

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

SKRINING MARKA MHC-I DAN MHC-II PADA IKAN LELE AFRIKA (*Clarias gariepinus*) SEBAGAI GEN PENYANDI RESISTEN PENYAKIT *Motile Aeromonas Septicaemia* (MAS)

Rommy Suprpto[#], Bambang Iswanto, Huria Marnis, dan Joni Haryadi

Balai Riset Pemuliaan Ikan
Jl. Raya 2 Sukamandi, Subang 41263, Jawa Barat

(Naskah diterima: 30 November 2020; Revisi final: 24 Desember 2020; Disetujui publikasi: 24 Desember 2020)

ABSTRAK

Salah satu kendala yang dihadapi para pembudidaya ikan lele adalah serangan penyakit yang menyebabkan kematian massal sehingga mengakibatkan kerugian. Alternatif solusi yang dapat dilakukan adalah melakukan seleksi ikan lele tahan penyakit berbasis marka molekuler untuk memperoleh populasi unggul ikan lele. Seleksi dilakukan pada gen marka yang berkaitan dengan sistem imun yaitu MHC-I dan MHC-II. Tujuan penelitian ini adalah melakukan skrining marka MHC-I dan MHC-II pada ikan lele *strain* Mutiara, Paiton, Kenya, dan Sangkuriang yang merupakan koleksi di Balai Riset Pemuliaan Ikan (BRPI) Sukamandi. Jumlah sampel ikan pada tiap *strain* yang diambil untuk *strain* Mutiara, Paiton, Kenya, dan Sangkuriang masing-masing 14, 13, 3, dan 13 sampel. Analisis keberadaan marka MHC-I dan MHC-II dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi dan Genetika BRPI Sukamandi. Skrining keberadaan marka MHC-I dan MHC-II dilakukan menggunakan metode PCR. Hasil menunjukkan persentase ikan yang positif membawa marka MHC-I adalah *strain* Mutiara 85,71%; *strain* Paiton 30,77%; *strain* Kenya 100%; dan *strain* Sangkuriang 92,31%; selanjutnya skrining ikan yang positif membawa marka MHC-II pada *strain* Mutiara menunjukkan persentase sebanyak 71,43%; *strain* Paiton 61,54%; *strain* Kenya 100%; dan pada *strain* Sangkuriang 0%. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa ikan lele *strain* Mutiara, Paiton, dan Kenya adalah populasi yang potensial untuk menjadi kandidat dalam kegiatan seleksi ikan lele tahan penyakit berbasis marka molekuler MHC-I dan MHC-II.

KATA KUNCI: marka MHC; lele; *strain*; penyakit

ABSTRACT: *Screening of MHC-I and MHC-II marker on the African catfish (Clarias gariepinus) as a gene code Motile Aeromonas Septicaemia (MAS) disease resistance. By: Rommy Suprpto, Bambang Iswanto, Huria Marnis, and Joni Haryadi*

One of the challenges faced by catfish farmers is disease outbreaks that can cause mass mortality resulting in significant economic losses. This study aimed to provide an alternative solution to overcome this issue by selecting disease-resistant catfish via molecular markers to obtain a catfish's superior population. The selection was carried out on marker genes related to the immune system, namely MHC-I and MHC-II. This study screened the MHC-I and MHC-II markers on catfish strains of Mutiara, Paiton, Kenyan, and Sangkuriang, which were the collections of Balai Riset Pemuliaan Ikan (BRPI) Sukamandi. The number of fish samples for Mutiara, Paiton, Kenyan, and Sangkuriang strains were 14, 13, 3, and 13 samples, respectively. Analysis of the presence of MHC-I and MHC-II markers was carried out at the Physiology and Genetics Laboratory of BRPI Sukamandi. Screening for the presence of MHC-I and MHC-II markers was carried out using the PCR method. The results showed that the percentages of positive fish carrying MHC-I marker were 85.71% for Mutiara strain, 30.77% for Paiton strain, 100% for Kenyan strain, and 92.31% for Sangkuriang strain. Furthermore, the percentages of positive screening of fish carrying MHC-II markers were 71.43% for Mutiara strains, 61.54% for Paiton strains, 100% for Kenyan strain, and 0% for Sangkuriang strain. This study's findings suggest that the catfish strains of Mutiara, Paiton, and Kenyan are the potential populations to serve as the candidates in the selection of disease-resistant catfish based on molecular markers MHC-I and MHC-II.

KEYWORDS: marker MHC; catfish; *strain*; disease

[#] Korespondensi: Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan. Jl. Sempur No. 1, Bogor 16129, Indonesia
Tel.: +62 251 8313200
E-mail: nunanafiqoh@gmail.com

PENDAHULUAN

Major histocompatibility complex (MHC) merupakan sekelompok gen yang bertugas mengkodekan glikoprotein seluler yang bertanggung jawab untuk menghadirkan antigen secara internal maupun eksternal pada reseptor sel T (TCR), dan dengan demikian akan memulai respons imun pada hewan vertebrata (Sommer, 2005; Rakus, 2008). Secara umum molekul MHC dibagi menjadi dua sub-kelompok utama sesuai dengan struktur kimianya dan fungsi molekulnya (Pierny & Oliver, 2006; Srisapoom et al., 2004); dua sub-kelompok MHC terlibat dalam kekebalan, yaitu a) molekul kelas-I yang diekspresikan pada permukaan sel berinti dan yang terutama bertanggung jawab untuk menyajikan peptida antigenik seperti berasal dari virus, dan b) molekul kelas-II yang terjadi pada *antigen presenting cells* (APC) dan terlibat dalam menyajikan epitop yang berasal dari antigen ekstraseluler yang merupakan fagositosis atau endositosis (Osborne & Turner, 2011). Semua molekul MHC dicirikan oleh tingkat polimorfisme yang sangat tinggi (yang merupakan salah satu karakter paling penting dari gen MHC, yang memberikan dasar untuk skrining gen tahan penyakit yang berkaitan dengan marka molekuler), terutama karena banyaknya alel yang ada dalam populasi, dan variasi urutan yang tinggi antara alel (Grimholt et al., 2003; Pang et al., 2013). Polimorfisme pada gen MHC-I dan II terutama ditemukan dalam pengodean kodon pada *peptide binding region* (PBR), MHC-I diekspresikan oleh semua sel yang berinti, sedangkan MHC-II diekspresikan hanya oleh sub-kelompok yang terbatas, termasuk *thymic epithelial cells* (TEC) dan sel APC lainnya (Picchiatti et al., 2015).

Seiring berkembangnya studi tentang MHC, banyak penelitian yang menunjukkan tingkat polimorfisme yang tinggi baik itu pada MHC-I maupun MHC-II terkait erat dengan resistensi atau kerentanan terhadap penyakit pada ikan nila (Poonsawat et al., 2009; Pang et al., 2013; Zhou et al., 2013), ikan mas (Rakus et al., 2009; Hayuningtyas et al., 2013), *rainbow trout* (Aoyagi et al., 2002; Grimholt et al., 2002), *Chinese longsnout catfish* (Shen et al., 2011), turbot *Scophthalmus maximus* (Min et al., 2012), Atlantik salmon (Kjoglum et al., 2006), belut (Li et al., 2014), dan *channel catfish* (Moulana et al., 2008; Li et al., 2013).

Pada ikan lele (*Clarias* sp.), beberapa penelitian menunjukkan bahwa fragmen MHC-I (Azis et al., 2015a; Alimuddin et al., 2018) dan MHC-II (Suprpto et al., 2017) dapat menjadi marka molekuler ikan lele tahan penyakit terutama pada penyakit *motile aeromonas septicaemia* (MAS) yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophilla*. Dengan demikian penelitian tentang MHC-I dan MHC-II terutama pada *strain-strain* ikan lele yang

terdapat di Indonesia sangat diperlukan terkait dengan program seleksi ikan lele resisten penyakit MAS. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melakukan skrining marka MHC-I dan MHC-II pada ikan lele *strain* Mutiara, Paiton, Kenya, dan Sangkuriang untuk program seleksi menghasilkan ikan lele resisten penyakit MAS.

BAHAN DAN METODE

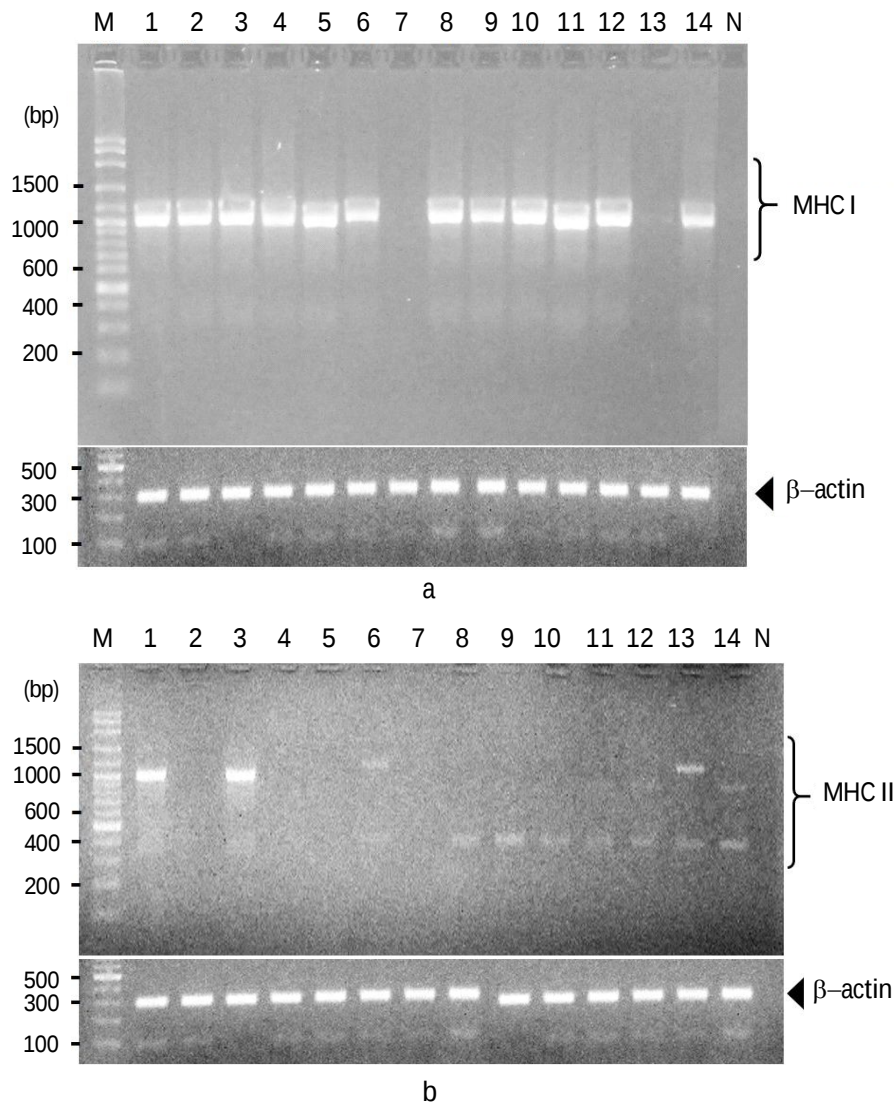
Penelitian dilakukan di Balai Riset Pemuliaan Ikan (BRPI) Sukamandi, menggunakan koleksi sebagai ikan uji dan skrining marka dilaksanakan di Laboratorium Genetika dan Fisiologi. Jumlah sampel ikan pada tiap *strain* yang diambil tidak sama disesuaikan dengan jumlah ikan koleksi, 14 *strain* Mutiara, 13 Paiton, tiga Kenya, dan 13 Sangkuriang.

Skrining MHC-I dan MHC-II menggunakan DNA diekstraksi dari sirip ikan dengan menggunakan kit *Gene Jet Genomic DNA Purification* (Thermo Scientific, USA) amplifikasi menggunakan PCR mycycler (Biorad, USA). Amplifikasi dilakukan dengan kit *Maxima hot start green PCR master Mix (2X)* (Fermentas, Thermo Scientific). Komposisi pereaksi PCR terdiri atas 1 $\frac{1}{4}$ L primer forward; 1 $\frac{1}{4}$ L primer reverse; 2 $\frac{1}{4}$ L DNA; 12,5 $\frac{1}{4}$ L kit Master mix PCR; dan 8,5 $\frac{1}{4}$ L nuclease free water. Program amplifikasi PCR yang digunakan untuk MHC-I adalah pre-denaturasi pada suhu 94°C selama lima menit; 35 siklus PCR dengan denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 55°C selama 30 detik, dan ekstensi pada suhu 72°C selama satu menit; dan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama tujuh menit (Azis et al., 2015a); sedangkan untuk MHC-II adalah pre-denaturasi pada suhu 95°C selama empat menit; 35 siklus PCR dengan denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 55°C selama satu menit, dan ekstensi pada suhu 72°C selama satu menit; dan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit (Suprpto et al., 2017). Sebagai kontrol internal *loading* DNA digunakan primer β -aktin. Setelah mesin menjadi dingin ($\pm 4^\circ\text{C}$), tabung mikro dikeluarkan dari mesin PCR. Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan gel agarosa 2% (w/v), pada tegangan 60 volt selama 50 menit. DNA divisualisasi dengan menggunakan *gel red* (Biotum Inc. California, USA) dan selanjutnya divisualisasikan menggunakan gel doc UV transiluminator.

HASIL DAN BAHASAN

Hasil analisis keberadaan marka MHC-I dan MHC-II menggunakan metode PCR pada ikan lele *strain* Mutiara tersaji pada Gambar 1.

Keberadaan marka MHC-I pada ikan lele Mutiara menunjukkan pita DNA tunggal berukuran sekitar 1.000 bp, dengan persentase ikan yang positif



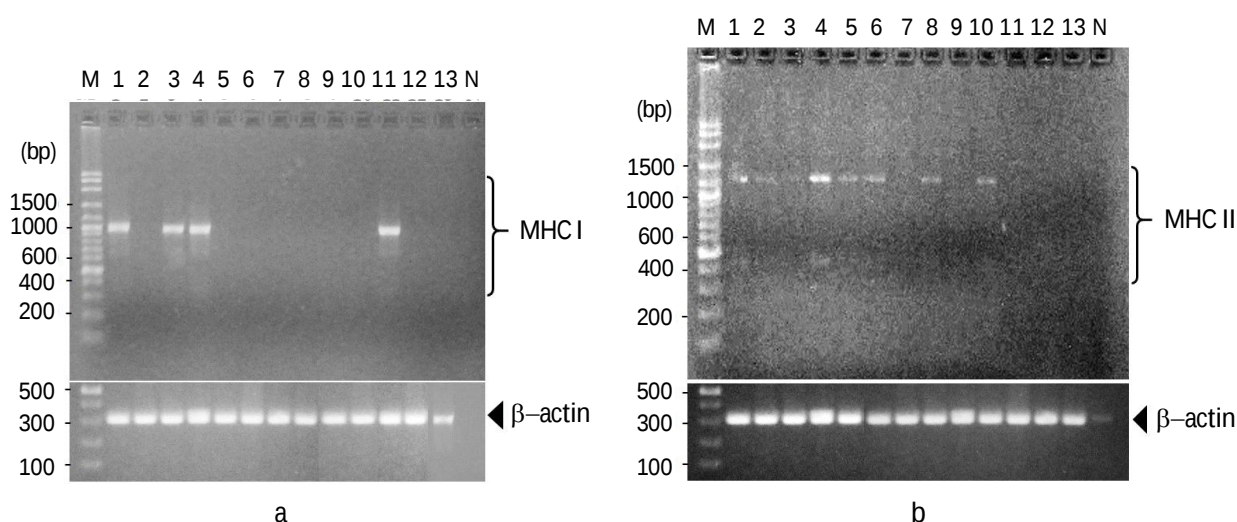
Gambar 1. Amplifikasi PCR dalam deteksi marka molekuler dengan target gen MHC-I dan MHC-II pada ikan lele *strain* Mutiara. β -aktin digunakan sebagai kontrol *loading* DNA. M = marka ukuran fragmen DNA; 1-14 = nomor ikan uji; dan N = produk PCR tanpa cetakan DNA (sebagai kontrol negatif).

Figure 1. PCR amplification to detect MHC-I and MHC-II gene markers on the Mutiara strain catfish. β -actin = DNA loading control. M = DNA ladder; 1-14 = numbers of examined specimens; and N = the PCR products without DNA template.

membawa marka MHC-I sebesar 85,71%. Sedangkan ikan lele Mutiara yang positif membawa marka MHC-II belum menunjukkan pita DNA tunggal, yakni berukuran sekitar 400 bp dan 1.500 bp, dengan persentase ikan yang positif membawa marka MHC-II sebanyak 71,43%. Tidak terdapatnya pita DNA produk PCR pada kontrol negatif (N) menunjukkan bahwa tidak ada kontaminasi dalam proses amplifikasi PCR. Selanjutnya, PCR dengan menggunakan primer β -aktin menghasilkan pita DNA untuk semua sampel berukuran sama, yaitu sekitar 300 bp. Hal tersebut

menunjukkan bahwa semua sampel ikan uji yang tidak ada pita DNA pada produk PCR saat menggunakan primer MHC-I dan MHC-II adalah karena tidak ada DNA target pada sampel tersebut.

Selanjutnya pada Gambar 2 tersaji hasil analisis keberadaan marka MHC-I dan MHC-II menggunakan metode PCR pada ikan lele Paiton. Keberadaan marka MHC-I pada ikan lele Paiton telah menunjukkan pita DNA tunggal dan berukuran sekitar 1.000 bp, dengan persentase ikan yang positif membawa marka MHC-I sebesar 30,77%. Pada sampel ikan lele yang positif



Gambar 2. Amplifikasi PCR dalam deteksi marka molekuler dengan target gen MHC-I dan MHC-II pada ikan lele *strain* Paiton. β -aktin digunakan sebagai kontrol *loading* DNA. M= marka DNA; 1-14= nomor ikan uji; dan N= produk PCR tanpa cetakan DNA (sebagai kontrol negatif).

Figure 2. PCR amplification to detect MHC-I and MHC-II gene markers on the Paiton catfish strain. β -actin= DNA loading control. M= DNA ladder; 1-14= numbers of examined specimens; and N= the PCR products without DNA template.

membawa marka MHC-II juga belum menunjukkan pita DNA tunggal, yakni berukuran sekitar 400 bp dan 1.200 bp, dengan persentase ikan yang positif membawa marka MHC-II sebanyak 61,54%. Tidak terdapatnya pita DNA produk PCR pada kontrol negatif (N) menunjukkan bahwa tidak ada kontaminasi dalam proses amplifikasi PCR. Selanjutnya, PCR dengan menggunakan primer β -aktin menghasilkan pita DNA untuk semua sampel berukuran sama, yaitu sekitar 300 bp. Hal tersebut menunjukkan bahwa semua sampel ikan uji yang tidak ada pita DNA pada produk PCR saat menggunakan primer MHC-I dan MHC-II adalah karena tidak ada DNA target pada sampel ikan tersebut.

Hasil analisis keberadaan marka MHC-I dan MHC-II menggunakan metode PCR pada ikan lele Kenya tersaji pada Gambar 3.

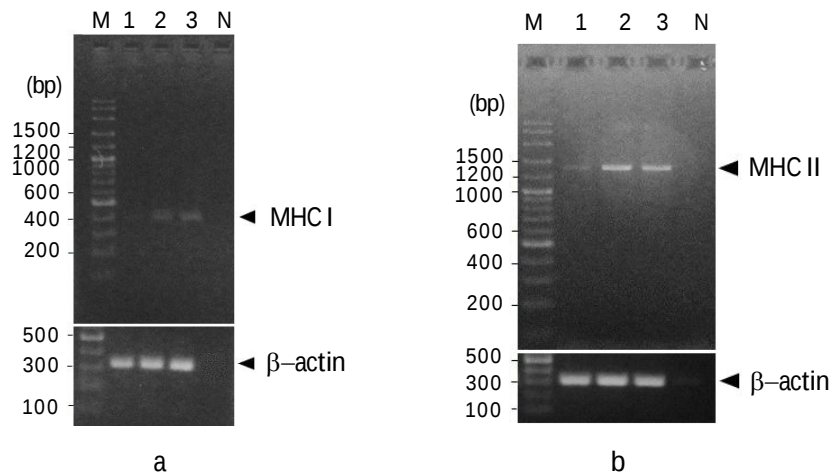
Keberadaan marka MHC-I pada ikan lele Kenya telah menunjukkan pita DNA tunggal dan berukuran sekitar 400 bp, dengan persentase ikan yang positif membawa marka MHC-I sebesar 100%. Untuk sampel ikan lele yang positif membawa marka MHC-II juga telah menunjukkan pita DNA tunggal, yakni berukuran sekitar 1.300 bp, dengan persentase ikan yang positif membawa marka MHC-II sebanyak 100%. Tidak terdapatnya pita DNA produk PCR pada kontrol negatif (N) menunjukkan bahwa tidak ada kontaminasi dalam proses amplifikasi PCR. Selanjutnya, PCR dengan

menggunakan primer β -aktin menghasilkan pita DNA untuk semua sampel berukuran sama, yaitu sekitar 300 bp. Hal tersebut menunjukkan bahwa semua sampel ikan uji yang tidak ada pita DNA pada produk PCR saat menggunakan primer MHC-I dan MHC-II adalah karena tidak ada DNA target pada sampel ikan tersebut.

Selanjutnya hasil analisis keberadaan marka MHC-I dan MHC-II pada ikan lele Sangkuriang tersaji pada Gambar 4.

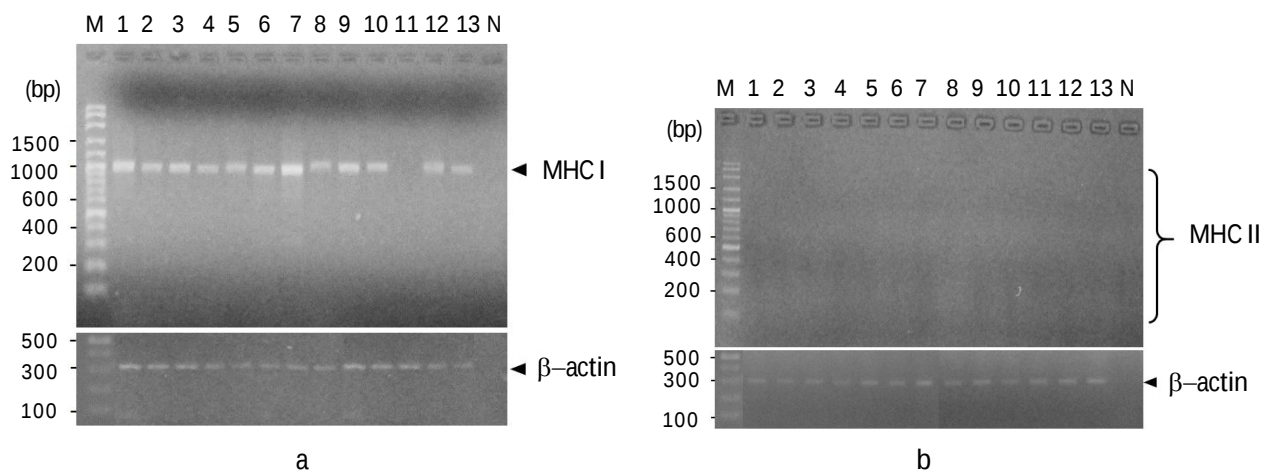
Keberadaan marka MHC-I pada ikan lele Sangkuriang telah menunjukkan pita DNA tunggal dan berukuran sekitar 1.000 bp, dengan persentase ikan yang positif membawa marka MHC-I sebesar 92,31%. Namun demikian tidak terdapat sampel ikan lele Sangkuriang yang positif membawa marka MHC-II. Tidak terdapatnya pita DNA produk PCR pada kontrol negatif (N) menunjukkan bahwa tidak ada kontaminasi dalam proses amplifikasi PCR. Selanjutnya, PCR dengan menggunakan primer β -aktin menghasilkan pita DNA untuk semua sampel berukuran sama, yaitu sekitar 300 bp. Hal tersebut menunjukkan bahwa semua sampel ikan uji yang tidak ada pita DNA pada produk PCR saat menggunakan primer MHC-I dan MHC-II adalah karena tidak ada DNA target pada sampel ikan tersebut.

Hasil analisis keberadaan marka MHC-I dan MHC-II pada ikan lele *strain* Mutiara, Paiton, Kenya, dan Sangkuriang menunjukkan adanya keberadaan gen



Gambar 3. Amplifikasi PCR dalam deteksi marka molekuler dengan target gen MHC-I dan MHC-II pada ikan lele *strain* Kenya. β -aktin digunakan sebagai kontrol *loading* DNA. M = marka DNA; 1-14 = nomor ikan uji; dan N = produk PCR tanpa cetakan DNA (sebagai kontrol negatif).

Figure 3. PCR amplification to detect MHC-I and MHC-II gene markers on the Kenyan catfish strain. β -actin = DNA loading control. M = DNA ladder; 1-14 = numbers of examined specimens; and N = the PCR products without DNA template.



Gambar 4. Amplifikasi PCR dalam deteksi marka molekuler dengan target gen MHC-I dan MHC-II pada ikan lele *strain* Sangkuriang. β -aktin digunakan sebagai kontrol *loading* DNA. M = marka DNA; 1-14 = nomor ikan uji; dan N = produk PCR tanpa cetakan DNA (sebagai kontrol negatif).

Figure 4. PCR amplification to detect MHC-I and MHC-II gene markers on the Sangkuriang catfish strain. β -actin = DNA loading control. M = DNA ladder; 1-14 = numbers of examined specimens; and N = the PCR products without DNA template.

MHC-I pada keempat *strain* tersebut, akan tetapi hanya tiga *strain* yang menunjukkan adanya keberadaan gen MHC-II yaitu *strain* Mutiara, Paiton, dan Kenya. Hasil dari amplifikasi PCR juga belum menunjukkan pita DNA tunggal, yaitu untuk MHC-I berkisar 400-1.000 bp, sedangkan untuk MHC-II berkisar antara 400-1.500 bp. Azis *et al.* (2015a) dalam penelitiannya melaporkan

bahwa marka MHC-I ikan lele belum menunjukkan pita DNA tunggal, yakni sekitar 300 bp, 500 bp, dan 1.000 bp. Akan tetapi berbeda dengan penelitian Suprpto *et al.* (2017) yang menunjukkan hasil amplifikasi PCR pita DNA tunggal MHC-II yaitu 426 bp pada ikan lele *strain* Mutiara. Penelitian Suprpto *et al.* (2017) menunjukkan bahwa benih ikan yang positif membawa

marka MHC-II memiliki daya tahan dan respons imunitas yang lebih baik dibandingkan benih ikan yang tidak membawa marka MHC-II, hal ini dikarenakan kemampuan ikan dalam memproduksi antibodi rendah, sehingga ikan lebih banyak mengandalkan pada kemampuan imunitas bawaan (imun non-spesifik) untuk melawan infeksi patogen, sehingga dapat menstimulasi kekebalan tubuh khususnya untuk memproduksi antibodi melalui limfosit B, sehingga daya tahan tubuh dalam merespons adanya infeksi patogen akan meningkat. Hasil tersebut senada dengan penelitian Azis *et al.* (2015b) yang melaporkan bahwa peran MHC dalam sistem kekebalan pada tubuh ikan adalah untuk sebagai penanda kehadiran dari antigen.

Di samping itu, MHC sebagai penanda molekuler juga menunjukkan bahwa resistensi dapat diwariskan, dan tingkat kelangsungan hidup sekitar 2,2 kali lebih tinggi daripada ikan tanpa penanda molekuler (Azis *et al.*, 2015b). Hal ini diperkuat juga oleh penelitian Alimuddin *et al.* (2018) yang melaporkan bahwa benih ikan dari induk yang positif MHC-I memiliki tingkat pertumbuhan dan sintasan yang lebih tinggi dibandingkan dengan benih dari induk yang negatif MHC I. Pada penelitian yang lain juga melaporkan bahwa terdapat asosiasi gen MHC ikan teleost dengan resistensi penyakit, yaitu pada ikan rainbow trout dan Atlantik salmon di mana seluruh genomnya yang resisten terhadap penyakit dapat dengan mudah dikaitkan dengan informasi sekuens genom keseluruhan (Berthelot *et al.*, 2014; Lien *et al.*, 2016) yang tersedia di tingkat kromosom dan kelompok kekerabatan (Phillips *et al.*, 2006; Palti *et al.*, 2011). Dijelaskan pula oleh Kaufman (2018) bahwa variasi alel MHC umumnya diyakini dapat meningkatkan perlindungan suatu populasi spesies terhadap patogen. Sejumlah laporan tentang organisasi genom dari gen MHC (polimorfisme dan ekspresi) pada ikan ternyata tampak serupa dengan yang ada pada mamalia (Yamaguchi & Dijkstra, 2019). Hasil yang diperoleh pada penelitian ini menunjukkan bahwa ikan lele *strain* Mutiara, Paiton, Kenya, dan Sangkuriang merupakan kandidat populasi yang potensial dalam kegiatan seleksi ikan lele tahan penyakit berbasis marka molekuler MHC-I, sedangkan untuk seleksi ikan lele tahan penyakit berbasis marka molekuler MHC-II kandidat populasi yang potensial adalah *strain* Mutiara, Paiton, dan Kenya.

KESIMPULAN

Marka molekuler MHC-I terdapat pada ikan lele *strain* Mutiara, Paiton, Kenya, dan Sangkuriang dengan ukuran pita DNA berkisar pada 400-1.000 bp;

sedangkan marka molekuler MHC-II hanya terdapat pada ikan lele *strain* Mutiara, Paiton, dan Kenya dengan ukuran pita DNA berkisar pada 400-1500 bp. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk memastikan alel dan sekuen nukleotidnya secara total, serta untuk mendesain lagi primer spesifik dengan produk pita DNA tunggal.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Tim Kelompok Penelitian Ikan Lele Balai Riset Pemuliaan Ikan (BRPI) Sukamandi atas bantuannya selama pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR ACUAN

- Alimuddin, Putri, F.M., Wahjuningrum, D., Hardiantho, D., Sunarma, A., & Nuryati, S. (2018). Resistance against *Aeromonas hydrophila* infection and growth of (F2) second generation African catfish selected [*Clarias gariepinus*] using molecular markers. *Biotropia*, 25(2), 95-102.
- Aoyagi, K., Dijkstra, J.M., Xia, C., Denda, I., Ototake, M., Hashimoto, K., & Nakanishi, T. (2002). Classical MHC class I genes composed of highly divergent sequence line ages share a single locus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Immunol.*, 168, 260-273.
- Azis, Alimuddin, Sukenda, & Zairin, M.Jr. (2015a). Identifikasi kandidat marka MHC I pada ikan lele (*Clarias* sp.) tahan infeksi *Aeromonas hydrophila*. [Identification of MHC I marker candidate in catfish (*Clarias* sp.) resistance to *Aeromonas hydrophila* infection]. *Jurnal Riset Akuakultur*, 10(2), 261-9.
- Azis, Alimuddin, Sukenda, & Zairin, M.Jr. (2015b). MHC I molecular marker inheritance and first generation catfish (*Clarias* sp.) resistance against *Aeromonas hydrophila* infection. *Pak. J. Biotechnol.*, 12(2), 131-7.
- Berthelot, C., Brunet, F., Chalopin, D., Juanchich, A., Bernard, M., Noël, B., Bento, P., ... & Guiguen, Y. (2014). The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates. *Nat. Commun.*, 5, 3657.
- Grimholt, U., Drablos, F., Jorgensen, S.M., Hoyheim, B., & Stet, R.J. (2002). The major histocompatibility class I locus in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): Polymorphism, linkage analysis and protein modelling. *Immunogenetics*, 54, 570-58.

- Grimholt, U., Larsen, S., Nordmo, R., Midtlyng, P., Kjøglum, S., Storset, A., Saeb, S., & Stet, R.J. (2003). MHC polymorphism and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*); facing pathogens with single expressed major histocompatibility class I and class II loci. *Immunogenetics*, 55, 210-219.
- Hayuningtyas, E.P., Ariyanto, D., & Syahputra, K. (2013). Hubungan antara pertumbuhan dengan keberadaan gen tahan penyakit *Major Histocompatibility Complex* (MHC) pada ikan mas *Cyprinus carpio*. *Jurnal Riset Akuakultur*, 8(3), 383-391.
- Kaufman, J. (2018). Generalists and specialists: A new view of how MHC class I molecules fight infectious pathogens. *Trends Immunol.*, 39, 367-379.
- Kjøglum, S., Larsen, S., Bakke, H.G., & Grimholt, U. (2006). How specific MHC class I and class II combinations affect disease resistance against infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Shellfish Immunol.*, 21, 431-441.
- Li, C., Wang, R., Su, B., Luo, Y., Terhune, J., Beck, B., & Peatman, E. (2013). Evasion of mucosal defenses during *Aeromonas hydrophila* infection of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin. *Developmental and Comparative Immunology*, 39, 447-455.
- Li, W., Sun, W.X., Hu, J.F., Hong, D.W., & Chen, S.L. (2014). Molecular characterization, polymorphism and expression analysis of swamp eel MHC class II b gene, after infection by *Aeromonas hydrophila*. *J. Animal Plant Sci.*, 24(2), 481-491.
- Lien, S., Koop, B.F., Sandve, S.R., Miller, J.R., Kent, M.P., Nome, T.,... & Davidson, W.S. (2016). The Atlantic salmon genome provides insights into rediploidization. *Nature*, 533, 200-205.
- Min, D., Chen, S.L., Liu, Y.H., Niu, B.Z., Yang, J.F., & Zheng, B. (2012). MHC polymorphism and disease-resistance to *Edwardsiella ictaluri* in six turbot *Scophthalmus maximus* families. *Chinese Sci Bulletin*, 57(25), 3262-3269.
- Moulana, M., Evenhuis, J., Albertino, M., Godwin, U., Kountikov, E.I., Stuge, T.B., Wilson, M.,, & McConnell, T.J. (2008). Characterization of anti-channel catfish MHC class IIb monoclonal antibodies. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 126, 120-130.
- Osborne, M.J. & Turner, T.F. (2011). Isolation and characterization of major histocompatibility class II² genes in an endangered North American cyprinid fish, the Rio Grande silvery minnow *Hybognathus amarus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 30, 1275-1282.
- Palti, Y., Genet, C., Luo, M.C., Charlet, A., Gao, G., Hu, Y., & Rexroad, C.E. (2011). A first generation integrated map of the rainbow trout genome. 3rd. *BMC Genomics*, 12, 180.
- Pang, J., Gao, F., Lu, M., Ye, X., Zhu, H., & Ke, X. (2013). Major histocompatibility complex class IIA and IIB genes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*, genomic structure, molecular polymorphism and expression patterns. *Fish Shellfish Immunol.*, 34, 486-496.
- Phillips, R.B., Nichols, K.M., DeKoning, J.J., Morasch, M.R., Keatley, K.A., Rexroad, C.E., & Thorgaard, G.H. (2006). Assignment of rainbow trout linkage groups to specific chromosomes. *Genetics*, 174, 1661-1670.
- Picchiatti, S., Abelli, L., Guerra, L., Randelli, E., Serafini, F.P., Belardinelli, M.C., Buonocore, F.,, & Scapigliati, G. (2015). MHC II-2 chain gene expression studies define the regional organization of the thymus in the developing bony fish *Dicentrarchus labrax* L. *Fish Shellfish Immunol.*, 42, 483-493.
- Piertney, S.B. & Oliver, M.K. (2006). The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity*, 96, 7-21.
- Poonsawat, S., Areechon, N., Srisapoom, P., Maita, M., & Endo, M. (2009). Polymorphism of major histocompatibility complex class I alpha cDNA and resistance against streptococcosis of six strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus). *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 43, 348-357.
- Rakus, K.A., Wiegertjes, G.F., Jurecka, P., Walker, P.D., Pilarczyk, A., & Irnazarowa, I. (2009). Major histocompatibility (MH) class II B gene polymorphism influences disease resistance of common carp *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 288, 44-50.
- Rakus, K.A. (2008). *Major histocompatibility (MH) polymorphism of common carp. Link with disease resistance*. Disertasi. Wageningen (NL): Wageningen University.
- Shen, T., Xu, S., Yang, M., Pang, S., & Yang, G. (2011). Molecular cloning, expression pattern, and 3D structural analysis of the MHC class IIB gene in the Chinese longsnout catfish *Leiostomus xanopterus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 141, 33-45.
- Sommer, S. (2005). The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Frontiers in Zoology*, 2, 16-34.

- Srisapoome, P., Ohira, T., Hirono, I., & Aoki, T. (2004). Cloning, characterization and expression of cDNA containing major histocompatibility complex class II α and II β genes of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish. Sci.*, 70, 264-276.
- Suprpto, R., Alimuddin, Nuryati, S., Imron, Marnis, H., & Iswanto, B. (2017). MHC II marker potential linked to motile aeromonad septicaemia disease resistance in African Catfish (*Clarias gariepinus*). *Indonesian Aquaculture Journal*, 12(1), 21-28.
- Yamaguchi, T. & Djikstra, J.M. (2019). Review: Major histocompatibility complex (MHC) genes and disease resistance in fish. *Cells*, 8, 378.
- Zhou, F., Dong, Z., Fu, Y., Li, T., Zeng, Y., Ji, X., Chen, W., Zhang, J., & Wang, H. (2013). Molecular cloning, genomic structure, polymorphism and expression analysis of major histocompatibility complex class II B gene of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 372-375, 149-157.