresi dan keseimbangan osmoregulasi.

Tabel 2. Kerusakan histologis pada organ hati dan ginjal kodok yang diinfeksi dengan bakteri *Aeromonas hydrophila*
 Table 2. *Histological changes of the frog's liver and kidney after infected by Aeromonas hydrophila bacterin artificially*

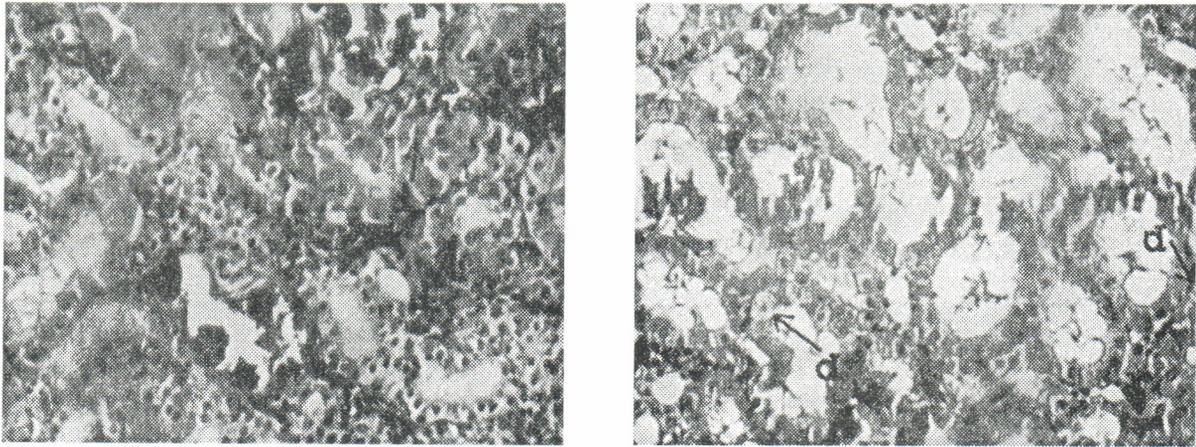
Organ Tissue	Pengamatan ke- Sampling	Dosis bakteri (<i>Bacterial doses</i>)		
		Kontrol Control	10 ⁶ cfu/ekor 10 ⁶ cfu/frog	10 ⁸ cfu/ekor 10 ⁸ cfu/frog
Hati <i>Liver</i>	I	Normal <i>Normal</i>	Normal <i>Normal</i>	Normal <i>Normal</i>
	II	Normal <i>Normal</i>	Mel+deg. lem+pik <i>Mel+fat deg. +pik</i>	Mel+deg. lem+pik <i>Mel+fat deg. +pik</i>
	III	Normal <i>Normal</i>	Mel+deg. lem+pik <i>Mel+fat deg. +pik</i>	Mel+deg. lem+pik <i>Mel+fat deg. +pik</i>
	IV	Normal <i>Normal</i>	Mel+deg. lem+pik <i>Mel+fat deg. +pik</i>	Mel+deg. lem+pik <i>Mel+fat deg. +pik</i>
	V	Normal <i>Normal</i>	Mel+deg. lem+pik <i>Mel+fat deg. +pik</i>	Mel+deg. lem+pik <i>Mel+fat deg. +pik</i>
Ginjal <i>Kidney</i>	I	Normal <i>Normal</i>	Normal <i>Normal</i>	Normal <i>Normal</i>
	II	Normal <i>Normal</i>	Deg. lem+pik <i>Fat deg. +pik</i>	Deg. lem+pik <i>Fat deg. +pik</i>
	III	Normal <i>Normal</i>	Deg. lem+pik <i>Fat deg. +pik</i>	Deg. lem+pik <i>Fat deg. +pik</i>
	IV	Normal <i>Normal</i>	Deg. lem+pik <i>Fat deg. +pik</i>	Deg. lem+pik <i>Fat deg. +pik</i>
	V	Normal <i>Normal</i>	Deg. lem+pik <i>Fat deg. +pik</i>	Deg. lem+pik <i>Fat deg. +pik</i>

Keterangan (Notes): Mel = melanosis (*melanozation*), Deg. Lem = degenerasi lemak (*fat degeneration*), dan Pik = piknosis (*piknotic*)



Gambar 1. Jaringan hati kodok yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* (kiri) dan kontrol (kanan). Anak panah menunjukkan sel yang mengalami melanosis

Figure 1. *Frog's liver tissue infected by Aeromonas hydrophila artificially (left) and control liver tissue (right). Arrow shows melanotic cells*



Gambar 2. Jaringan ginjal kodok yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* (kiri) dan kontrol (kanan). Dalam lingkaran merupakan sel glomerulus yang mengalami nekrosa

Figure 2. Frog's kidney tissue infected by *Aeromonas hydrophila* artificially (left), and control kidney tissue (right). Massive glomerulus necrotic cells inside circle

Potensi *Saccharomyces cerevisiae* sebagai imunostimulan

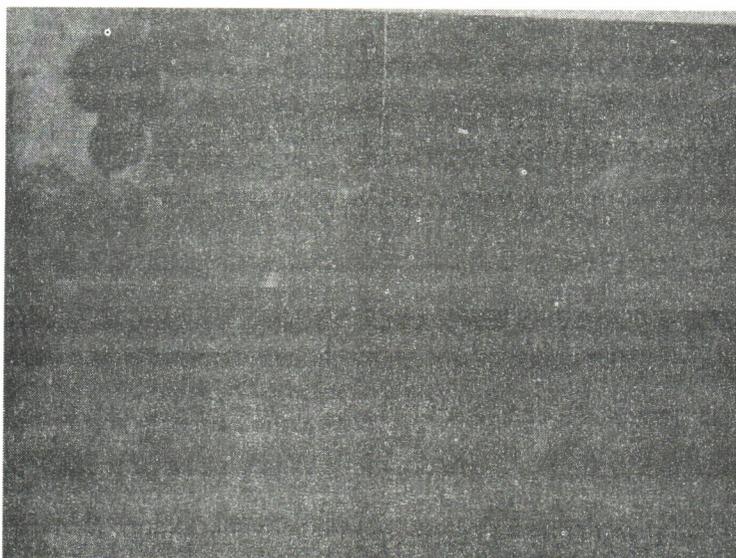
Diferensial leukosit sering digunakan sebagai salah satu parameter hematologis untuk mengetahui status kesehatan dan kemampuan pertahanan tubuh (pertahanan seluler) terhadap infeksi jasad patogen. Nilai rata-rata proporsi 4 jenis sel leukosit

(limfosit, monosit, netrofil, dan trombosit) yang diamati dari kodok uji selama 3 kali sampling disajikan pada Tabel 3, dan gambaran dari masing-masing sel leukosit tersebut dapat dilihat pada Gambar 3. Pada Tabel 3 terlihat bahwa proporsi jumlah sel limfosit dan netrofil untuk kelompok yang diberi perlakuan menunjukkan nilai yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol, sedangkan proporsi jumlah sel monosit dan trombosit

Tabel 3. Rata-rata proporsi nilai diferensial leukosit (limfosit, monosit, netrofil, dan trombosit) darah kodok (*Rana catesbeiana* Shaw) yang diberi imunostimulan (*Saccharomyces cerevisiae*) dan kontrol

Table 3. Mean of differential leucocyte (lymphocyte, monocyte, netrophyl, and trombocyte) proportion value of bullfrog's (*Rana catesbeiana* Shaw) blood were given immunostimulant (*Saccharomyces cerevisiae*) and control

Sampling/Dosis (Sampling/dose)	Limfosit <i>Lymphocyte</i>	Monosit <i>Monocyte</i>	Netrofil <i>Netrophyl</i>	Trombosit <i>Trombocyte</i>
Pertama (First)				
500 mg/kg pakan (500 mg/kg feed)	92.33 ± 3.68	4.33 ± 2.56	5.17 ± 2.08	0.17 ± 0.28
750 mg/kg pakan (750 mg/kg feed)	84.33 ± 12.91	6.5 ± 5.68	8.5 ± 6.08	0.67 ± 1.15
1,000 mg/kg pakan (1,000 mg/kg	86.83 ± 9.31	6.83 ± 5.6	6.33 ± 3.75	0.00 ± 0.00
kontrol (control)	84.33 ± 3.62	7.67 ± 1.26	4.33 ± 1.04	3.67 ± 1.89
Kedua (Second)				
500 mg/kg pakan (500 mg/kg feed)	92.5 ± 7.5	6.33 ± 2.47	5.0 ± 2.18	2.17 ± 3.75
750 mg/kg pakan (750 mg/kg feed)	89.0 ± 3.61	6.83 ± 0.76	8.17 ± 0.76	2.0 ± 3.46
1,000 mg/kg pakan (1,000 mg/kg	90.5 ± 3.28	4.33 ± 1.04	6.17 ± 1.53	1.0 ± 1.73
kontrol (control)	81.67 ± 3.82	7.5 ± 5.41	4.83 ± 3.33	6.0 ± 5.07
Ketiga (Third)				
500 mg/kg pakan (500 mg/kg feed)	90.17 ± 4.25	6.5 ± 1.61	5.67 ± 1.89	0.5 ± 0.00
750 mg/kg pakan (750 mg/kg feed)	88.33 ± 12.05	6.03 ± 7.08	7.33 ± 2.93	3.33 ± 3.8
1,000 mg/kg pakan (1,000 mg/kg	89.67 ± 7.51	6.83 ± 3.25	5.33 ± 4.01	0.17 ± 0.46
kontrol (control)	82.5 ± 9.64	7.83 ± 6.66	5.0 ± 5.57	1.67 ± 2.89



Gambar 3. Jenis-jenis leukosit pada kodok (*Rana catesbeiana* Shaw). Limfosit (L), Monosit (M), Netrofil (N), dan Trombosit (T) dengan pewarnaan giemsa pada pembesaran 1,000x

Figure 3. *Leucocyte types of bullfrog (Rana catesbeiana Shaw). Lymphocyte (L), Monocyte (M), Neutrophyl (N), and Trombocyte (T) with giemsa stain at 1,000x magnification*

nampaknya menunjukkan hal yang sebaliknya, yaitu relatif tinggi pada kelompok kontrol dibandingkan dengan kelompok perlakuan. Lebih tingginya proporsi sel limfosit dan netrofil pada kelompok perlakuan mengindikasikan bahwa imunostimulan tersebut berperan dalam meningkatkan ketahanan non-spesifik tubuh kodok, hal ini didasarkan pada fungsi dari kedua jenis sel darah tersebut. Secara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$), baik antar perlakuan maupun antara perlakuan dengan kontrol. Secara visual terlihat adanya peningkatan proporsi sel-sel fungsional (limfosit dan netrofil) pada kelompok perlakuan.

Sel limfosit berfungsi menyediakan zat kebal untuk pertahanan tubuh (Dellman & Brown, 1989); ditemukan dalam jumlah yang cukup besar, meskipun pada saat infeksi terjadi penurunan. Peningkatan jumlah limfosit pada kelompok perlakuan (Tabel 3) diduga sebagai akibat dari pemberian imunostimulan, hal ini sesuai dengan hipotesis Raa *et al.* (1992) bahwa pemberian imunostimulan akan menstimulir proses produksi lisosim dan komplemen yang akan mengaktifkan limfosit B untuk berdiferensiasi sehingga akan lebih aktif dalam memproduksi antibodi spesifik.

Menurut Dellman & Brown (1989), fungsi netrofil tidak hanya mencapai dan menyerang bahan asing yang masuk ke dalam tubuh, tetapi menjelang kematian membantu meningkatkan pengumpulan makrofag di tempat terjadinya infeksi, sehingga makrofag lebih mudah untuk menghancurkan partikel asing. Makrofag ini mampu memiliki aktivitas fagositosis yang tahan lama, mengolah antigen dalam persiapan untuk

tanggap kebal dan memberi kontribusi langsung pada perbaikan jaringan yang rusak dengan membuang jaringan yang sudah mati, ataupun yang sedang mengalami proses kematian dan yang telah rusak.

Fungsi utama netrofil adalah penghancuran bahan asing melalui proses fagositosis, yaitu kemotaksis di mana sel bermigrasi menuju partikel, perlekatan partikel pada sel, penelanan partikel oleh sel dan penghancuran partikel oleh enzim lisosim di dalam fagolisosom (Tizard, 1988). Keluarnya netrofil dari pembuluh darah pada saat terjadinya infeksi disebabkan karena adanya pengaruh rangsangan kimiawi eksternal atau kemotaksis. Netrofil ini merupakan garis pertahanan pertama yang bergerak cepat ke arah bahan asing dan menghancurkannya, tetapi tidak mampu bertahan lama. Biasanya netrofil hanya menghancurkan tuntas setiap bahan asing yang ditelan dan tidak mengolah antigen sebagai persiapan guna disajikan pada sel peka antigen (Tizard, 1988).

Peningkatan proporsi netrofil pada kelompok perlakuan (Tabel 3) diduga akibat distimulasi oleh materi imunostimulan, sehingga aktivitas produksi oleh organ pembentuk sel tersebut kian meningkat. Pada mamalia, netrofil merupakan sel fagositik dan akan nampak sangat cepat di sekitar tempat yang mengalami luka. Pada ikan yang mengalami luka akibat infeksi bak-teri juga ditemukan adanya migrasi dan fagositosis oleh netrofil dan sel makrofag (Finn & Nielson, 1971).

Proporsi monosit dan trombosit didapatkan relatif rendah pada kelompok perlakuan dibanding dengan kontrol (Tabel 3), hal ini mungkin terjadi sebagai respon keseimbangan hematologi terhadap

peningkatan proporsi sel leukosit jenis lainnya, yaitu limfosit dan netrofil. Sel monosit diduga berperan sebagai sistem pertahanan kedua di mana sistem ini berlangsung lambat dan lama tetapi mampu melakukan fagositosis berulang-ulang (Tizard, 1988). Jumlah trombosit umumnya relatif rendah pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kontrol (Tabel 3). Hal ini diduga karena tidak adanya kodok yang terluka atau terinfeksi patogen. Seperti diketahui bahwa fungsi trombosit itu sendiri adalah untuk pembekuan darah saat terjadi luka dan mencegah kehilangan cairan tubuh pada kerusakan-kerusakan di permukaan kulit (Nabib & Pasaribu, 1989); juga untuk menutup luka (Roberts, 1978).

Indeks fagositik dalam darah kodok yang dihitung terhadap sel fagosit fungsional menunjukkan bahwa pada kelompok yang diberi perlakuan terdeteksi rata-rata lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Fenomena ini merupakan indikator bahwa pada kelompok perlakuan memiliki kemampuan pertahanan non-spesifik yang lebih baik dibandingkan dengan kelompok kontrol. Rata-rata nilai indeks fagositik dari masing-masing perlakuan disajikan pada Tabel 4. Sedangkan hipotesa mekanisme aktivitas fagositik disajikan pada Gambar 4.

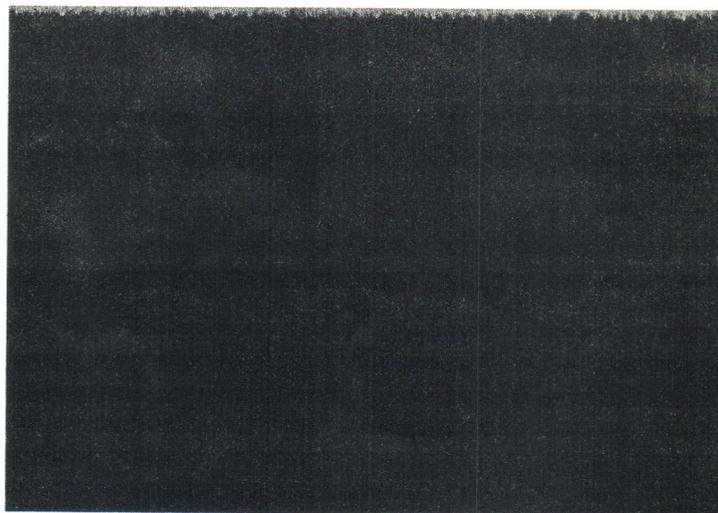
Uji statistik terhadap nilai rata-rata aktivitas fagositik pada selang kepercayaan 95% menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) antara perlakuan

Tabel 4. Rata-rata nilai indeks fagositik (%) sel fagosit fungsional darah kodok (*Rana catesbeiana* Shaw) yang diberi imunostimulan (*Saccharomyces cerevisiae*) dan kontrol

Table 4. Mean of phagocytic index value (%) of bullfrog's (*Rana catesbeiana* Shaw) blood cell phagocyte was given immunostimulant (*Saccharomyces cerevisiae*), and control

Sampling	Perlakuan (Treatment)			
	500 mg/kg pakan 500 mg/kg feed	750 mg/kg pakan 750 mg/kg feed	1000 mg/kg pakan 1000 mg/kg feed	Kontrol Control
Pertama (First)	16.5 ± 1.80a	18.83 ± 3.05a	21.5 ± 3.77a	8.5 ± 5.77b
Kedua (Second)	13.67 ± 1.15a	17.33 ± 1.04a	14.33 ± 3.17a	6.83 ± 1.04b
Ketiga (Third)	14.67 ± 6.11a	18.17 ± 3.25a	16.00 ± 6.56a	5.5 ± 2.29b

Nilai yang diikuti huruf yang sama dalam kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ($P > 0,05$)
Value followed by similar superscripts in the same column are not significantly different) ($P > 0.05$)



Gambar 4. Hipotesis mekanisme proses fagositosis pada sel fungsional darah kodok (*Rana catesbeiana* Shaw). 1 = Sel tanpa bakteri, 2 = Proses pendekatan, 3 = Proses penempelan, dan 4 = Proses penelanan. (Raa et al., 1992)

Figure 4. Hypotetical mechanism of phagocytic activity of bullfrog (*Rana catesbeiana* Shaw) phagocyte blood cell. 1 = cells without bacteria, 2 = approaching process, 3 = attaching process, and 4 = attacking process. (Raa et al., 1992)

dengan kontrol. Namun nilai aktivitas fagositosis pada kelompok kodok yang diberi imunostimulan untuk ketiga dosis perlakuan tidak menunjukkan adanya perbedaan yang nyata, hal ini ditunjukkan oleh hasil uji lanjut BNJ.

Berdasarkan indikasi peningkatan aktivitas fagositik yang terjadi, nampaknya pemberian imunostimulan pada dosis yang lebih tinggi tidak memberikan efek simultan terhadap peningkatan kekebalan non-spesifik. Hal ini sering terjadi dalam aplikasi imunologi, di mana pemberian antigen dalam jumlah yang tidak optimal (terlalu rendah atau terlalu tinggi) dapat memberikan efek yang kurang baik dan bahkan dapat bersifat *immunospressive*, sehingga mengurangi atau bahkan menghilangkan efektivitasnya, meskipun antigen tersebut memiliki potensi imunogenik yang tinggi. Taukhid *et al.* (2000) mendapatkan bahwa pemberian imunostimulan (Lipopolisakarida) secara intraperitoneal pada *R. catesbeiana* sebanyak 50 mg/ekor diperoleh nilai aktivitas fagositik yang lebih tinggi dan stabil dibandingkan dengan kelompok yang diberi dosis lebih tinggi maupun kelompok kontrol. Sedangkan Crumlish & English (1999) melaporkan bahwa pemberian imunostimulan (b-glucan) secara intraperitoneal sebanyak 100 mL (w/v) pada *R. rugulosa* dengan bobot tubuh rata-rata 40 g/ekor memberikan tingkat sintasan yang sangat signifikan dibandingkan dengan kontrol setelah diuji tantang dengan bakteri *Aeromonas hydrophila* patogen.

Dasar pendekatan penggunaan imunostimulan sebagai materi biologis untuk menginduksi kekebalan non-spesifik pada mulanya adalah untuk terapi kanker, karena materi tersebut diketahui mampu mengaktifkan sel makrofag, sel limfosit T dan B, dan sel pembunuh alami; sehingga akan meningkatkan kemampuan tubuh untuk menghancurkan sel-sel tumor. Aktivitas tersebut juga akan meningkatkan ketahanannya terhadap infeksi jasad viral, bakterial dan parasitik (Azuma & Jolles, 1987).

Aktivitas fagositik merupakan salah satu manifestasi respon seluler pada organisme terhadap kehadiran partikel asing. Peningkatan aktivitas fagositik yang cukup nyata pada kelompok perlakuan (Tabel 4) diduga sebagai akibat dari pemberian imunostimulan, karena menurut Raa *et al.* (1992), imunostimulan dapat memacu proses opsonin sel makrofag dan leukosit terhadap partikel asing.

Raa *et al.* (1992) berhasil menguak kemampuan imunostimulan (MacroGard) dalam menstimulir produksi sel makrofag (interleukin-1-like hormone) pada ikan secara *in vitro*. Sel tersebut merupakan signal molekul yang diketahui berperan dalam proses aktivasi sel limfosit T yang berfungsi melipatgandakan

dan memproduksi lebih banyak interferon sebagai aktivator sel makrofag.

Fletcher (1982) dan Lamers (1985) menduga beberapa elemen yang terlibat dalam mekanisme pertahanan non-spesifik pada ikan dan vertebrata lainnya, yaitu terdiri atas sel fagositik, netrofil dan makrofag, komplemen, lisosim, protein, C-reactive, interferon, dan transferin. Sedangkan Crumlish (Percom, 2000) berdasarkan pengamatannya terhadap sel-sel fagosit fungsional pada kodok (*R. rugulosa*) menyatakan bahwa sebagian besar sel leukosit kodok memiliki kemampuan fagositik terhadap partikel asing.

Pengamatan terhadap kemungkinan adanya peran imunostimulan terhadap peningkatan induksi kekebalan spesifik (titer antibodi), menunjukkan bahwa pemberian imunostimulan nampaknya berperan juga dalam upaya memfasilitasi produksi materi kekebalan spesifik. Fenomena ini nampaknya sedikit-banyak turut mendukung hipotesis Raa *et al.* (1992) yang menyatakan bahwa imunostimulan tidak hanya berfungsi sebagai aktivator mekanisme pertahanan non-spesifik, namun juga turut memfasilitasi proses produksi lisosim dan komplemen yang akan mengaktifkan limfosit B untuk berdiferensiasi bagi keperluan produksi antibodi spesifik. Nilai rata-rata titer antibodi dalam serum darah kodok uji yang dilakukan dengan teknik aglutinasi langsung disajikan pada Tabel 5.

Pada tabel tersebut terlihat bahwa nilai rata-rata titer antibodi kelompok kodok yang diberi imunostimulan lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol, dan secara statistik menunjukkan perbedaan yang nyata pada selang kepercayaan 95% ($P > 0,05$). Raa *et al.* (1992) menyatakan bahwa imunostimulan tidak hanya berfungsi sebagai aktivator mekanisme pertahanan non-spesifik, namun juga turut memfasilitasi proses produksi lisosim dan komplemen yang akan mengaktifkan limfosit B untuk berdiferensiasi memproduksi antibodi spesifik.

Berdasarkan hasil uji tantang terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* aktif yang dilakukan satu minggu setelah sampling terakhir, tidak diperoleh informasi yang jelas. Karena hingga akhir pengamatan yang dilakukan selama satu minggu sejak proses infeksi, tidak ada satu ekor pun kodok uji yang mengalami kematian. Sedangkan gejala klinis umum yang terlihat pada kodok-kodok uji antara lain kurang nafsu makan, lamban, dan lemah. Kemungkinan hal ini dapat terjadi karena beberapa faktor: 1) Populasi kodok uji yang digunakan pada percobaan ini sebelumnya pernah terpapar oleh bakteri *A. hydrophila*, sehingga di dalam tubuhnya telah terbentuk antibodi spesifik yang diperoleh secara alamiah, hal ini juga terlihat pada hasil pengukuran titer antibodi, di mana semua kelompok kodok memiliki serum darah yang

Tabel 5. Rata-rata nilai titer antibodi serum darah kodok (*Rana catesbeiana* Shaw) yang diberi imunostimulan (*Saccharomyces cerevisiae*) dan kontrol

Table 5. Mean of antibody titres of bullfrog's (*Rana catesbeiana* Shaw) blood serum were given immunostimulant (*Saccharomyces cerevisiae*) and control

Percontoh (Sampling)	Perlakuan (Treatment)			
	500 mg/kg pakan 500 mg/kg feed	750 mg/kg pakan 750 mg/kg feed	1.000 mg/kg pakan 1,000 mg/kg feed	Kontrol Control
Pertama (First)	3.207 ± 0.174 ^a	3.408 ± 0.301	2.906 ± 0.174	2.506 ± 0.000
Kedua (Second)	3.200 ± 0.013	3.420 ± 0.000	3.207 ± 0.174	2.605 ± 0.174
Ketiga (Third)	3.308 ± 0.174	3.207 ± 0.174	3.307 ± 0.000	2.605 ± 0.174

Angka-angka tersebut merupakan hasil transformasi log nilai titer + 1, dan angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata (P>0,05)

The numbers above have been transformed into log (titre + 1), and superscript in columns followed by the same letter are not significantly different) (P>0.05)

bereaksi positif terhadap antigen tersebut. 2) Faktor *host spesific target*, meskipun isolat bakteri *A. hydrophila* yang digunakan dalam proses ujiantang diisolasi dari kodok sakit, namun patut diduga bahwa jenis bakteri tersebut bukan satu-satunya *primary pathogen* yang mampu menimbulkan gejala *red leg*. Hasil isolasi bakteri dari beberapa kodok sakit dengan gejala serupa yang dilakukan oleh Somsiri & Soontornvit (2000) ternyata ditemukan lebih dari satu jenis, yaitu bakteri *Aeromonas* spp., *Achromobacter* sp., *Citrobacter freundii*, *Flexibacter columnaris*, *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., *Serratia* sp., *Staphylococcus* sp., dan *Streptococcus*.

KESIMPULAN DAN SARAN

- * Infeksi buatan tubuh kodok terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* yang dilakukan melalui penyuntikan secara intra muskular (IM) pada konsentrasi 10⁶ cfu dan 10⁸ cfu menunjukkan bahwa infeksi bakteri model pada konsentrasi tersebut tidak menyebabkan respon histologis yang serius dan tidak mengakibatkan kematian hewan uji.
- * Pemberian imunostimulan dalam bentuk ekstrak *Saccharomyces cerevisiae* yang diberikan melalui perendaman dan dilanjutkan dengan pemberian melalui pakan dapat meningkatkan respon kekebalan tubuh kodok.
- * Imunoterapi merupakan alternatif strategi penanggulangan penyakit yang prospektif sebagai tindakan pencegahan, namun dari kenyataan begitu variatifnya patogen penyebab penyakit pada kodok budi daya; maka perlu adanya identifikasi patogen yang dilakukan secara periodik dari spesimen-spesimen kodok sakit yang dilanjutkan dengan pengujian efektivitas penggunaan obat-obatan/ antibiotik sebagai upaya tindakan kuratif.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, D.P. 1974. *Fish Immunology*. In Disease of Fishes. Edited by Snieszko, J.F. and H.R. Axelrod. TFH Publ. Hongkong. 318 pp.
- Anderson, D.P. and A.K. Siwicki. 1993. Basic hematology and serology for fish health programs. *Asian Fisheries Society*. 26 pp.
- Azuma, I. and G. Jolles. 1987. Development of immunostimulants in Japan. In: Immunostimulants now and tomorrow. *Japan Sci. Soc. Press*, Tokyo and Springer Verlag, Berlin. p. 41--56.
- Carpenter, P.L. 1975. *Immunology and Serology*. Third Ed. W.B. Saunders. Co, Philadelphia. 296 pp.
- Cowan and Steells. 1993. *Manual for the Identification of Medical Bacteria* (Edited by G.I. Barrow & R.K.A. Feltham). Cambridge University Press. Cambridge. 317 pp.
- Crumlish, M. and V. English. 1999. Improved disease resistance in *Rana rugulosa* (Daudin) after b-glucan administration. *Aquaculture Research*, Blackwell Science Ltd. 30: 431--435.
- Dellman, H.D. and E.M. Brown. 1989. *Buku Teks Histologi Veteriner*. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta. 279 pp.
- Finn, J.P. and N.O. Nielson. 1971. The inflammatory of rainbow trout. *J. Fish Biol.* 3: 463--478.
- Fletcher, T.C. 1982. Non-specific defence mechanisms of fish. *Dev. Comp. Immunol.* 2: 123--132 (Suppl).
- Hanson, R.P. and G. Martha. 1983. *Animal Disease Control Regional Programs*. The Iowa State University Press, Ames, IOWA. 211 pp.
- Lamers, C.H.J. 1985. *The Reaction of the Immune System of Fish to Vaccination*. Abstract of PhD thesis. Agricultural University Wageningen, Netherlands.
- Kanchanathan, S. U. Saduakdee, A. Kreethachat, and S. Chinabut. 2000. Isolation of A. FV3-like Iridovirus from a cutaneous ulceration and systemic inflammation with exuberant hematopoiesis or CSE dis-

- ease of Mundriyanto, H., Rusmaedi, dan H. Djajasewaka. 1993. Berbagai tipe kandang untuk pembesaran katak benggala (*Rana catesbeiana* Shaw). *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Perikanan Air Tawar* 1992/1993. p. 266--270.
- Nabib, R. dan F.H. Pasaribu. 1989. *Patologi dan Penyakit Ikan*. Dep Dik Bud. Dirjen Pendidikan Tinggi. PAU Bioteknologi. IPB. p. 37--41.
- Kanchanakhan, S. 1998. An ulcerative disease of the cultured tiger frog, *Rana tigrina* in Thailand: virological examination. *The Aquatic Animal Health Research Institute (AAHRI) Newsletter*. Vol. 7 No. 2.
- Kanchanakhan, S., U. Saduakdee, A. Kreethachat, and S. Chinabut. 2000. Isolation of A FV3-like Iridovirus from a cutaneous ulceration and systemic inflammation with exuberant hematopoiesis or CSE disease of cultured frog, *Rana tigrina* Cantor, in Thailand. *The Aquatic Animal Health Research Institute (AAHRI) Newsletter*. Vol. 9 No. 1, June 2000. p. 5--7.
- Raa, J., G. Roerstad, R. Engstad, and B. Robertsen. 1992. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. *In Diseases in Asian Aquaculture 1. Proceeding of the First Symposium on Diseases in Asian Aquaculture*, 26-29 November 1990, Bali, Indonesia. M. Shariff, R.P. Subasinghe and J.R. Arthur. (Eds.) Manila, Philippines, Fish Health Section, *Asian Fisheries Society*. p. 39--50.
- Roberts, R.J. 1978. *Fish Pathology of Fish*. Iowa State University Press, Ames, Iowa. p. 3--10.
- Robertsen B., G. Rorstad., R. Engstad, and J. Raa. 1990. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic Salmon, *Salmo salar* L., by a Glukan From *Saccharomyces cerevisiae* Cell Walls. *Journal of Fish Disease* 13: 391-400.
- Somsiri, T. and S. Soontornvit. 2000. Bacterial diseases of cultured tiger frog (*Rana tigerina*). *The Aquatic Animal Health Research Institute (AAHRI) Newsletter*. Vol. 9 No. 1, June 2000. p. 3--5.
- Subasinghe, R.P., U. Barg, and A. Tacon. 2000. Chemicals in Asian Aquaculture: Need, usage, issues, and challenges. *Proceedings of the Meeting on the Use of Chemicals in Aquaculture in Asia*. 20-22 May 1996, Tigbauan, Iloilo, Phillipines. JR. Arthur, CR Lavilla-Pitogo, and RP Subasinghe. (Eds.) SEAFDEC Aquaculture Department 5021 Tigbauan, Iloilo, Phillipines. p. 1--5.
- Tizard, I.R. 1988. *An Introduction to Veterinary Immunology*. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 240 pp
- Thrusfield, M. 1986. *Veterinary Epidemiology*. Butterworth & Co. Ltd. Butterworth. Great Britain. 462 pp.
- Wedemeyer, G.A. and W.T. Yasutake. 1989. Clinical methods for the assessment of the effects of environmental stress on fish health. *Technical Report of Fisheries of the U.S. Fish and Wildlife Service*. 18 pp.