

**PROLIFERASI SEL TNF- α , IL-1 β DAN IL-6 SEBAGAI PENANDA
KETAHANAN GEN IMUN IKAN KOI (*Cyprinus carpio*) TERHADAP
SERANGAN PARASIT *Myxobolus koi***

TESIS



Oleh :

RACHMAT NOER SOELISTYOADI

NIM. 176080100111015

**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
MINAT PENYAKIT IKAN**

**PROGRAM PASCA SARJANA
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**



**PROLIFERASI SEL TNF- α , IL-1 β DAN IL-6 SEBAGAI PENANDA
KETAHANAN GEN IMUN IKAN KOI (*Cyprinus carpio*) TERHADAP
SERANGAN PARASIT *Myxobolus koi***

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister**



Oleh :

RACHMAT NOER SOELISTYOADI

NIM. 176080100111015

**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
MINAT PENYAKIT IKAN**

**PROGRAM PASCA SARJANA
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

TESIS

**PROLIFERASI SEL TNF- α , IL-1 β dan IL-6 SEBAGAI PENANDA KETAHANAN
GEN IMUN IKAN KOI (*Cyprinus carpio*) TERHADAP SERANGAN
PARASIT *Myxobolus koi***

Oleh :
Rachmat Noer Soelistyoadi
NIM. 176080100111015

Telah dipertahankan didepan penguji
Pada tanggal 5 Desember 2019
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat



Menyetujui,
Komisi Pembimbing

Ketua

Anggota

Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si
NIP. 19730404 200212 2 001

Prof. Dr. Ir. Maftuch, M.Si
NIP. 19660825 199903 1 001

Tanggal :

Tanggal :

Mengetahui

Dekan
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan

Ketua
Program Magister



Dr. J. Happy Nursyam, MS
NIP. 19600322 198601 1 001

Prof. Dr. Ir. Maftuch, M.Si
NIP. 19660825 199903 1 001

Tanggal :

Tanggal :



JUDUL TESIS :
**PROLIFERASI SEL TNF- α , IL-1 β DAN IL-6 SEBAGAI PENANDA KETAHANAN
 GEN IMUN IKAN KOI (*Cyprinus carpio*) TERHADAP SERANGAN PARASIT
*Myxobolus koi***

Nama Mahasiswa : RACHMAT NOER SOELISTYOADI
NIM. : 176080100111015
Program Studi : Budidaya Perairan
Minat Ilmu Studi : Penyakit Ikan

KOMISI PEMBIMBING

Ketua : Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si
Anggota : Prof. Dr. Ir. Maftuch, M.Si

KOMISI PENGUJI

Dosen Penguji I : Dr. Ir. Mohamad Fadjar, M.Sc
Dosen Penguji II : Andi Kurniawan, S.Pi, M. Eng, D.Sc

Tanggal Ujian Tesis : 5 Desember 2019

SK Penguji

PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar – benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah Tesis ini bukan karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan bukan karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah Tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur – unsur jiplakan tesis, saya bersedia Tesis (Magister) ini dibatalkan, serta diproses sesuai dengan perundang – undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 25 ayat 2 dan pasal 70)

Malang, Desember 2019
Mahasiswa,



RACHMAT NOER SOELISTYOADI
NIM. 176080100111015

**RIWAYAT HIDUP**

RACHMAT NOER SOELISTYOADI. Lahir di Malang tanggal 17 Maret 1978 merupakan anak pertama dari tiga bersaudara, dari Ayah Achmad Soerono dan Ibu Siti Iswari. Menempuh pendidikan di Sekolah Dasar Katolik (SDK) Santo Yusuf 3 Malang lulus tahun 1990, SMP Negeri 5 Malang lulus tahun 1993, SMA Negeri 4 Malang lulus tahun 1996, Strata 1 dari Program Studi Manajemen Sumberdaya Perairan (MSP) Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan (MSP) di Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya Malang lulus tahun 2001. Pengalaman kerja sebagai Enumerator di Proyek Indian Ocean Tuna Monitoring Balai Riset Kelautan dan Perikanan (BRKP) 2002 – 2004. Kementerian Kelautan dan Perikanan bertugas di Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Surabaya 1 tahun 2005 – sekarang.

Malang, Desember 2019

Penulis

RACHMAT NOER SOELISTYOADI

UCAPAN TERIMAKASIH

Dengan memanjatkan puji syukur kehadirat Allah swt atas terlaksananya proses kuliah serta serangkaian kegiatan penelitian dan penyusunan Tesis yang berjudul : **Proliferasi sel TNF- α , IL-1 β dan IL-6 Sebagai Penanda Ketahanan Gen**

Molekuler Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) yang Terinfeksi Parasit *Myxobolus koi*

maka penulis menghaturkan ucapan terima kasih yang tak terhingga kepada :

1. Kedua Orang Tuaku Bapak Achmad Soerono dan Ibu Siti Iswari, Ibu mertua Dewi Naskahdiah serta istriku Dyah Setyawati yang telah memberikan doa dan dukungan baik moril maupun materiil serta doa yang tiada henti-hentinya kepada penulis.
2. Pusat Pendidikan Kelautan dan Perikanan, Badan Riset dan Sumber Daya Manusia Kelautan dan Perikanan (BRSDMKP) serta Badan Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan (BKIPM) Kementerian Kelautan dan Perikanan RI atas bantuan dana dan kesempatan untuk menempuh pendidikan Program Magister di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang
3. Kepala BKIPM Surabaya 1 Bapak Muhlin, S.Pi, M.Si atas ijin dan bimbingannya selama ini.
4. Mantan Kepala BKIPM Surabaya 1 Bapak Ir. Putu Sumardiana, MP yang telah memberikan kesempatan dan ijin kepada penulis untuk menempuh pendidikan Program Magister di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang

5. Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS selaku Dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya atas dukungan dan fasilitas yang tersedia hingga terselesaikan tesis ini.
6. Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si dan Prof. Dr. Ir. Maftuch, M.Si selaku komisi dosen pembimbing atas bimbingan, arahan, masukan dan nasehat yang baik dan tepat selama proses penelitian hingga penyusunan tesis
7. Dr. Ir. Mohammad Fadjar, M.Sc dan Andi Kurniawan, S.Pi, M.Eng, D.Sc selaku komisi dosen penguji atas bimbingan, arahan, masukan dan nasehat yang baik dan tepat untuk perbaikan selama proses penelitian dan penyusunan tesis.
8. Semua rekan-rekan di Laboratorium Penguji dan Keluarga Besar Balai KIPM Surabaya I yang telah memberikan fasilitas, dukungan serta memberi kesempatan kepada penulis dalam melakukan penelitian.
9. Tim penelitian sepejuangan Cucun Herlina dan Immaria Fransira.
10. Teman – teman Magister FPIK-UB atas semua dukungan materi, doa dan semangat, terima kasih untuk kebersamaan selama ini.
11. Kepada semua pihak yang telah membantu dalam penulisan laporan ini dan tidak bisa disebutkan satu persatu, terima kasih atas bantuan yang telah diberikan

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Laporan Tesis dengan judul **“Proliferasi sel TNF- α , IL-1 β dan IL-6 Sebagai Penanda Ketahanan Gen Molekuler Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) yang Terinfeksi Parasit *Myxobolus koi*”**

Penulis menyadari bahwa dalam laporan hasil ini masih terdapat banyak kekurangan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun untuk kebaikan hasil penelitian ini. Akhirnya, semoga dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan perikanan khususnya bagi kami pribadi dan pembaca.

Malang, Desember 2019

Penulis

RINGKASAN

Rachmat Noer Soelistyoadi. **Proliferasi Sel TNF- α , IL-1 β dan IL-6 Sebagai Penanda Ketahanan Gen Imun Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) Terhadap Serangan Parasit *Myxobolus Koi*.** Di bawah bimbingan Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si dan Prof. Dr. Ir. Maftuch, M.Si

Peningkatan permintaan perdagangan ikan peliharaan akan diikuti dengan peningkatan risiko penyebaran lintas area dari beberapa patogen. Industri perdagangan ikan hias secara tidak langsung telah memindahkan jutaan ikan setiap tahun di seluruh dunia, hal ini didukung oleh perkembangan konektivitas global dan waktu transportasi yang semakin pendek. Myxosporean adalah endoparasit jenis cnidaria memiliki distribusi yang luas di seluruh dunia dan menyebabkan kerugian ekonomi pada perikanan dan akuakultur (Mathews *et al.*, 2018). *Myxobolus koi* adalah jenis parasit myxospore yang banyak menginfeksi ikan hias tawar, penyakit ini disebut juga myxobolusis. Myxobolusis pada insang menginfeksi ikan mas pada stadia juvenile. Penyakit pada ikan biasanya sulit untuk dikendalikan ketika penyakit telah menginfeksi sering terlambat dalam penanganan untuk mencegah kerugian yang lebih besar, untuk itu mengetahui tingkat kesehatan ikan adalah hal yang sangat penting (Tonguthai, 1997 ; Robert, R.J. 2012). Parameter klinis dan indeks zootechnical sudah dirasakan tidak cukup untuk memantau kesehatan ikan ketika terjadi awal infeksi, Karena itu, di samping penanda tradisional (biokimia, histologis, morfologis dan fisiologis), penting untuk mencari parameter alternatif seperti biomarker molekuler, dalam perspektif gen pengkode protein yang terkait dengan stress adalah kandidat yang baik (Gornati *et al.*, 2005). Tujuan Penelitian ini adalah untuk mengetahui dan menganalisa TNF- α , IL-1 β dan IL-6 sebagai potensi biomarker untuk mengevaluasi tingkat kesehatan ikan, Membandingkan ekspresi TNF- α , IL-1 β dan IL-6 pada ikan koi yang terinfeksi dan yang tidak terinfeksi parasit *Myxobolus koi*.

Penelitian Tahap 1

Hasil pengamatan klinis ikan yang terinfeksi *Myxobolus koi* yaitu insang berwarna pucat, *operculum* tidak dapat menutup dengan sempurna, memiliki gerakan *operculum* yang lebih cepat dibandingkan ikan sehat, sering menuju permukaan air untuk bernafas serta terdapat nodul putih pada insang. Pada ikan yang terinfeksi terjadi hiperplasia tulang rawan lamella primer yang menyelimuti kista parasit serta adanya proses enkapsulasi yang mengelilingi kista oleh tulang rawan insang, Proses enkapsulasi merupakan salah satu bentuk pertahanan inang terhadap parasit untuk kemudian dikeluarkan dari tubuh namun beberapa parasit dapat bertahan hidup di dalam jaringan tubuh inang yang menyebabkan kematian, spora parasite *Myxobolus koi* berukuran antara 12-15 μ m.

Uji PCR pada organ insang dan usus dengan menggunakan primer *ERB1* ACCTGGTTGATCCTGCCAG (F) dan *ERB10* CTCCGCAGGTTACCTACGG (R), menunjukkan ikan yang secara klinis terinfeksi Myxobolus hasil elektroforesis menunjukkan pita (*band*) muncul di 2000 bp, namun pada ikan yang secara klinis

terindikasi sehat *band* tetap muncul meskipun tidak terlalu jelas (positif ringan). Hal ini membuktikan serangan parasit tidak selalu dimulai dengan adanya gejala klinis tertentu. Hasil elektroforesis menunjukkan pada organ insang dan usus di ikan yang positif dan negative *Myxobolus*, respon dari sitokin menunjukkan TNF α , IL-1 β dan IL-6 tereksresi pada masing-masing *band*, TNF α muncul pada 300 bp ; IL-1 β = 206 bp dan IL-6 = 256 bp. Menurut Bird *et al.*, 2005 dan Bo *et al.*, 2015) sitokin juga ditemukan pada jaringan ikan yang sehat seperti pada jaringan otot, hati, kulit, sirip, jantung, ginjal, limpa, insang, saluran pencernaan dan otak, sehingga pada ikan yang negative *Myxobolus* sitokin TNF α , IL-1 β dan IL-6 juga tereksresi dalam persentase intensitas yang lebih kecil.

Penelitian Tahap 2

Semiquantitatif PCR dianalisa dengan menggunakan software ImageJ versi 1.52A menunjukkan terdapat perbedaan intensitas (%) antara ikan koi yang terinfeksi dan yang tidak. Ikan yang terinfeksi memiliki intensitas TNF α yang lebih tinggi dibandingkan dengan ikan sehat, insang pada ikan sehat memiliki intensitas TNF- α 26,682 % dan pada ikan terinfeksi 27,004 % pada usus ikan sehat memiliki intensitas TNF- α 29,668 % dan pada usus ikan yang terinfeksi 16,646 %. IL-1 β ikan yang terinfeksi memiliki intensitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan ikan sehat, insang pada ikan sehat memiliki intensitas IL-1 β 22,629 % dan pada ikan terinfeksi 39,147 % pada usus ikan sehat memiliki intensitas IL-1 β 14,589 % dan pada usus ikan yang terinfeksi 23,635 % dan IL-6 ikan yang terinfeksi memiliki intensitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan ikan sehat, insang pada ikan sehat memiliki intensitas IL-6 22,712 % dan pada ikan terinfeksi 27,201 %, pada usus ikan sehat intensitas IL-6 tidak tereksresi dan usus ikan yang terinfeksi 50.086%. Sequencing DNA parasit *Myxobolus koi* yang menginfeksi ikan koi (*Cyprinus carpio*) di Blitar memiliki kemiripan (*percent identity*) dari data Gen Bank dengan beberapa organisme tingkat homologi dari sampel antara 95,99 – 99,37% dengan *E-value* 0.0, kemiripan tertinggi terjadi pada kode sampel KT.240127.1 yaitu pada *Myxobolus koi* yang menginfeksi ikan Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) di Barat Daya China.

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ikan yang terinfeksi memiliki intensitas sitokin TNF α , IL-1 β dan IL-6 yang lebih tinggi dibandingkan dengan ikan sehat, sehingga dapat dijadikan potensi biomarker untuk mendeteksi infeksi parasit *Myxobolus koi* pada fase yang lebih awal.

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	v
UCAPAN TERIMAKASIH	vi
KATA PENGANTAR	viii
RINGKASAN	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
GLOSARIUM	xvii
1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.4. Manfaat Penelitian	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Ikan Koi (<i>Cyprinus carpio</i>)	6
2.1.1. Klasifikasi	6
2.1.2. Morfologi	6
2.1.3. Sejarah	7
2.1.4. Habitat dan Biologi	8
2.2. Parasit	8
2.2.1. <i>Myxobolus koi</i>	10
2.2.2. Infeksi pada Ikan	13
2.3. Respon Molekuler	13
2.3.1. Respon Imun Non Spesifik	16
2.3.2. Respon Imun Spesifik	17
2.3.3. Respon Imun pada Parasit	18
2.4. Sitokin	19
2.4.1. Tumor Necrosis Factor (TNF α)	22
2.4.2. Interleukin-1 β (IL-1 β)	24
2.4.3. Interleukin-6 (IL-6)	26
2.5. Metode PCR	28
2.6. Biomarker	29
2.7. Penelitian Terdahulu	30
3. KERANGKA KONSEP PENELITIAN	31
3.1. Landasan Teori	31
3.2. Hipotesis	32
3.3. Kerangka Konsep Penelitian	33
3.4. Kerangka Operasional Penelitian	34



3.5.	Kebaharuan Penelitian	35
3.6.	Strategi Publikasi	35
4.	METODE PENELITIAN	36
4.1.	Tempat Penelitian	36
4.2.	Alat dan Bahan	36
4.2.1.	Alat	36
4.2.2.	Bahan	36
4.3.	Metode Penelitian	37
4.4.	Prosedur Penelitian	38
4.4.1.	Pengambilan Sampel	38
4.4.2.	Histopatologi	38
4.4.2.1.	Pembuatan Blok Jaringan	39
4.4.2.2.	Pewarnaan Jaringan	40
4.4.3.	SEM (<i>Scanning Electron Microscopy</i>)	40
4.4.4.	Metode PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	41
4.4.4.1.	Ekstraksi	41
4.4.4.2.	Amplifikasi	42
4.4.4.3.	Elektroforesis	44
4.5.	Analisa Data	44
5.	HASIL dan PEMBAHASAN	46
5.1.	Gejala Klinis	46
5.2.	Histopatologi	47
5.3.	SEM (<i>Scanning Electron Microscopy</i>)	51
5.4.	Hasil Uji PCR <i>Myxobolus koi</i>	52
5.5.	Analisa Nukleotida Parasit <i>Myxobolus koi</i>	56
5.6.	Respon Molekuler	60
5.6.1.	TNF- α	61
5.6.2.	IL-1 β	63
5.6.3.	IL-6	64
5.7.	Analisa Nukleotida Sitokin	65
5.7.1.	TNF- α	65
5.7.2.	IL-1 β	69
5.7.3.	IL-6	74
6.	KESIMPULAN dan SARAN	79
6.1.	Kesimpulan	79
6.2.	Saran	80
	DAFTAR PUSTAKA	81
	LAMPIRAN	93

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Gambar 1. Ikan Koi (<i>Cyprinus carpio</i>).....	6
2. Gambar 2. Daur hidup <i>Myxobolus cerebralis</i> pada ikan salmon	10
3. Gambar 3. Ikan Koi yang terinfeksi <i>Myxobolus koi</i>	12
4. Gambar 4. Spora <i>Myxobolus koi</i>	12
5. Gambar 5. Mekanisme Respon Imun pada Ikan.....	15
6. Gambar 6. Sitokin, Chemokin dan Reseptornya.....	20
7. Gambar 7. Signal melalui Reseptor TNF 1 dan 2	23
8. Gambar 8. Interaksi IL-1 pada Keluarga Sitokin dan Reseptor	26
9. Gambar 9. Pathway signal IL-6	27
10. Gambar 10. Kerangka Konsep Penelitian.....	33
11. Gambar 11. Kerangka Operasional Penelitian.....	34
12. Gambar 12. Gejala klinis ikan koi (<i>Cyprinus carpio</i>) yang terinfeksi parasit <i>Myxobolus koi</i>	47
13. Gambar 13. Perubahan histopatologi yang diakibatkan <i>Myxobolus koi</i> pada insang	49
14. Gambar 14. Bagian lamella insang (P) lamella primer dan lamella sekunder ditunjukkan dengan tanda panah (x50) (Robert,R.J. 2012).....	50
15. Gambar 15. Histologi usus ikan koi	51
16. Gambar 16. Spora <i>Myxobolus koi</i> yang menginfeksi insang koi diamati dengan <i>Scanning Electron Microscopy</i>	52
17. Gambar 17. Hasil elektroforesis, target band parasit <i>Myxobolus</i> muncul pada 2000 bp.....	53
18. Gambar 18. Hasil Elektroforesis pada organ insang.....	54
19. Gambar 19. Hasil elektroforesis pada usus	55
20. Gambar 20. Hasil semiquantitatif PCR organ insang dan usus pada ikan koi (<i>Cyprinus carpio</i>).....	56
21. Gambar 21. Pohon filogenetik sampel <i>Myxobolus koi</i> dibandingkan dengan isolate yang lain	59
22. Gambar 22. Hasil elektroforesis sitokin TNF α , IL-1 β dan IL-6 pada organ insang dan usus ikan koi (<i>Cyprinus carpio</i>)	61
23. Gambar 23. Perbandingan intensitas (%) semiquantitatif PCR sitokin TNF α pada organ insang dan usus ikan koi	62
24. Gambar 24. Perbandingan intensitas (%) semiquantitatif PCR sitokin IL-1 β pada organ insang dan usus ikan koi.....	63
25. Gambar 25. Perbandingan intensitas (%) semiquantitatif PCR sitokin IL-6 pada organ insang dan usus ikan koi	65
26. Gambar 26. Hasil Blast dan Alligment TNf- α insang ikan koi dengan data Gen Bank.....	67
27. Gambar 27. Hasil Blast dan Alligment TNf- α usus ikan koi dengan data Gen Bank.....	67
28. Gambar 28. Mekanisme ekspresi TNF α	69
29. Gambar 29. Hasil Blast dan Alligment IL-1 β insang ikan koi dengan data Gen Bank.....	71

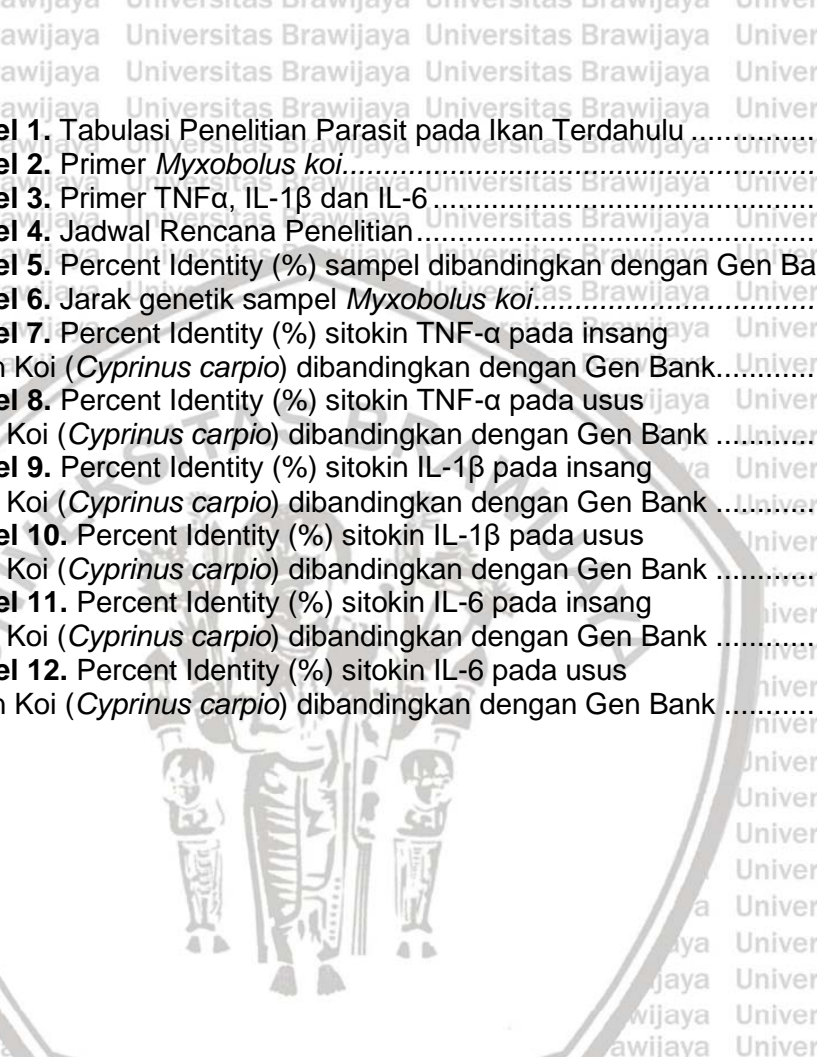
30. Gambar 30. Hasil Blast dan Alligment IL-1 β usus ikan koi dengan data Gen Bank.....	72
31. Gambar 31. Mekanisme ekspresi IL-1 β	74
32. Gambar 32. Hasil Blast dan Alligment IL-6 insang ikan koi dengan data Gen Bank.....	76
33. Gambar 33. Hasil Blast dan Alligment IL-6 usus ikan koi dengan data Gen Bank.....	77
34. Gambar 34. Mekanisme ekspresi IL-6.....	78



DAFTAR TABEL

Tabel Halaman

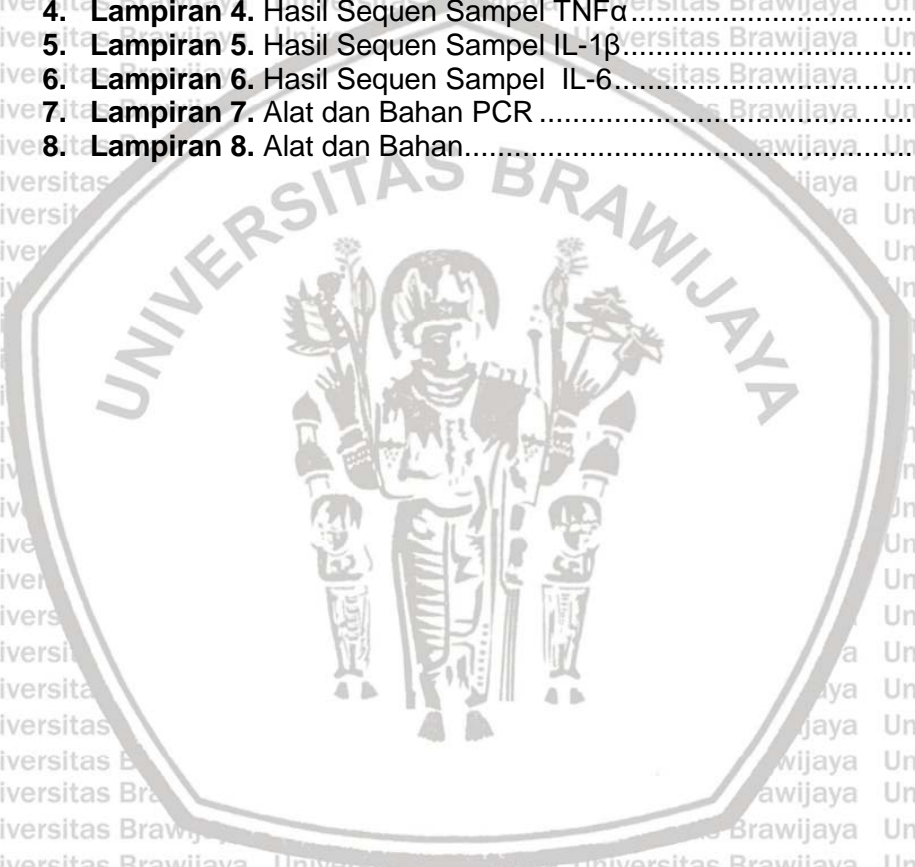
1. **Tabel 1.** Tabulasi Penelitian Parasit pada Ikan Terdahulu 30
2. **Tabel 2.** Primer *Myxobolus koi*..... 42
3. **Tabel 3.** Primer TNF α , IL-1 β dan IL-6 42
4. **Tabel 4.** Jadwal Rencana Penelitian..... 45
5. **Tabel 5.** Percent Identity (%) sampel dibandingkan dengan Gen Bank... 58
6. **Tabel 6.** Jarak genetik sampel *Myxobolus koi*..... 60
7. **Tabel 7.** Percent Identity (%) sitokin TNF- α pada insang Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) dibandingkan dengan Gen Bank..... 66
8. **Tabel 8.** Percent Identity (%) sitokin TNF- α pada usus Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) dibandingkan dengan Gen Bank 66
9. **Tabel 9.** Percent Identity (%) sitokin IL-1 β pada insang Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) dibandingkan dengan Gen Bank 70
10. **Tabel 10.** Percent Identity (%) sitokin IL-1 β pada usus Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) dibandingkan dengan Gen Bank 70
11. **Tabel 11.** Percent Identity (%) sitokin IL-6 pada insang Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) dibandingkan dengan Gen Bank 75
12. **Tabel 12.** Percent Identity (%) sitokin IL-6 pada usus Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) dibandingkan dengan Gen Bank 75



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran Halaman

1. Lampiran 1. Peta Lokasi Pengambilan Sampel..... 93
2. Lampiran 2. Hasil BLAST sequen *Myxobolus koi* dengan data GEN Bank 94
3. Lampiran 3. Hasil Sequen Sampel *Myxobolus koi* 100
4. Lampiran 4. Hasil Sequen Sampel TNF α 103
5. Lampiran 5. Hasil Sequen Sampel IL-1 β 104
6. Lampiran 6. Hasil Sequen Sampel IL-6 105
7. Lampiran 7. Alat dan Bahan PCR 106
8. Lampiran 8. Alat dan Bahan 109



Glosarium

PCR	Polymerase chain reaction, merupakan tehnik amplifikasi DNA selektif in vitro yang meniru fenomena replikasi DNA in vivo
Sel B	sel limfosit yang berperan pada kekebalan humoral inang
MHC	molekul <i>major histocompatibility complex</i> (komplek histokompatibiliti utama), sekumpulan gen yang ditemukan pada semua jenis vertebrate yang berperan dalam pengikatan dan mempresentasikan peptida antigen, terdiri dari MHC kelas I dan MHC kelas II
Cytokin	Senyawa protein dengan berat molekul kira-kira 8-80 kDa yang merupakan mediator larut fase efektor imun natural dan adaptif
TNF α	<i>Tumor necrosis factor</i> , merupakan salah satu sitokin, yang terlibat dalam patogenesis (proinflamasi) dan komunikasi antara sel
IL1 β	sitokin pro-inflamatory dan diekspresikan oleh banyak sel termasuk makrofag, sel NK, monosit, dan neutrofil
DNA	<i>Deoxyribonucleat acid</i> , merupakan polimer yang menyimpan dan menyandi informasi genetika organisme, dan disusun oleh nukleotida arginin (A), timin (T), sitosin (C), dan guanine (G)
mRNA	<i>messenger RNA</i> , merupakan RNA yang merupakan hasil transkripsi DNA dan menjadi perantara pembawa urutan protein dalam proses translasi
Proliferasi	Pertumbuhan dan penambahan sel yang sangat cepat dalam kondisi yang abnormal
Interferon	Merupakan sitokin yang tersusun atas glikoprotein yang disekresi sel vertebrate akibat stimulus antigen/patogen
PRRs :	<i>Pattern recognition receptors</i> , merupakan kumpulan molekul inang yang berperan dalam pengenalan pathogen
Imunitas adaptif	Secara sistematis diperantarai oleh limfosit dan dirangsang oleh adanya agen infeksius. Imunitas ini ditandai dengan spesifitas tinggi dan memiliki memori yaitu kemampuan dalam merespon agen infeksi yang sama secara berulang, lebih cepat dan kuat.
Imunitas alami	Bentuk pertahanan dari agen infeksi dan bergantung pada mekanisme yang ada yang sebelum terjadi infeksi, respon cepat serta bereaksi dengan cara yang sama pada semua agen infeksi
Imunitas humoral	Jenis respon imun adaptif dan diperantarai oleh antibodi yang diproduksi oleh sel B
Imunitas seluler	Jenis imun adaptif yang diperantarai oleh limfosit T dan berperan dalam mekanisme pertahanan terhadap agen infeksi seperti aktivasi fagosit diperantarai oleh sel CD4 ⁺
Inflamasi	Suatu reaksi kompleks jaringan terovaskularisasi terhadap infeksi yang melibatkan akumulasi ekstrasvaskuler protein plasma dan leukosit. Peran inflamasi sebagai pelindung dalam mengendalikan infeksi dan meningkatkan perbaikan jaringan tetapi dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan penyakit.

Kemokin	Keluarga sitokin dengan berat molekul rendah yang mempunyai struktur homolog untuk merangsang kemotaksis leukosit, migrasi leukosit dari darah menuju jaringan sehingga mengaktifkan integrin leukosit dan melindungi berbagai jenis limfosit dan APC pada organ limfoid.
Komplemen	Protein serum dan permukaan sel yang berinteraksi satu sama lain serta dengan molekul sistem imun menghasilkan efektor respon imun alami dan adaptif. Hal ini diaktifkan oleh kompleks antigen-antibodi, permukaan mikroba, dan lektin plasma yang mengikat mikroba, terdiri dari kaskade enzim proteolitik menghasilkan mediator inflamasi dan opsonin sehingga mengarah untuk lisis sel dalam membran sel.
Limfosit B	Sel yang mampu menghasilkan molekul antibodi sebagai mediator respon imun humoral. Sel ini berkembang dalam sumsum tulang belakang, sel B matur dalam folikel limfoid dan jaringan limfoid sekunder, dan sedikit dalam darah.
Limfosit T	Komponen utama dalam respon imunseluler pada sistem imun adaptif yang mengekspresikan reseptor antigen mengenali fragmen peptide protein asing yang terikat pada olekul MHC.
<i>Pathogen-associated Molecularr Pattern (PAMPs)</i>	Molekul asing yang dianggap sebagai toksin dan faktor virulen dari mikroba patogen yang dikenali inang sebagai antigen sehingga digunakan sebagai sinyal untuk diproses oleh sel-sel imun.
<i>Respiratory burst</i>	Proses yang ditandai oleh produksi oksigen reaktif seperti anion peroksida, radikal hidroksil dan hidrogen peroksida di makrofag dan leukosit, serta diperantarai oleh enzim fagosit oksidase yang dipicu oleh mediator inflamasi seperti sitokin atau produk bakteri.
Sel <i>Antigen Presenting Cell (APC)</i>	Sel yang menyediakan peptide antigen protein terikat oleh molekul MHC pada permukaannya dan mengaktifkan sel T spesifik-antigen serta mengekspresikan kostimulator untuk mengoptimalkan pengaktifan limfosit T.
Sel dendritik	Sel yang dihasilkan sumsum tulang, terdapat pada jaringan epitel dan limfoid, secara morfologis ditandai dengan penonjolan membran tipis dan berperan sebagai APC untuk memulai respon terhadap antigen.
Sel <i>Natural Killer (NK)</i>	Subset sel-sel limfoid yang berfungsi untuk membunuh sel yang terinfeksi mikroba melalui mekanisme litik langsung dan sekresi IFN- γ dalam respon alami
Sel T helper (Th)	Kelas limfosit T yang berfungsi mengaktifkan makrofag, meningkatkan peradangan pada respon imun seluler dan meningkatkan produksi antibodi sel B dalam respon imun humoral.
Index Zootechnical	Indeks untuk mengidentifikasi organisme
Elektroforesis	Tehnik pemisahan molekul sel berdasarkan massa dan bentuk molekulnya dengan menggunakan medan listrik yang dialirkan pada suatu medium yang mengandung sampel yang akan dipisahkan
Annealing	Tahap penempelan primer pada bagian DNA <i>template</i>

Primer	Sepasang DNA untai tunggal atau oligonukleotida rantai pendek yang menginisiasi gen DNA target
Sequencing	Tehnik penentuan urutan basa nukleotida pada molekul DNA
Melting Temperature (Tm)	Suhu dimana 50% untai ganda DNA terpisah



1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Secara global industri akuakultur pada sektor ikan hias tumbuh berkembang dengan pesat dalam beberapa dekade terakhir. nilai perdagangan global ikan hias diperkirakan lebih dari 15 juta dolar dengan pertumbuhan tahunan 8 %. Salah satunya adalah ikan koi yang merupakan strain hias dari ikan mas (*Cyprinus carpio*) (Safari dan Sarkheil, 2018).

Dengan meningkatnya permintaan perdagangan ikan peliharaan, menyebabkan peningkatan risiko penyebaran lintas area dari beberapa patogen. Industri perdagangan ikan hias secara tidak langsung telah memindahkan jutaan ikan setiap tahun di seluruh dunia, hal ini didukung oleh perkembangan konektivitas global dan waktu transportasi yang semakin pendek, dalam beberapa kasus mengakibatkan parasit myxosporean berpindah ke wilayah baru yang menyebabkan perubahan patologis dan kematian pada ikan. Myxosporean adalah endoparasit jenis cnidaria memiliki distribusi yang luas di seluruh dunia dan menyebabkan kerugian ekonomi pada perikanan dan akuakultur, kematian akibat *Myxobolus koi* juga dilaporkan pada ikan koi yang dilalulintaskan dari asia menuju Inggris dan Amerika Serikat (Mathews *et al.*, 2018).

Myxobolus koi adalah jenis parasit myxospore yang banyak menginfeksi ikan hias tawar, penyakit ini disebut juga myxobolusis. Myxobolusis pada insang menginfeksi ikan mas pada stadia juvenile pada budidaya ikan mas di jepang dan menimbulkan kerugian yang besar (Yokohama *et al.*, 1997). Penyakit ini menjadi masalah serius pada ikan mas, koki dan beberapa ikan hias lainnya, menyebabkan kematian hingga 60-90% dengan prevalensi mencapai 100%.

Serangan myxobolus di Indonesia telah terjadi pada tahun 1974 dan 1978 yang menyebabkan kematian hingga 100% ikan koi terutama pada fase juvenile. Ikan

yang diserang oleh penyakit myxobolusis menunjukkan kesulitan bernafas karena menemukan adanya nodul atau kista atau nodul pada filamen insang. Di Blitar dilaporkan oleh petani bahwa pada tahun 2010 telah terjadi wabah myxobolusis pada koi berukuran 3-5 cm dengan tingkat kematian mencapai hingga 90%. Sedangkan pada tahun 2002 kematian masal ikan mas telah terjadi di Kulon Progo dan Sleman, disebabkan oleh parasit *Myxobolus sp.* dan *Henneguya* sehingga kerugian yang dialami para pembudidaya ikan cukup besar. *Myxobolus sp.* juga ditemukan di Ngrajek, Kabupaten Magelang pada tahun 2006 dengan prevalensi mencapai hingga 91%. Diikuti kolam ikan emas koi di Blitar dengan prevalensi mencapai hingga 86% pada tahun 2010 (Gunanti, 2017).

Pada tahun 2013 *Myxobolus koi* masuk ke dalam daftar penyakit hama penyakit karantina (HIPK) kelas I dari jenis parasit yang tertuang pada Keputusan Menteri Kelautan Dan Perikanan Nomor 26/Kepmen-Kp/2013 Tentang Penetapan Jenis-Jenis Hama Dan Penyakit Ikan Karantina, Golongan, Media Pembawa, Dan Sebarannya, yang berarti apabila ditemukan parasit pada ini di media pembawa wajib untuk dilakukan tindak pemusnahan (Anonymous, 2013). Laporan mengenai infeksi *Myxobolus koi* juga telah dilaporkan di beberapa wilayah Asia antara lain menginfeksi ikan mas di Vietnam Utara, ikan mas dan tawes (*Puntious gonionotus*) dari Jawa, Indonesia. Infeksi pada fase juvenile menyebabkan ikan kurus dan mati, infeksi pada tingkat yang berat menyebabkan oklusi cabang sirkulasi, nekrosis, dan disfungsi pernapasan.

Infeksi Epizootic dari *Myxobolus pyriformis* berulang kali ditemukan pada ikan gurame di Jawa, Indonesia, sejak tahun 1951, dari Malaysia juga menyebutkan infeksi *Myxobolus sp.* pada "Japanese Koi" dan ikan mas. Infeksi Myxosoma (syn. Of *Myxobolus*) pada benih ikan mas dari Taiwan dilaporkan menyebabkan

pembengkakan seperti tumor di otot-otot trunkus dengan tingkat kematian 50% (Papperna, 1991).

Penyakit pada ikan biasanya sulit untuk dikendalikan dan disembuhkan, ketika penyakit telah menginfeksi sering terlambat dalam penanganan untuk mencegah kerugian yang lebih besar, untuk itu mengetahui tingkat kesehatan ikan adalah hal yang sangat penting (Tonguthai, 1997 ; Robert, R.J. 2012).

Parameter klinis dan indeks zootechnical sudah dirasakan tidak cukup untuk memantau kesehatan ikan ketika terjadi awal infeksi, Karena itu, di samping penanda tradisional (biokimia, histologis, morfologis dan fisiologis), penting untuk mencari parameter alternatif seperti biomarker molekuler. strategi genom sedang melakukan revolusi penelitian ilmiah dalam pemahaman fisiologi ikan dan evolusi gen, hal ini juga karena relatif mudah untuk mengisolasi gen novel dan homolog menggunakan publik database. Pencarian untuk penanda molekuler dapat didekati dengan mencari mereka di antara gen-gen yang ekspresinya cukup bisa dimodifikasi kondisi yang berbeda. dalam perspektif gen pengkode protein yang terkait dengan stress adalah kandidat yang baik (Gornati *et al.*, 2005).

Aktivitas sitokin sudah diketahui dan dipelajari pada mamalia sejak tahun 1957, di mana interferon-alfa (IFN- α) adalah yang pertama diteliti. Namun, pada awal 1980-an kloning molekuler dari sitokin pertama (IFN α , IL-1, IL-2 dan TNF α) telah ditemukan. Studi mengenai regulasi imunitas ikan, dimulai pada awal 1990-an karena pentingnya ikan dalam industri budidaya dan kebutuhan untuk memahami imunitas dan masalah penyakit. Sitokin pertama yang dikloning pada ikan adalah TGF- β diikuti oleh IL-1 β dan beberapa tahun kemudian oleh TNF- α (Jacobson *et al.*, 2017).

Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) adalah sitokin proinflamasi utama yang memainkan peran kunci dalam proses inflamasi yang menghadapi invasi

patogen dan pertahanan antimikroba, dimediasi melalui limfosit, aktivasi leukosit, proliferasi sel, diferensiasi dan apoptosis. TNF- α diproduksi oleh monosit, makrofag, leukosit polimorfonuklear, sel mast, dan sel otot polos selama peradangan akut pada ikan. TNF- α dipelajari dengan baik dan dikloning dari berbagai spesies. Selain itu, TNF α telah dijadikan sebagai indikator kesehatan yang sangat baik dan biomarker keberhasilan vaksin di teleosts (Nguyen *et al.*, 2017).

1.2. Rumusan Masalah

Infeksi parasit *Myxobolus sp.* dapat merusak jaringan insang ikan, otot, usus, ginjal, dan hati (Camus dan Griffin, 2010). Seringkali infeksi parasit tidak terlihat secara visual jika tidak ada tanda-tanda khusus pada ikan, pemeriksaan dapat dilakukan dengan membuat preparat rentang (*smear*) atau dengan melakukan pemeriksaan yang didasarkan pada gejala-gejala fisik yang meliputi perubahan tingkah laku, lesi-lesi tubuh, perubahan morfologis dan anatomi ikan (Sarjito *et al.*, 2013). Saat ini parameter klinis dan indeks zootechnical sudah dirasakan tidak cukup untuk memantau kesehatan ikan ketika terjadi infeksi kronis, di samping penanda tradisional penting untuk mencari parameter alternatif seperti biomarker molekuler (Gornati *et al.*, 2005). Oleh karena itu, rumusan masalah dari penelitian adalah : Seberapa besar pengaruh parasit *Myxobolus koi* pada ekspresi TNF- α , IL-1 β dan IL-6 pada organ ikan koi (*Cyprinus carpio*) yang terinfeksi dan yang tidak terinfeksi.

1.3. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui dan menganalisa TNF- α , IL-1 β dan IL-6 sebagai potensi biomarker untuk mengevaluasi tingkat kesehatan ikan.
2. Membandingkan ekspresi TNF- α , IL-1 β dan IL-6 pada ikan koi yang terinfeksi dan yang tidak terinfeksi parasit *Myxobolus koi*.

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah memberikan informasi tentang potensi ekspresi sitokin TNF- α , IL-1 β dan IL-6 sebagai biomarker untuk mendeteksi parasit *Myxobolus koi* yang menginfeksi Ikan koi (*Cyprinus carpio*). Penelitian ini diharapkan mampu memberikan kontribusi bagi perkembangan ilmu pengetahuan mengenai penyakit ikan.



2. TINJUAN PUSTAKA

2.1. Ikan Koi (*Cyprinus carpio*)

2.1.1. Klasifikasi

Menurut Saanin (1984), klasifikasi ikan koi adalah sebagai berikut :

Filum	:	Chordata
Kelas	:	Osteichthyes
Sub Kelas	:	Actinopterygii
Super Ordo	:	Teleostei
Ordo	:	Cypriniformes
Famili	:	Cyprinidae
Genus	:	Cyprinus
Spesies	:	<i>Cyprinus carpio</i>



Gambar 1. Ikan Koi (*Cyprinus carpio*). (Mao et al., 2019)

2.1.2. Morfologi

Bentuk tubuh ikan koi memanjang dan agak pipih. Memiliki bibir tebal dengan dua pasang duri (*barbel*) pada sudut mulut, dengan ukuran *barbel* yang lebih pendek terdapat pada bibir atas. Dasar sirip punggung memiliki dengan 17-22 sirip panjang bercabang dan tulang belakang bergigi yang kuat di bagian

depan, garis sirip dorsal luar cekung ke depan. Sirip anal dengan 6-7 sirip lembut, tepi belakang duri punggung dan anal ketiga dengan duri dengan bentuk spatula tajam. Garis lateral dengan 32 hingga 38 sisik. Memiliki gigi *pharyngeal* 5 : 5, dengan bentuk gigi seperti mahkota pipih. Warna bervariasi, ikan mas liar berwarna hijau kecoklatan di bagian belakang dan sisi atas, dan warna kuning keemasan di bagian perut. Sirip di bagian perut berwarna kehitaman dengan semburat kemerahan. Ikan mas yang berwarna emas biasanya dibiakkan untuk tujuan hias (FAO, 2004). Lingkungan (warna air, tanah, dll.) juga dapat mengubah warna ikan. Terdapat warna albino dan galur berwarna yang disebut juga ikan koi. Ukuran ikan maksimal bisa mencapai 1 meter dan berat hingga 37,3 kg, masa hidup terlama yang tercatat adalah 47 tahun (Dowal, 1996).

2.1.3. Sejarah

Ikan Karper pada awalnya adalah makanan mewah di zaman Romawi dan dikonsumsi pada Abad Pertengahan. Ikan-ikan itu disimpan di kolam penyimpanan (*piscinae*) oleh orang Romawi dan kemudian kolam ikan dibangun oleh biara-biara Kristen. Dalam prakteknya di Eropa, ikan mas disimpan dalam monokultur dimana individu terbesar dipilih sebagai induk ikan. Dari abad 12 hingga pertengahan 14 seleksi buatan tidak disengaja telah dilakukan dan merupakan langkah pertama menuju domestikasi. Pemuliaan tambak yang terkontrol semi alami dan pemeliharaan benih dimulai pada abad ke-19 di Eropa, di China Cyprinids telah dibesarkan selama lebih dari 2.000 tahun, di mana mereka disimpan di kolam yang tidak bisa dilalui. Kolam secara teratur dimasukkan benih dari sungai, teknologi pemeliharaan polikultur berbasis makanan alami mulai diterapkan sehingga secara tidak langsung ras ikan semi-domestikasi telah berkembang dalam sistem ini (FAO, 2004).

Bentuk hias dari ikan karper di Jepang disebut Koi simbol dari keberanian dan energy, sebaran distribusi ikan emas ada di semua benua kecuali Antartika

ikan ini dapat dianggap sebagai ikan air tawar paling banyak didistribusikan di seluruh dunia, karena pertumbuhannya yang berpotensi cepat di perairan eutrofik dan kemampuan untuk mentoleransi kondisi lingkungan yang buruk. Namun ikan ini juga dianggap sebagai hama di Amerika Utara, Australia dan Selandia Baru karena pada tahap juvenil ikan ini adalah pemakan zooplankton dan pemakan bentik pada fase yang lebih dewasa, sehingga *Cyprinus carpio* dianggap berkontribusi terhadap *blooming* alga di perairan umum (Dowal, 1996).

2.1.4. Habitat dan biologi

Pertumbuhan ikan mas terbaik diperoleh saat kisaran temperatur air antara 23 sampai 30°C. Ikan dapat bertahan hidup di musim dingin, salinitas yang dapat ditoleransi hingga sekitar 5 ‰. Kisaran pH optimal adalah 6,5-9,0. Spesies dapat bertahan hidup konsentrasi oksigen rendah (0,3-0,5 mg/liter). Ikan mas bersifat omnivora, dengan kecenderungan tinggi terhadap konsumsi makanan hewani, seperti serangga air, larva serangga, cacing, moluska, dan zooplankton. Konsumsi zooplankton dominan pada kolam ikan dengan kepadatan penebaran yang tinggi. Selain itu, ikan mas juga mengkonsumsi batang, daun dan biji tumbuhan akuatik dan terestrial, tumbuhan air yang membusuk, dll. Pertumbuhan harian ikan mas bisa 2 hingga 4 persen berat badan, dan dapat mencapai 0,6 hingga 1,0 kg berat badan dalam satu musim di kolam ikan polikultur di daerah subtropis dan tropis. Pertumbuhan jauh lebih lambat di zona beriklim sedang ikan dapat mencapai berat 1 hingga 2 kg berat badan setelah 2 sampai 4 musim pembesaran. Periode kematangan strain ikan mas Asia sedikit lebih pendek dibandingkan di eropa. Pemijahan ikan mas Eropa dimulai ketika suhu air 17-18°C. sedangkan strain Asia mulai bertelur ketika awal musim hujan (FAO, 2004).

2.2. Parasit

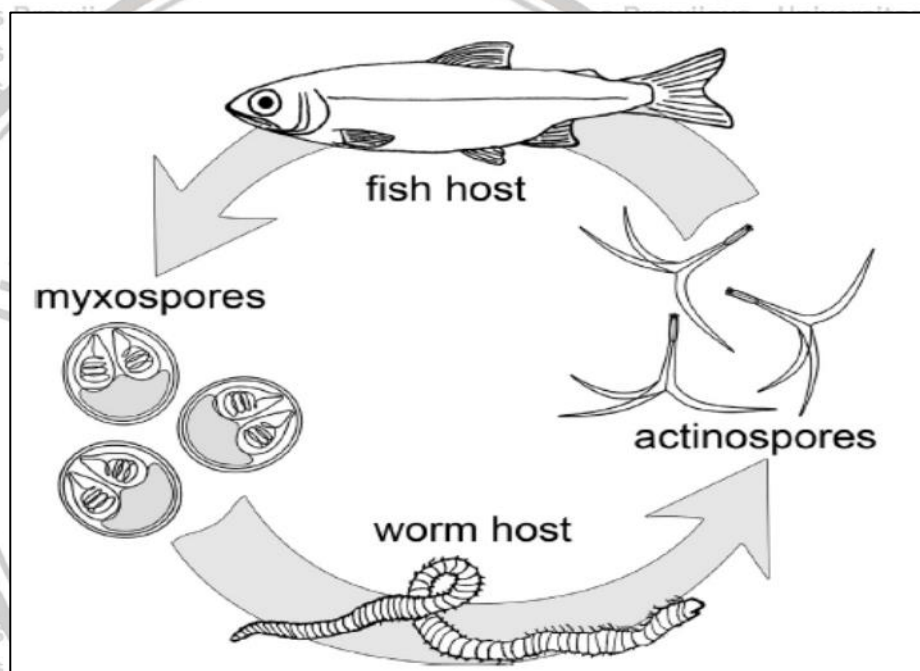
Sebagai negara tropis Indonesia memiliki iklim yang sangat mendukung perkembangan parasit dan jamur. Ditambah dengan tingginya mobilitas ikan dari sentral produksi yang satu ke sentral produksi lainnya akan mempercepat arus penyebaran penyakit dan parasit pada ikan. Hal ini menjadi suatu tantangan dan tugas besar dibidang kesehatan ikan untuk mencegah, mendeteksi dan menangkal keluar masuknya penyakit parasit di lingkungan budidaya. Parasit

dibagi menjadi 2 jenis yaitu yang diketemukan pada luar tubuh ikan disebut ektoparasit, sedangkan di dalam tubuh ikan disebut endoparasit (Sarjito *et al.*, 2013).

Parasit seringkali tidak terlihat secara visual jika tidak ada tanda-tanda khusus pada ikan, dapat dilakukan pemeriksaan dengan membuat preparat rentang (*smear*). Diagnosa merupakan pemeriksaan yang didasarkan pada gejala-gejala fisik meliputi perubahan tingkah laku, lesi-lesi tubuh, perubahan morfologis dan anatomi ikan. Diagnosis dapat dilakukan melalui dua metode yaitu diagnosa awal yang merupakan pendugaan (*presumptive diagnose*) dan diagnosa definitif. Diagnosa awal dilakukan berdasarkan gejala klinis yang ada pada tubuh ikan. Adapun diagnose definitif dilakukan untuk mendapatkan kepastian mengenai penyebab suatu penyakit antara lain dengan uji PCR, imunokimia dan imunohistokimia, hingga saat ini metode yang cepat dan sensitif adalah uji PCR. Diagnosis definitif cenderung dilakukan untuk mendapatkan kepastian tentang jenis penyakit bakterial ataupun virus yang menyerang ikan.

Secara umum pengamatan dimulai dengan melihat gejala klinis perubahan tingkah laku ikan/udang seperti lesu, lemah, tidak mau/menolak makanan, berenang dengan tubuh miring, mulut ikan selalu terbuka, bernafas dengan cepat atau tampak buta sehingga menabrak dinding kolam atau menggosok-gosokkan tubuhnya pada dinding kolam (Sarjito *et al.*, 2013).

Myxozoans adalah jenis parasit yang paling banyak hidup di alam. Siklus hidupnya melibatkan dua inang yaitu invertebrate (contohnya annelida) dan vertebrata, (contohnya ikan). (**Gambar 2**). Filum Myxozoa adalah takson endoparasit yang bersifat mikroskopis. Kebanyakan myxozoans tidak bersifat patogen untuk inang (ikan) mereka, namun beberapa menyebabkan penyakit yang parah dan jenis lainnya menyebabkan kerugian ekonomi dalam budidaya karena menghambat pertumbuhan ikan, fekunditas, dan menurunkan kualitas daging (Gomez *et al.*, 2014).



Gambar 2. Daur hidup *Myxobolus cerebralis* pada ikan salmon (Gomez *et al.*, 2014).

2.2.1. *Myxobolus koi*

Menurut Chang *et al.*, (2015) Myxozoans termasuk di dalam filum Cnidaria berdasarkan atas kesamaan dalam beberapa protein *encoding* gen yang membentuk nematocysts. Parasit ini bersifat mikroskopis dan multiseluler, myxospore membentuk parasit metazoan dengan menginfeksi ikan. Mereka mengembangkan plasmodia / pseudokista yang bersifat histozoic atau coelozoic.

Myxozoans dapat memberikan pengetahuan dasar mengenai evolusi metazoans pada divergen awal, di mana organisme sederhana diploblastik dapat berevolusi menjadi endoparasit. Myxozoans menyebabkan munculnya penyakit yang sering dikaitkan dengan perubahan lingkungan yang berdampak negatif bagi budidaya perikanan.

Genus *Myxobolus* (*Myxobolidae*) mempunyai keragaman spesies yang besar di seluruh dunia. Secara global dari total 800 spesies *Myxobolus*, sekitar 131 spesies telah dicatat India dan terutama ditandai oleh morfologi dan morfometrik data dari myxospores. Taksonomi dari genus *Myxobolus* sulit dilakukan karena myxospora memiliki begitu banyak spesies yang mirip satu dengan yang lain. Upaya yang telah dilakukan untuk mengatasi masalah ini dengan memberikan deskripsi spesies bersama dengan urutan data 18S rDNA. Beberapa jenis Myxozoans menyebabkan penyakit yang menimbulkan dampak negative secara ekonomi pada bidang perikanan dan akuakultur, seperti myxoboliosis otot, penyakit berputar (*whirling disease*), myxoboliosis insang, penyakit tidur serta kista di insang dan hepatopankreas (Bobadilla S.A., 2009 ; Fiala *et al.*, 2015 ; Gupta dan Kaur, 2017).

Terdapat 29 spesies *Myxobolus* yang dikenal sebagai parasit bagi ikan koi (*Cyprinus carpio*) dan 17 jenis diantaranya menginfeksi insang. Dari sebagian besar dari laporan, spesies *Myxobolus* yang menginfeksi ikan mas umumnya berasal dari Eropa dan Asia, namun jenis *Myxobolus koi* dan *Myxobolus toyamai* juga telah dilaporkan ditemukan di Amerika Serikat.

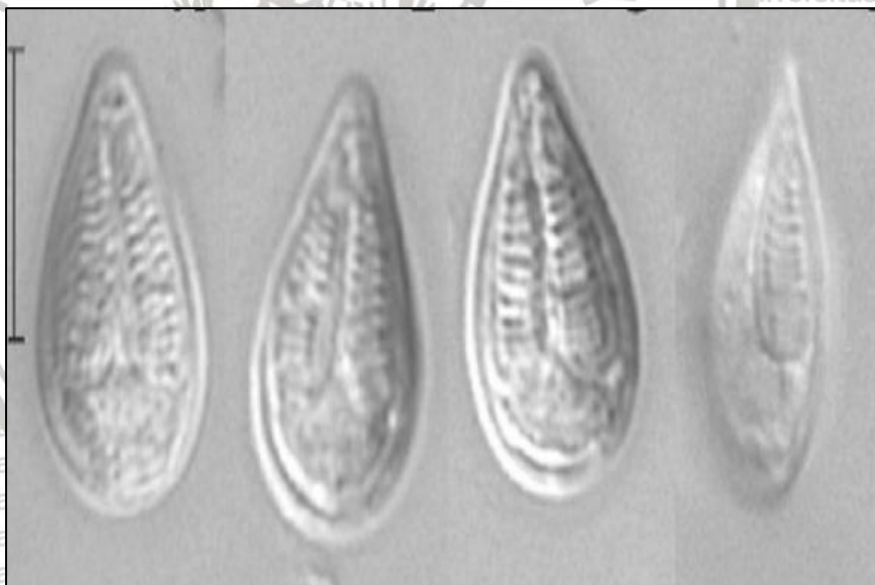
Laporan mengenai *Myxobolus koi* memberikan deskripsi morfometrik yang tidak konsisten, karena tidak ada data urutan genetik yang tersedia untuk parasit ini.

Pengetahuan mengenai *M. toyamai* relatif sedikit sejak deskripsi aslinya ditemukan oleh Kudo pada tahun 1917, meskipun sebagian 18S Data sekuens

SSU rDNA dapat ditemukan di GenBank *Myxobolus koi* Kudo, 1920 (Camus dan Griffin, 2010 ; Atkinson *et al.*, 2015).



Gambar 3. Ikan Koi yang terinfeksi *Myxobolus koi* (Camus dan Griffin, 2010)



Gambar 4. Spora *Myxobolus koi* (Camus dan Griffin, 2010)

Morfologi spora *Myxobolus koi* antara lain : Spora ($n = 25$; dengan mikroskop cahaya) memanjang secara valvular, dengan ujung anterior runcing dan posterior membulat, panjang rerata 15,4 (14,5–16,5) mm dan lebar 8,3 (7,1–9,0) mm. Kedua kapsul polar pyriform dan memanjang, sedikit tidak rata

panjangnya, Panjang rerata berukuran 10,1 (9,0–10,9) mm dan lebar 3,1 (2,5–3,5) mm. Filamen polar melingkar, tegak lurus dengan poros panjang tubuh spora, membuat 10 putaran (9-11) (**Gambar 4**) (Camus dan Griffin, 2010).

2.2.2. Infeksi pada ikan

Gejala klinis pada ikan mas yang terinfeksi *Myxobolus* yaitu odema, sisik lepas, terdapat kista putih atau kuning dan perdarahan pada insang, pada ikan koi terdapat nodul putih pada insang dan nekrosis otot (FAO, 2004). (**Gambar 3**).

Menurut Maftuh *et al.*, (2018) parasit *Myxobolus* sp. yang menginfeksi ikan koi menunjukkan gejala klinis seperti terdapat kista kemerahan (benjolan) pada insang. Infeksi parasit *Myxobolus* sp. Dapat merusak insang ikan, otot, usus, ginjal, dan hati (Camus dan Griffin, 2010 ; Bobadilla S.A *et al.*, 2016).

Secara fisik ikan yang terinfeksi *Myxobolus* terlihat pada kondisi yang baik namun pada sirip anal banyak terdapat luka, ketika dilakukan *scraping* pada sirip terdapat beberapa koloni protozoa. Sedangkan pada organ internal terlihat *autolysis moderate* namun tidak terdapat banyak luka, secara mikroskopis, sekitar 85% bentuk dari lamella insang telah hilang oleh sejumlah besar plasmodia yang telah memperluas lebar filamen insang yang terinfeksi sehingga memiliki bentuk yang tidak teratur, plasmodia memiliki ukuran berkisar dari 50-750 μ m dalam dimensi terpanjang dan sering tampak menyatu (Camus dan Griffin, 2010).

2.3. Respon Molekuler

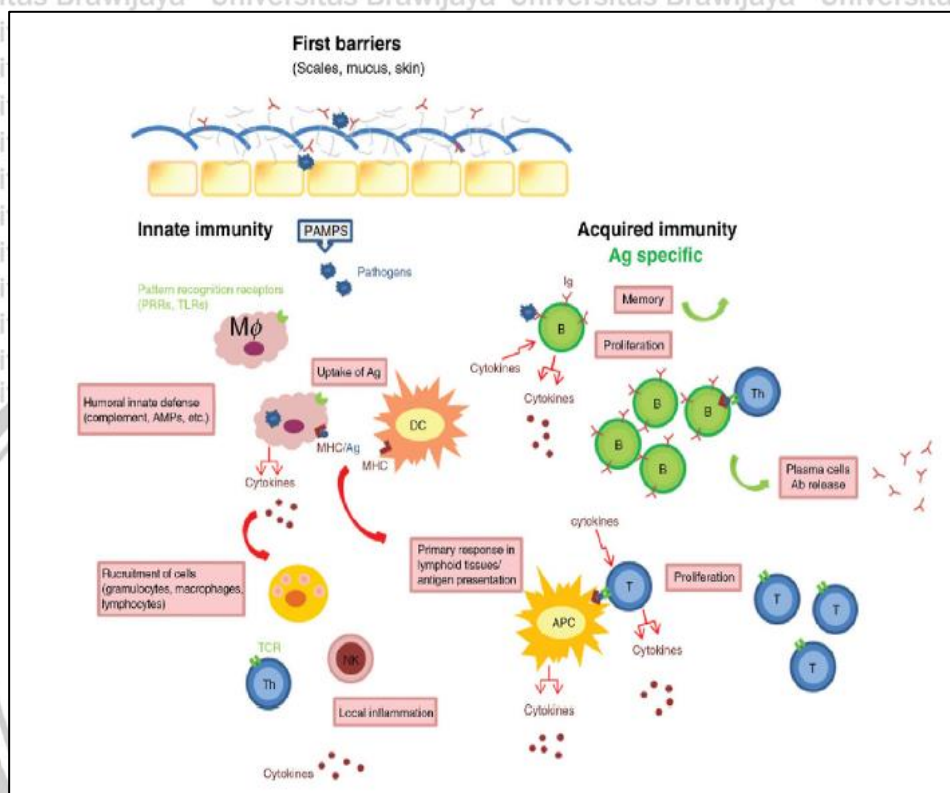
Sel yang terlibat dalam sistem imun normalnya berupa sel yang bersirkulasi dalam darah dan juga pada cairan *lymph*. Sel-sel tersebut dapat dijumpai dalam jumlah yang besar pada organ limfoid dan dapat ditemukan pula tersebar pada seluruh jaringan tubuh kecuali pada *central nervous system* (CNS). Kemampuan sel-sel tersebut untuk bersirkulasi dan mengadakan perpindahan antara darah, *lymph*, dan jaringan merupakan hal yang sangat

penting untuk terjadinya respon imun. Sistem imun harus mampu merespon antigen asing yang mempunyai keragaman molekul sangat besar, sehubungan dengan tugas sistem imun sebagai alat pertahanan, sistem imun mempunyai mekanisme kerja yang sangat unik meliputi : pertama, kerjasama dengan sel-sel lain untuk mengenali antigen dan untuk berkembang menjadi sel efektor. Kedua, mampu keluar-masuk antara sirkulasi dan jaringan, mempunyai daya migrasi menuju jaringan terinfeksi dan *homing* (berdiam) pada daerah yang terinfeksi itu. Ketiga, limfosit yang spesifik harus mampu menerima stimuli dan melakukan penggandaan klon terhadap antigen yang sesuai. Keempat, limfosit menempati organ yang menguntungkan untuk terjadinya pertemuan dengan antigen dan juga mendukung perkembangan dan diferensiasinya. Sel-sel yang terlibat dalam sistem imun berasal dari sumsum tulang (Rifai. M, 2018).

Ikan, seperti manusia, memiliki sistem kekebalan yang terdiri dari sel imun, reseptor, dan kurir kimia. (**Gambar 5**) Komponen fungsional sistem kekebalan tubuh ikan memiliki potensi untuk membentuk pertahanan yang sangat terorganisir terhadap infeksi patogen. Umumnya sistem kekebalan tubuh sangat kompleks dan terintegrasi dengan mekanisme yang membuat beberapa komponen dapat memberikan cadangan jika komponen lain gagal. Infeksi virus ikan menyebabkan perubahan dalam ekspresi kekebalan tubuh gen sistem, mirip apa yang terjadi pada manusia, kedua jenis respon imun pada ikan dapat diklasifikasikan sebagai imunitas humoral dan imunitas seluler. Imunitas humoral ditandai dengan produksi antibodi (imunoglobulin spesifik) yang disekresikan oleh sel B mengikuti aktivasi sel B *antigen-mediated*. Imunitas seluler adalah dimediasi oleh sel T teraktivasi, yang mengeluarkan sitokin dan secara langsung membunuh patogen. (Chen *et al.*, 2014).

Teleostei memiliki sistem kekebalan dengan Sel B dan sel T, organ limfoid primer dan sekunder, dan memiliki respons adaptif terhadap patogen.

Teleosts, memiliki sejumlah karakteristik sistem kekebalan tubuh yang berbeda dari mamalia : ginjal anterior (AK) adalah organ hemopoietik primer; mereka tidak memiliki pusat germinal dan kelenjar getah bening, gen MHC tersebar di kromosom (Dixon dan Stet, 2001 ; Glenney dan Wiens, 2007).



Gambar 5. Mekanisme respon imun pada ikan (Castro dan Carolina, 2015).

Ikan dan sistem kekebalannya juga dapat digunakan sebagai alat ilmiah dalam pemantauan kualitas lingkungan, khususnya pencemaran lingkungan imunotoksik. Ikan menempati berbagai ruang ekologi di lingkungan akuatik dan karenanya perubahan parameter kekebalan ikan memiliki potensi untuk menjadi pengukur kerusakan lingkungan yang sensitive (Pastoret *et al.*, 1998).

2.3.1. Respon imun non spesifik

Komponen imun non spesifik atau *innate* dari sistem imun adalah penghalang pertama yang harus dihadapi mikroorganisme dalam kontak mereka

dengan host. Komponen ini melimpah di permukaan mukosa dan interaksinya dengan *commensals* sangat diatur untuk menghindari reaksi yang berlebihan.

Pada bagian ini komponen respon *innate* humoral dan seluler terdapat di permukaan mukosa teleosts (Gomez *et al.*, 2013).

Reaksi pertahanan non spesifik atau *innate* pada ikan adalah humoral non lymphoid dan komponen seluler dari sistem kekebalan. Beberapa zat humoral nonimmunological dan sekresi sel telah berkontribusi pada ketahanan alami ikan untuk patogen dan agen infeksi agen. yaitu transferin, racun, lektin, (agglutinin dari sifat non immunoglobulin), protein C-reaktif, berbagai enzim litik (misalnya lisozim), interferon, nonenzimatik lisin, penghambat enzim dan komplemen (Pastoret *et al.*, 1998).

Ikan memiliki leukosit, termasuk granulosit (eosinofil, neutrofil / heterofil, basofil) dan monosit /makrofag, yang terlibat dalam reaksi imun seluler nonspesifik. Makrofag berasal dari monosit atau sel-sel jaringan pluripotensial dan dibentuk di kedua lymphomyeloid jaringan dan jaringan nonlymphomyeloid (misalnya darah). Ikan memiliki pigmen (melanin, lipofuscin, hemosiderin dan ceroid) terkait dengan makrofag dan sel-sel ini, disebut melanomacrophages, cenderung terjadi secara agregat di limpa, hati, ginjal dan gonad. Fagositosis, sebagai garis awal pertahanan sel, umum ditemukan di semua ikan yang dikenal sebagai komponen kekebalan non spesifik (Pastoret *et al.*, 1998).

Sistem imun *innate* (*nonspecific immunity*), sebagai kunci utama kemudian dilanjutkan dengan respon imun adaptif (*acquired immune response*) yang bekerjasama (*co-operates*) dalam pemeliharaan homeostasis, melalui sistem protein reseptor. Protein reseptor teridentifikasi sebagai pola molekuler berdasarkan tipikal mikroorganisme patogeniknya, termasuk lipopolisakarida (LPS), peptidoglikan DNA bakteri, RNA virus, dan molekul lain yang tidak normal pada permukaan organisme multiseluler. Sintesis protein efektor yang berfungsi

di dalam sel dan sitokin yang disekresikan sebagai sinyal “alarm” untuk mengingatkan sel lain akan adanya bahaya. Sistem kekebalan tubuh bawaan dari semua organisme multiseluler dilayani oleh berbagai *germline- Pattern Recognition Receptor* (PRR) atau pola pengenalan protein. Berbeda dengan pengenalan molekul resistansi yang didapat, PRR bawaan relatif sedikit dan ditransmisikan secara vertikal, mencerminkan pertahanan evolusioner dari spesies dan adaptasinya dengan kondisi lingkungan tertentu. Dua kategori pola molekuler diyakini menginduksi respon imun : Asing atau pathogen pola molekuler terkait dan pola molekuler yang terpapar melalui kerusakan jaringan inang sendiri karena infeksi, perubahan nekrotik dan kematian sel alami, yang menandakan kondisi bahaya pada sistem imun (Magnadottir, 2006).

2.3.2. Respon imun spesifik

Ketika tubuh terkena antigen untuk pertama kalinya, sejumlah mekanisme nonspesifik (*innate*) dibawa ke dalam sistem untuk membatasi penyebarannya dan kerusakan jaringan yang menyertainya. Mekanisme ini sangat efisien dan berhasil mencegah infeksi banyak organisme. Namun, saat ini organisme telah berevolusi dengan cara untuk menghindari kehancuran oleh sistem pertahanan yang tidak spesifik ini dan sebagai hasilnya, *host* telah mengembangkan mekanisme imun yang lebih kompleks yang secara khusus mengenali penyerang dan reaksi untuk menghancurkannya. Imunitas adaptif ini ditandai oleh perkembangan sel-sel memori T dan B limfosit, yang memungkinkan respon yang lebih cepat dan efektif pada paparan kedua pada kemunculan antigen.

Pengembangan kekebalan khusus antigen sangat tergantung pada kemampuan sel T untuk mengenali antigen. Sel T tidak dapat mengikat antigen langsung dan harus memiliki produk *Major Histocompatibility Complex* (MHC) pada membrane sel. Sel T hanya dapat mengenali antigen yang disajikan oleh produk MHC (Eales, 2003).

Mekanisme pertahanan kekebalan tubuh ikan spesifik (*acquired*) mencakup respon selular dan humoral yang dimediasi, ikan dilengkapi dengan imunoglobulin, *Major Histocompatibility Complex* (MHC), reseptor sel T, dan populasi limfosit T serta limfosit B yang dapat menimbulkan respon imun spesifik terhadap keragaman antigen. Populasi limfosit ikan teleost analog dengan sel T dan sel mamalia B. Limfosit B dan sel plasma, terutama yang terletak di limpa dan ginjal ikan yang mampu menghasilkan antibodi dan seperti dalam mamalia mereka mengandung imunoglobulin pada membran sel mereka. Sampai saat ini ikan diyakini hanya memiliki satu kelas dari Ig yang mirip IgM mamalia. Pada tahun 2005, analisis genom dilakukan pada *rainbow trout* dan ikan zebra menyebabkan penemuan dari isotipe imunoglobulin baru, IgT (Danilova *et al.*, 2005).

2.3.3. Respon imun pada parasit

Ketika myxozoans menular pada ikan maka pada tahap awal akan melakukan kontak pada permukaan mukosa ikan, mereka mungkin ditolak oleh molekul imun yang ada dalam lendir ikan. Jika proses tersebut tidak berhasil, tahap berikutnya myxozoan akan menghadapi *formidable array* yang dimediasi sel dan kekebalan humoral, tanggapan respon yang muncul terdapat di jaringan mukosa host atau jaringan epitel. Dalam beberapa kasus cara ini dapat dilewati oleh parasit myxozoan untuk mencapai jaringan target. Setelah melewati hambatan mukosa atau epitel, tahapan berikutnya parasit mencapai jaringan target, termasuk *immunoprivileged site*, melalui darah di mana mereka menampilkan strategi menghindari imun yang berbeda. Beberapa myxozoans dapat dihilangkan dalam darah karena ekspresi *array seluler* dan faktor kekebalan humoral. Patologi penyakit akut atau kronis kemudian berkembang, tergantung model hubungan pada host-myxozoan akhirnya parasit myxozoan dapat dienkapsulasi dan dibersihkan dari tuan rumah. Namun, pada beberapa

kasus parasit dapat bertahan hidup di dalam jaringan granulomatosa, yang menyebabkan penyakit patologi kronis dan bahkan menyebabkan kematian host yang secara tidak langsung dapat melepaskan parasit ke lingkungan selanjutnya. (Bobadilla *et al.*, 2015 ; Okamura *et al.*, 2015).

Pada beberapa kasus Ekspresi tumor nekrosis faktor TNF- α , Interleukin IL-1 β , dan cyclooxygenase (COX) - 2 isoform rendah pada ikan rainbowtrout yang karena terinfeksi *Tetracapsuloides bryosalmonae*, hal ini berpotensi merefleksikan ketidakmampuan mengekspresikan sel imun, karena miringnya molekul-molekul mekanisme proinflamasi terhadap fenotipe antiinflamasi.

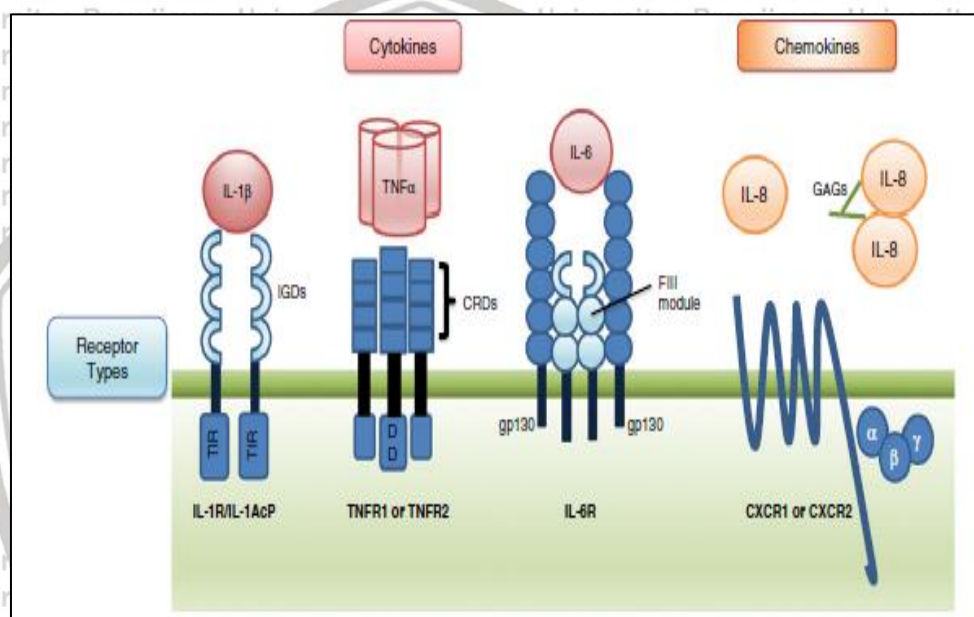
Patologi PKD (*Proliferative Kidney Disease*) yang kronis di ikan rainbowtrout (di Eropa), dipicu oleh tahapan *extrasporogonic* , namun berbeda pada yang terjadi pada ikan trout coklat (*Salmo trutta*). IL-10 pada ikan telah terbukti menekan sitokin pro-inflamasi, fagositosis dan aktivitas *Respiratory Burst*, semuanya tertekan oleh PKD (Okamura *et al.*, 2015).

2.4. Cytokin

Sitokin adalah protein yang menstimulasi atau menghambat aktivasi, proliferasi dan diferensiasi berbagai sel target pada aktivasi antigen, ada dengan mempengaruhi aktivitas berbagai sel lain seperti makrofag, sel mast, sel B, sel T, sel *Natural Killer* (NK) yang terlibat dalam respon imun (Sivangala dan Sumanlatha, 2015).

Sitokin diproduksi oleh sejumlah tipe sel, terutama leukosit yang mengatur sejumlah fungsi fisiologis dan patologis termasuk kekebalan bawaan (*innate*), kekebalan yang didapat dan sejumlah respon inflamasi. Selama efektor fase respon imun alami dan didapat, sitokin diproduksi dari berbagai sumber seperti respon imun dan inflamasi. Sitokin memiliki beberapa efek pada target yang sama pada sel dan dapat menginduksi atau menghambat sintesis dan efek dari sitokin lain. Setelah mengikat reseptor spesifik pada permukaan sel sel

target Sitokin merupakan istilah umum, beberapa istilah yang masuk dalam sitokin antara lain adalah : lymphokin yaitu sitokin yang dibuat dari lymphosit, monokin yaitu sitokin yang dibuat dari monosit, chemokine yaitu sitokin dengan aktifitas chemotaktik dan interleukin yaitu sitokin yang dibuat dari satu leukosit dan berperan pada leukosit yang lain. Sitokin dibuat dari berbagai populasi sel tetapi yang utama diproduksi oleh sel T *helper* (Th) dan makrofag (Zhang dan Jiansiong, 2009).



Gambar 6. Sitokin, Chemokine dan berbagai reseptornya (Turner *et al.*, 2014)

Respons imun non spesifik dan adaptif memanfaatkan regulasi protein sitokin, yang merupakan kelompok protein kecil dengan berat 5-20 kDa, berperan penting dalam pensinyalan sel dan modulasi dari kekebalan organisme.

Penting dalam kesehatan dan penyakit berperan dalam respon imun terhadap bakteri, virus, atau parasit patogen. Sel-sel sistem kekebalan tubuh (makrofag, granulosit, sel dendritik, B-sel, T-sel dan sel mast) dan sel endotel, fibroblas dan berbagai stroma sel-sel mensekresi sitokin yang berikatan dengan reseptor seluler spesifik melalui mekanisme autokrin atau parakrin. Berpengaruh pada

perilaku sel-sel di sekitarnya, membantu memodulasi keseimbangan antara respon imun humoral dan berbasis sel dan pematangan, pertumbuhan, dan responsif sel tertentu populasi. Pada mamalia, ada lebih dari 100 pengkodean gen terpisah untuk aktivitas seperti sitokin, banyak dengan fungsi yang tumpang tindih dan banyak yang masih membutuhkan lebih banyak hal untuk dipelajari.

Saat ini, istilah "sitokin" meliputi interferon (IFN), interleukin (IL), keluarga tumor faktor nekrosis (TNF), keluarga faktor pertumbuhan transformasi (TGF's), keluarga faktor penstimulasi koloni (CSF's) dan keluarga chemokine (**Gambar 6**) (Chung K.F, 2009 ; Jacobson *et al.*, 2017).

Sitokin sebagai pleiotropic mengatur jaringan yang memodulasi respon imun dengan regulasi yang rumit. Umumnya, mereka beroperasi di sekitar tempat mereka disekresikan, meskipun beberapa, seperti interleukin-1 β dan tumor necrosis factor (TNF- α), mengedarkan darah untuk mengerahkan efek sistematis atau endokrin. Respons sel terhadap sitokin biasanya terjadi selama periode jam tertentu, membutuhkan produksi mRNA dan protein. Setelah berinteraksi dengan parasit, makrofag adalah mediator inflamasi yang utama, diaktifkan oleh sitokin proinflamasi IL-1 β dan TNF- α peran sitokin sebagai respon imun bawaan terhadap parasit pertama kali terbukti pada sel epitel pada ikan trout yang terinfeksi *Gyrodactylus derjavini*, di mana IL-1 β , TNF- β dan TGF- β memainkan peran penting (Mladineo dan Block, 2010 ; Turner *et al*, 2014).

Keluarga cytokine ada pada ikan, seperti yang diuraikan dalam banyak tinjauan sebelumnya menggambarkan gen yang ada dan kapan atau di mana mereka diekspresikan pada tingkat transkrip. Dalam banyak kasus, banyak salinan (paralog) gen tertentu terjadi (pada ikan teleost) dan ekspansi independen dari keluarga gen dalam garis keturunan yang berbeda telah terjadi dari gen leluhur yang diduga asli. Misalnya, sitokin pro-inflamasi klasik IL-1 β , TNF- α dan IL-6 hadir, dengan beberapa paralog di sebagian besar spesies.

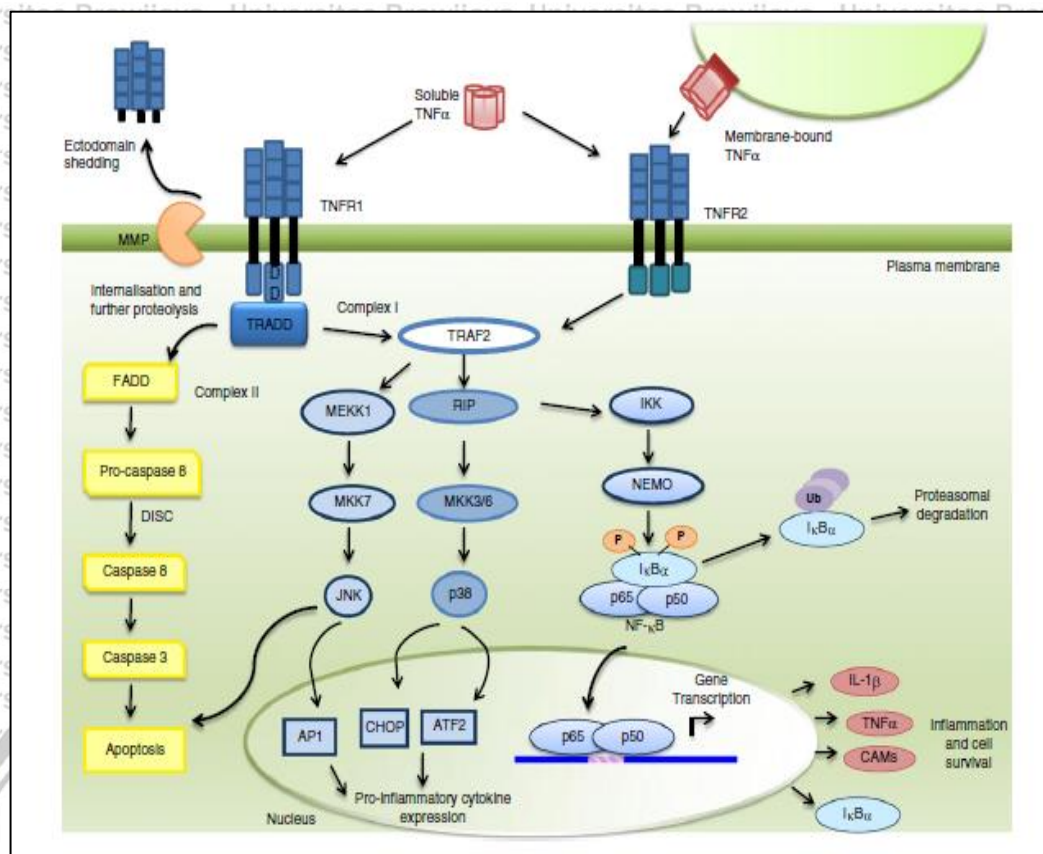
Demikian pula, adanya sitokin yang terkait dengan kekebalan adaptif, termasuk IL-2, IFN γ , IL-4/13 (dengan homologi ke IL-4 dan IL-13), IL-10, IL-17A/F (dengan homologi ke IL-17A dan IL-17F), IL-21, IL-22 dan TGF- β 1 (antara lain), juga dengan beberapa paralog. Sitokin telah dikelompokkan berdasarkan struktur molekulnya karena ini menentukan reseptor yang digunakan dan jalur sinyal yang diaktifkan (Zou dan Secombes, 2016).

Sitokin memainkan peran penting sebagai reaksi terhadap parasit, mendorong pengurangan jumlah mereka atau mempertahankannya pada tingkat aman. Setelah itu gen respon imun pertama kali diamati pada epitel kulit ikan trout yang terinfeksi *Gyrodactylus* dan *Ichthyophthirius multifiliis*, Ekspresi mereka yang diregulasi dibuktikan dalam reaksi inang terhadap kelompok parasit yang berbeda, dari protozoa, monogenea dan copepod (Mladineo dan Block, 2010).

Sitokin pro-inflamasi yang dilepaskan sebagai bagian dari imun bawaan atau respons non-spesifik antara lain adalah tumor necrosis factor- α (TNF- α) interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) dan kemokin seperti interleukin-8 (IL-8) atau CXCL8. Sampai saat ini, semua molekul ini telah di karakterisasi pada ikan (Bird *et al.*, 2005).

2.4.1. Tumor Necrosis Factor α (TNF- α)

TNF- α , juga dikenal sebagai cachectin, adalah sitokin inflamasi yang memainkan peran kunci dalam beberapa model rasa sakit. TNF bertindak pada beberapa jalur pemberian sinyal yang berbeda melalui dua reseptor permukaan sel, (Gambar 7) TNFR1 dan TNFR2 untuk mengatur jalur apoptosis, aktivasi NF κ B pada inflamasi, dan mengaktifkan protein kinase stress-activated (SAPKs). reseptor TNF- α hadir di kedua neuron dan glia. TNF- α telah terbukti berperan penting peran dalam hiperalgesia inflamasi dan neuropatik. (Zhang dan Jiansiong, 2009).



Gambar 7. Signal melalui reseptor TNF 1 dan 2 (Turner *et al.*, 2014)

Tumor necrosis factor (TNF) diketahui sebagai sitokin pleiotropik. Reseptor TNF (TNFR) terlibat dalam beragam fungsi biologis, seperti proliferasi sel, regulasi kekebalan tubuh, peradangan, kematian sel dan apoptosis Lu *et al.*, (2016). Keluarga super TNF (17kDa) mewakili multifungsi sitokin proinflamasi yang mengaktifkan jalur sinyal untuk kelangsungan hidup sel, apoptosis, respons inflamasi dan diferensiasi seluler. TNF terutama disekresikan oleh makrofag, sel limfoid, sel mast, fibroblas dan dapat menyebabkan kematian sel garis sel tumor tertentu. TNF diproduksi setelah aktivasi oleh sistem kekebalan tubuh, mampu untuk memberikan sitotoksitas yang signifikan pada banyak garis sel tumor dan menyebabkan nekrosis tumor pada tertentu sistem model hewan. Dua jenis molekuler TNF dikenal sebagai TNF- α dan TNF- β yang dirangsang oleh interferon (Sivangala dan Sumanlatha, 2015).

Pada mamalia, TNF dikenal potensial proinflamasi yang terutama dilepaskan oleh makrofag dan monosit selama peradangan, infeksi, dan tantangan fisiologis lainnya, TNF bertindak sebagai sitokin multifungsional yang menggunakan berbagai fungsi imunologi dengan meningkatkan produksi sitokin imun dan sintesis prostaglandin E2 dan oksigen reaktif. Seperti pada mamalia, TNFs pada vertebrata tingkat rendah juga telah terbukti memainkan peran penting dalam respon imun terhadap infeksi bakteri dan virus. Gen TNF ikan yang pertama diidentifikasi dari ikan flounder di Jepang dan memiliki beberapa kesamaan imunofungsional dengan pada mamalia. Pada leukosit ikan, ditunjukkan bahwa ekspresi TNF seperti mRNA meningkat secara signifikan setelah pengobatan dengan LPS bakteri dan sitokin inflamasi. Pada studi terbaru menunjukkan bahwa protein TNF dari teleostei similar dengan mamalia, mereka dapat menginduksi fagositosis, respiratory burst dan produksi oksida nitrat dari makrofag. Selain itu, ditemukan bahwa TNF ikan rekombinan dapat mengaktifkan jalur NF- κ B dan meningkatkan ekspresi COX-2, TNF α dan IL-8 dalam makrofag (Li. S *et al.*, 2014 ; Qu *et al.*, 2017).

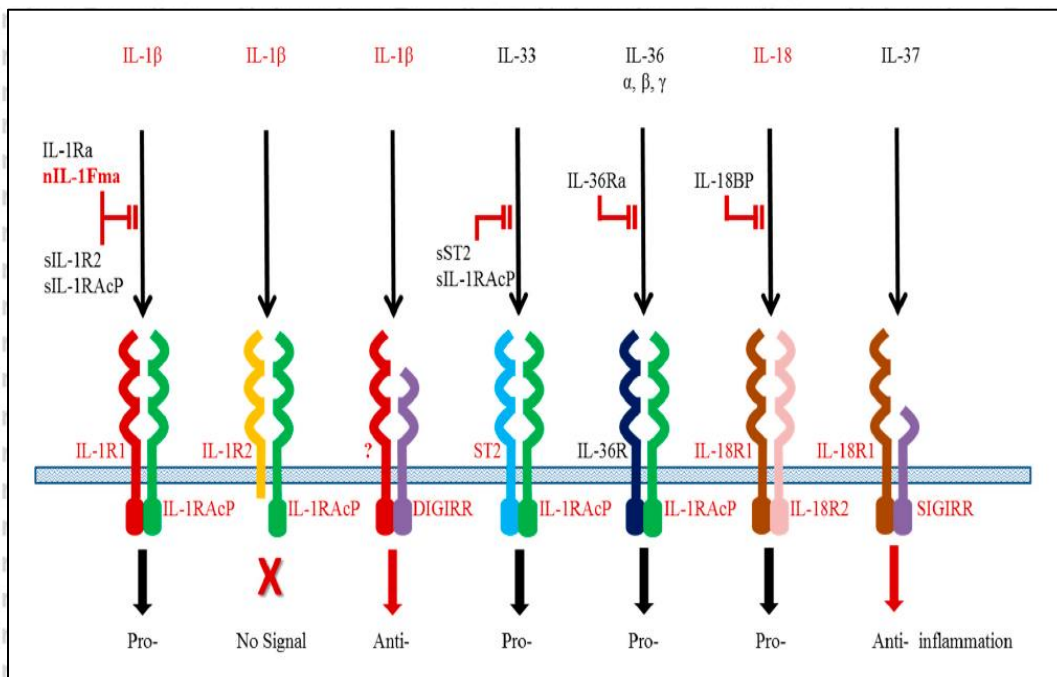
Protein TNF- α meningkatkan aktivitas fagositik leukosit ikan Pada ikan zebra yang terinfeksi *M. marinum*, TNF- α telah terbukti meningkatkan kelangsungan hidup makrofag dan juga membatasi pertumbuhan bakteri pada makrofag yang terinfeksi disertai dengan peningkatan generasi spesies oksidatif reaktif (ROS). Namun, dalam kasus ikan zebra yang terinfeksi *M. marinum*, produksi berlebihan ROS yang teraktivasi TNF - α merusak sel inang, menyebabkan nekrosis dan meningkatkan pelepasan mikobakteria. dari makrofag yang terinfeksi (Zou dan Secombes, 2016).

2.4.2. Interleukin 1 Beta (IL-1 β)

IL-1 dengan berat molekul 17kDa adalah sitokin inflamasi penting terutama dihasilkan oleh jaringan makrofag, monosit, fibroblas dan sel dendritik,

tetapi juga dihasilkan oleh limfosit B, Sel NK dan sel epitel. Hal ini meningkatkan ekspresi faktor adhesi pada sel-sel endotel untuk mengaktifkan perpindahan sel imunokompeten, seperti fagosit dan limfosit ke tempat infeksi. Mereka juga mempengaruhi aktivitas hipotalamus, pusat termoregulasi, yang mengarah ke peningkatan suhu tubuh dimana IL-1 disebut pirogen endogen. Selain demam, IL-1 juga menyebabkan hiperalgesia (peningkatan sensitivitas nyeri), vasodilatasi dan hipotensi. IL-1 menunjukkan dua bentuk IL-1 α dan IL-1 β yang secara fungsional hampir sama yang dikodekan oleh dua gen yang berbeda di mana IL-1 β adalah bentuk dominan pada manusia sementara itu IL-1 α pada tikus Interleukin-1 receptor (IL-1R) terdiri dari reseptor tipe I dan tipe II. Reseptor tipe I adalah terutama bertanggung jawab untuk mentransmisikan efek inflamasi IL-1 sementara reseptor tipe II bertindak sebagai penekan aktivitas IL-1 dengan bersaing untuk pengikatan IL-1. Aksesori reseptor IL-1 protein (IL1RAP) adalah protein transmembran yang berinteraksi dengan IL-1R dan diperlukan untuk IL-1 transduksi sinyal. **(Gambar 8)** Aktivitas biologis utama IL-1 adalah stimulasi sel-sel T-helper yang diinduksi untuk mensekresikan IL-2 dan mengekspresikan reseptor IL-2. (Baerwald M.R., 2013 ; Sivangala dan Sumanlatha, 2015).

IL-1 β adalah interleukin pertama yang dicirikan oleh ikan bertulang dan tulang rawan. Kemudian, dua lainnya anggota keluarga IL-1 ditemukan pada ikan yaitu IL-18 dan kelompok khusus teleost yang diistilahkan anggota keluarga IL-1 baru (nIL-1Fm). Gen Teleost IL-1 β ada sebagai beberapa salinan ini diklasifikasikan menjadi dua kelompok (tipe I dan II) berdasarkan pada organisasi genom dan synten gen . (Zou dan Secombes, 2016). Pada ikan cDNA IL-1 β pertama diidentifikasi dari rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) merupakan urutan pertama cDNA yang diisolasi dari spesies vertebrata non-mamalia (Bo *et al.*, 2015).



Gambar 8. Interaksi IL1 pada keluarga cytokine dan reseptornya (Zou dan Secombes, 2016)

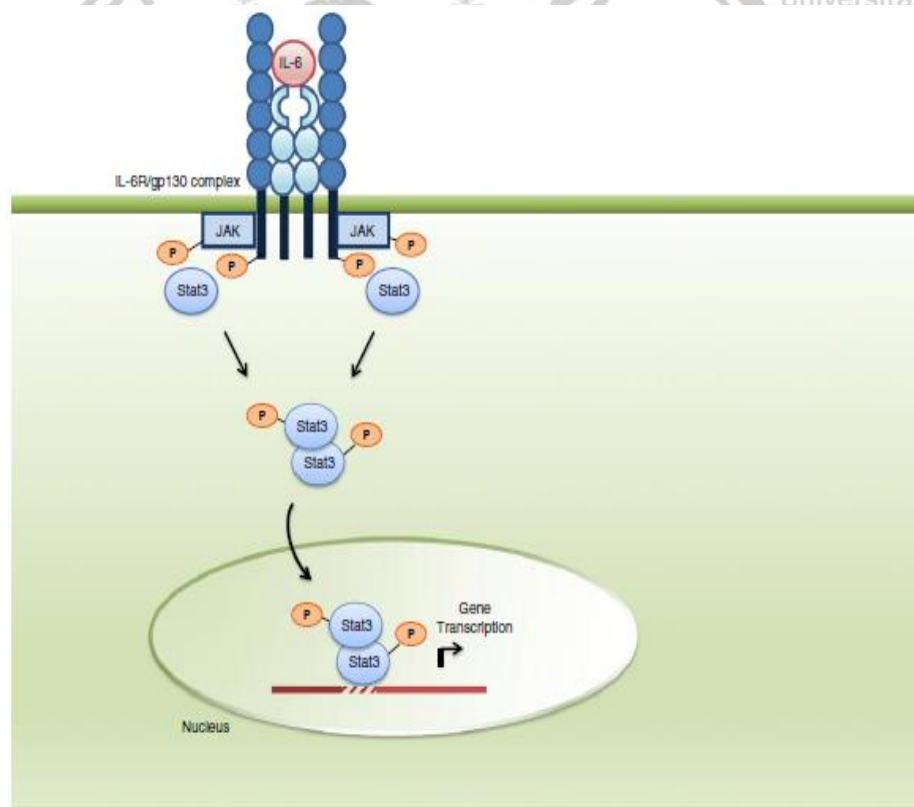
2.4.3. IL-6

IL-6 adalah sitokin pleiotropik yang berperan utama dalam pertahanan imun, diproduksi secara *in vivo* terutama dirangsang oleh monosit / makrofag, fibroblas dan sel endotel vaskular tetapi juga diproduksi oleh sel dendritik, sel T dan B, sel glial dan keratinosit, menurut sifatnya IL-6 dapat bersifat sitokin pro-inflamasi dan miyokin anti-inflamasi. Respon imun distimulasi dengan mensekresi oleh sel T dan makrofag (Costa *et al.*, 2011 ; Scheller *et al.*, 2011 ; Patel, H and V. H. Patel. 2015)

Memiliki banyak fungsi biologisnya termasuk stimulasi sintesis Ig, stimulasi pertumbuhan dan diferensiasi sel-T dan regulasi sintesis protein akut pada fase dari hepatosit . Terdapat dua peran pada IL-6. Pertama, memainkan peran pengatur dalam diferensiasi Th1/Th2, IL-6 yang diproduksi oleh APC memodulasi diferensiasi sel T CD4⁺ menggeser keseimbangan menuju sel Th2. Ini dilakukan dengan mempromosikan produksi IL-4 yang diperlukan untuk diferensiasi Th2 dan dengan menghambat produksi IFN- γ yang dibutuhkan untuk diferensiasi sel

Th1. Kedua, pada peradangan akut IL-6 menurunkan infiltrasi neutrofil dan meningkatkan perekrutan monosit yang mengarah pada resolusi peradangan dan inisiasi respons imun dan yang terakhir, IL-6 dapat mengubah diferensiasi monosit dari sel dendritik ke makrofag (Bird *et al.*, 2005).

IL-6 diekspresikan melalui sel *array*, termasuk di dalamnya fagosit mononuklear, sel T, sel B, fibroblas, sel endotel, keratinosit, hepatosit, dan sel sumsum tulang. IL-6 terlibat dalam haematopoiesis, dan sangat penting dalam pematangan akhir sel B menjadi sel plasma penghasil antibodi, aktivasi sel T, diferensiasi dan regulasi fenotip Th2 dan Treg. (**Gambar 9**) Hal ini penting dalam sekresi protein fase akut oleh hati, proses ini bekerja sama dengan IL-1. (Turner *et al.*, 2014).



Gambar 9. Pathway signal IL-6 (Turner *et al.*, 2014)

2.5. Metode PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu reaksi enzimatik untuk melipatgandakan untai DNA secara selektif *in vitro* menggunakan sepasang primer oligonukleotida spesifik yang membatasi fragmen DNA tertentu. PCR memiliki beberapa macam jenis uji salah satunya *Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction* dan Konvensional. Aplikasi PCR konvensional mempunyai beberapa faktor keterbatasan untuk kuantitas jumlah awal konsentrasi DNA sampel (Djumadi, 1998).

PCR merupakan salah satu metode sebagai solusi untuk mendeteksi jumlah menit dari satu spesies atau sekelompok spesies berdasarkan amplifikasi eksponensial dari urutan DNA target. Target DNA yang digunakan data salinan tunggal atau beberapa target salinan. Salinan nucleus DNA memiliki sensitivitas tinggi dan jumlah salinan lebih konstan dalam sel yang berbeda dari jaringan yang berbeda sehingga diduga layak untuk keperluan kualifikasi target DNA. Pada ikan biasanya lebih difokuskan pada penggunaan mitokondria DNA (mtDNA) sebagai target dan memudahkan dalam identifikasi dan kuantifikasi (Prado *et al.*, 2013).

Studi tentang ekspresi gen dalam sel atau jaringan pada saat tertentu memberikan wawasan tentang kapasitas sel untuk sintesis protein. Tes ekspresi gen, misalnya, profil gen, merupakan alat penting dan banyak digunakan dalam studi nanotoxicity. Ada beberapa metode yang tersedia untuk menentukan ekspresi gen, seperti northern blot analysis, ribonuclease protection assay (RPA), serial analysis of gene expression (SAGE), reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), array PCR, dan microarray. Di antara teknik-teknik ini, *northern blot* analysis tetap menjadi metode standar untuk deteksi dan kuantisasi tingkat mRNA meskipun munculnya teknik yang lebih kuat. RT-PCR sebagai alat yang

relatif sederhana, murah, sangat sensitif dan spesifik untuk menentukan tingkat ekspresi gen target. PCR real-time adalah metode kuantitatif untuk menentukan jumlah salinan template PCR, seperti DNA atau cDNA, dan terdiri dari dua jenis: berbasis probe dan berbasis interkalator. Probe-based real-time PCR, atau juga dikenal sebagai *TaqMan* PCR, membutuhkan sepasang primer PCR dan probe liganukleotida fluorogenik tambahan dengan pewarna fluorescent reporter dan pewarna quencher yang terpasang. (Mo *et al.*, 2012).

PCR konvensional adalah alat dalam penelitian biologi molekuler.

Namun, data yang diperoleh hanya bisa diartikan sebagai baik "positif" (terdeteksi) atau "negatif (tidak terdeteksi). Namun pada laboratorium yang memiliki keterbatasan sumber daya dalam membuat penilaian empiris sehubungan dengan jumlah relatif dari yang diamplifikasi maka metode semikuantitatif dari hasil PCR konvensional dapat digunakan (Antiabong *et al.*, 2016).

2.6. Biomarker

Biomarker yang termasuk didalamnya adalah protein, peptida, sel, data histologis, dan penanda genetik. Penanda genetik mencakup gen tunggal, koleksi kecil tiga atau empat gen, dan koleksi besar (*array*) dari gen. Biasanya, ketika sebuah gen digunakan biomarker apa yang sebenarnya diukur adalah RNA pembawa pesan (mRNA) yang diungkapkan oleh gen. Namun, pada kasus nukleotida tunggal polimorfisme (SNP), amplifikasi gen, kelainan kromosom. Yang diukur adalah gen itu sendiri. Untuk gen itu menyandikan polipeptida, istilah "gen" mengacu pada kombinasi rangkaian regulasi plus urutan pengkodean plus polipeptida intron. Penanda genetik termasuk klasik mRNA, serta mikro-RNA (miRNA). Biomarker yang umum digunakan pada bidang kedokteran antara lain *low density lipoprotein* (LDL) kolesterol untuk menilai risiko *aterosklerosis*, *prostat*

spesifik antigen untuk menilai risiko prostat kanker dan reseptor estrogen manusia-2 (HER2) untuk menilai risiko untuk kanker payudara (Brody, 2016).

Pada bidang perikanan Heat Shock protein 70 dan 90, metallothioneins dan cytochrome mRNA P4501A yang over ekspresi telah digunakan sebagai biomarker untuk memantau tingkat stress pada ikan sea bass yang dibudidayakan dengan kepadatan yang tinggi (Gornati *et al.*, 2005).

2.7. Penelitian terdahulu

Tabel 1. Tabulasi Penelitian Parasit pada Ikan Terdahulu

No	Judul	Tahun	Penulis
1.	Expression of cytokines IL-1 β dan TNF- α in tissues dan cysts surrounding <i>Didymocystis wedli</i> (<i>Digenea</i> , <i>Didymozoidae</i>) in the Pacific bluefin tuna (<i>Thunnus orientalis</i>).	2010.	Mladineo, I., & Block, B. A.
2.	Effects of Subchronic Exposure to N,N-Diethyl-m-toluamide on Selected Biomarkers in Common Carp (<i>Cyprinus carpio</i> L.)	2014	Slaninova <i>et al.</i>
3.	Immune response of olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>) infected with the myxosporean parasit <i>Kudoa septempunctata</i>	2017	Jang <i>et al.</i>
4.	Korelasi kualitas air dengan prevalensi Myxobolus pada ikan koi (<i>Cyprinus carpio</i>) di sentra budidaya ikan koi Kabupaten Blitar Jawa Timur - Skripsi	2016	Aprillia Deriyanti
5.	Development of Spore Protein of Myxobolus koi as an Immunostimulant for Prevent of Myxobolus on Gold Fish (<i>Cyprinus carpio</i> Linn) by Oral Immunisation	2017	Mahasri, G
6.	Identifikasi <i>Myxobolus</i> Sp. Pada Famili Cyprinidae Dengan Metode Molekuler di Provinsi Jawa Timur Dan Jawa Tengah - Tesis	2016	Nurekawati, A.D

3. KERANGKA KONSEP PENELITIAN

3.1. Landasan Teori

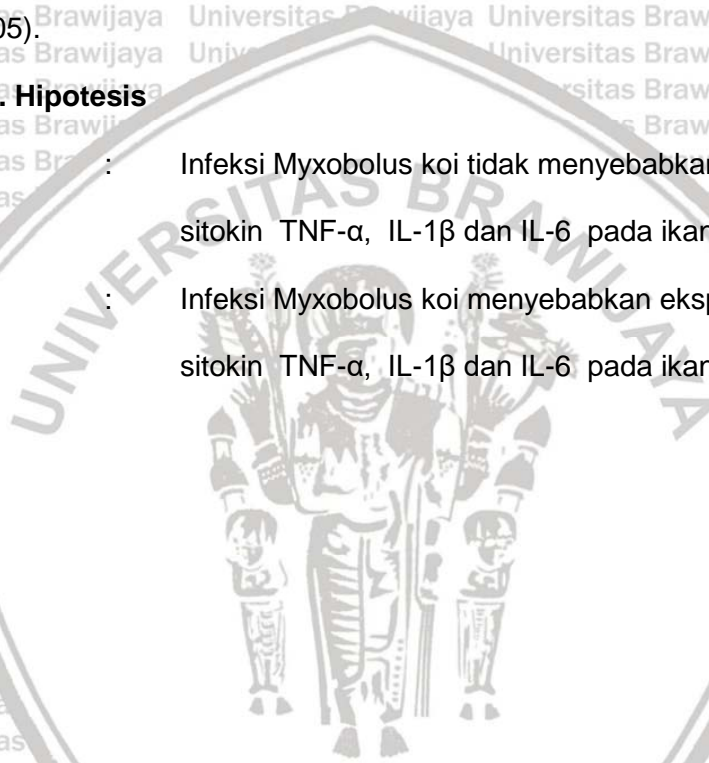
Terdapat dua tipe mekanisme pertahanan pada inang (*host*) yaitu innate dan adaptif (*acquired*). Perbedaan utama di antara mereka adalah jenis reseptor yang digunakan untuk mengenali patogen. Pengenalan kekebalan innate bergantung pada *Pattern recognition receptor* (PRR), dengan kekhususan yang luas, adalah *germline* yang dikodekan dan telah berevolusi untuk dikenali *Pathogen Associated Molecular Pattern* (PAMP). Satu fitur pemersatu PRRs adalah mereka struktur yang sangat terlindungi, yang invariant antara mikroorganisme dari kelas yang diberikan. Sebaliknya, respon adaptif dimediasi oleh reseptor antigen (Ag), dengan acak tetapi dengan kekhususan yang sempit. PRR yang berbeda terlibat dalam melakukan tugas-tugas tertentu, termasuk opsonisasi, aktivasi bagian pelengkap, fagositosis, dll. Ada beberapa kelas PRRs yang berbeda secara fungsional, tetapi yang paling baik dikarakteristikan adalah *Reseptor Toll-like* (TLRs), yang merupakan protein transmembran tipe-I dengan ekstraseluler dengan motif pengulangan kaya leusin (LRR) dan *intraseluler Toll* / domain. *interleukin-1 receptor* (TIR) Anggota dari keluarga TLR berkontribusi baik terhadap interaksi sel-sel dan pemberi isyarat. Studi gen TLR pada beberapa spesies teleost (*D. rerio*, *T. rubripes*, *C. auratus*, *Oncorhynchus mykiss*, *P. olivaceus*) telah menunjukkan pelestarian evolusi komponen kunci dari pensinyalan TLR pada vertebrata. Dua keluarga tambahan dari reseptor bawaan telah dijelaskan bahwa bergabung dengan TLR sebagai sensor kunci patogen .

Mereka adalah reseptor intraseluler termasuk reseptor NOD-like (NLRs) dan RIG-I (retinoic acid-inducible gene yang dapat diinduksi I) -seperti protein (RLRs). Semua NLR mengandung domain oligomerisasi yang mengikat nukleotida (NOD) diikuti oleh LRR pada ujung karboksi. Kelompok PRR penting lainnya diwakili oleh C

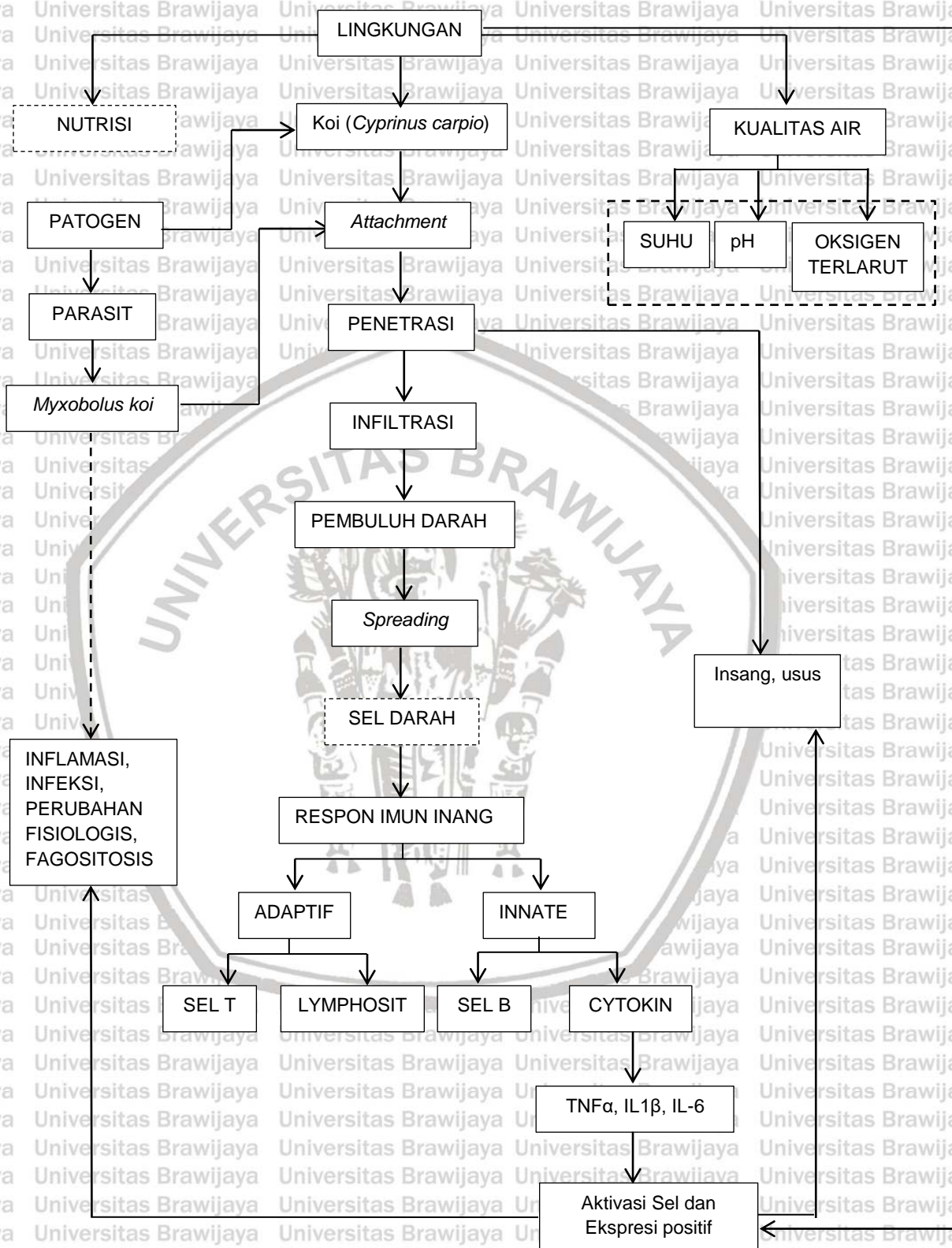
type lektin, yang paling dikenal karena kemampuannya mengenali karbohidrat yang berhubungan dengan pathogen spesifik struktur. Ini dicirikan oleh lectin tipe-C reseptor (CLR), protein yang mengandung karbohidrat recognition domains (CRDs). Beberapa CLR diproduksi sebagai protein transmembran pada sel dendritik dan makrofag (MF), atau disekresikan sebagai protein larut. Di antara yang larut PRR, *mannan-binding lectins* (MBLs) dan ficolins mengikat struktur N-acetyl-glucosamine dan mannose umum di antara mikroba (Bird *et al.*, 2005).

3.2. Hipotesis

- H0 : Infeksi *Myxobolus koi* tidak menyebabkan ekspresi positif pada sitokin TNF- α , IL-1 β dan IL-6 pada ikan Koi (*Cyprinus carpio*)
- H1 : Infeksi *Myxobolus koi* menyebabkan ekspresi positif pada sitokin TNF- α , IL-1 β dan IL-6 pada ikan Koi (*Cyprinus carpio*)

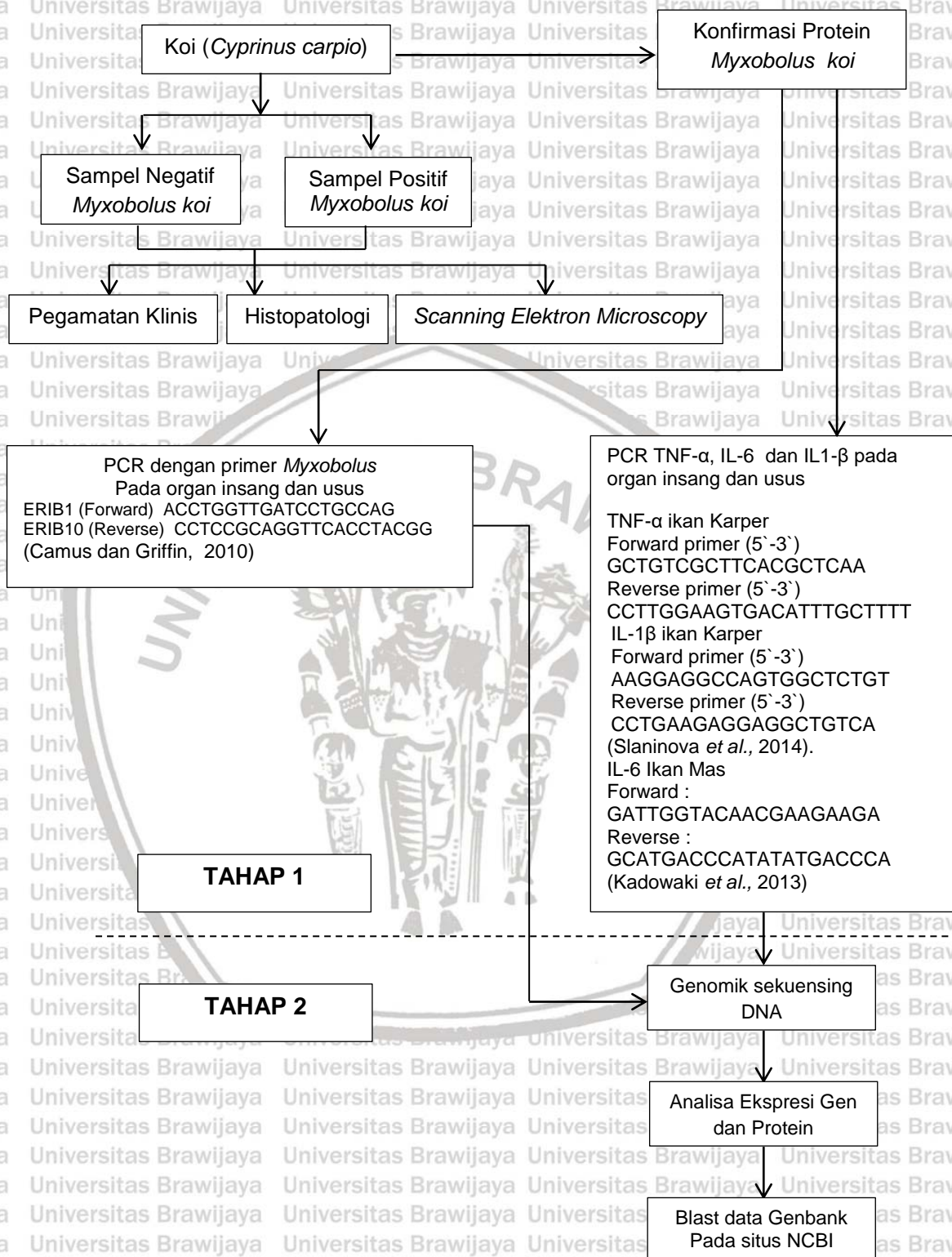


3.3. Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 10. Kerangka Konsep Penelitian

3.4. Kerangka Operasional



Gambar 11. Kerangka Operasional Penelitian

3.5. Kebaharuan Penelitian

Pemeriksaan parasit dengan parameter klinis dan indeks zootechnical sudah dirasakan tidak cukup untuk memantau kesehatan ikan ketika terjadi infeksi kronis. Karena itu, di samping penanda tradisional (biokimia, histologis, morfologis dan fisiologis), penting untuk mencari parameter alternatif seperti biomarker molekuler. Respon reseptor Tumor Necrosis Faktor dan Interleukin terhadap infeksi *Myxobolus koi* dapat dijadikan penanda (*biomarker*) dalam menentukan serangan parasit. Peningkatan dan ekspresi gen respon reseptor Tumor Necrosis Faktor dan Interleukin mengindikasikan serangan *Myxobolus koi* pada benih ikan koi (*Cyprinus carpio*).

3.6. Strategi Publikasi

Hasil penelitian mengenai Proliferasi sel TNF- α , IL-1 β dan IL-6 Sebagai Penanda Ketahanan Gen Molekuler Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) Yang Terinfeksi Parasit *Myxobolus Koi* telah dipublikasikan di *The Journal of Experimental Life Science* Vol. 9 No.3 Tahun 2019. Publikasi jurnal ini sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan studi di program Magister Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang.

4. METODE PENELITIAN

4.1. TEMPAT PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Surabaya I, Sidoarjo Jawa Timur, Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang dan PT. Genetika Science Jakarta

4.2. ALAT DAN BAHAN

4.2.1. Alat

Gunting, botol sampel, skalpel, pinset, beker gelas, cawan petri, gelas objek, cover slip, nampan plastik, mikroskop, timbangan analitik, microtube, mikropipet eppendorf (10 μ l, 200 μ l, 1000 μ l), tip mikropipet, vortex, tabung eppendorf (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml), timbangan analitik, hot plate, minispin, thermal cycler T100 (Bio-Rad), tabung erlenmayer (Iwaki Pyrex), pellet paste, microcentrifuge tube, mikropipet, vortex, UV doc (Alpha innotech), polaroid camera, freezer lemari es dan inkubator, Dry Block Thermostat (Biosan), DNA/RNA UV-Cleaner Box (Biosan). Automatic Tissue Processor, Wax Dispenser, Microtome, Waterbath

4.2.2. Bahan

a) Ikan Koi (*Cyprinus carpio*)

Sampel Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) dengan ukuran 5-7 cm, ikan yang diambil merupakan ikan dengan gejala klinis infeksi parasit *Myxobolus koi* seperti insang membengkak, operkulum tidak dapat menutup sempurna dan terdapat nodul pada bagian insang sedangkan ikan sehat digunakan sebagai control negative.

- b) Bahan yang digunakan PCR antara lain : Silica Extraction Kit (GeneReach Biotechnology Corp), *Master Mix* (MyTaq HS Red Mix, 2x BIOLINE), *ddH₂O/Nuclease Free water* (PCR Grade Water) (Ambion, AM9937), *Agarose gel* (1% Gel O-Shooter) (LE Agarose, R9012LE-500gr), DEPC H₂O (GeneReach Biotechnology Corp), GT Buffer (GeneReach Biotechnology Corp), Etanol 70%, TAE Buffer, Ethidium bromide (Maestro, MR031203), SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen), Marker 100 bp DNA Ladder 100-3000 bp (Geneaid), Marker 100 bp DNA Ladder 100-1500 bp (Nexmark), *template* DNA
- c) Primer *Myxobolus* ERB1 dan ERB 10, sesuai dengan **Tabel 1**.
- d) Primer set TNF α , IL1- β (Forlenza et al., 2008) dan IL-6 (Kadowaki et al., 2013) dapat dilihat pada **Tabel 2**.
- e) Bahan yang digunakan untuk histopatologi : Aquades, Alkohol absolut, Alkohol teknis, Xylene, Paraplast, Mayers Hematoxylin, Eosin, Slide glass, Cover glass

4.3. METODE PENELITIAN

Metode penelitian yang digunakan adalah deskriptif kualitatif, yaitu metode yang berfungsi untuk mendeskripsikan atau memberi gambaran terhadap obyek yang diteliti melalui data atau sampel yang telah terkumpul sebagaimana adanya tanpa melakukan analisis dan membuat kesimpulan yang berlaku umum (Sugiono, 2012). Penelitian ini menggambarkan ekspresi respon imun reseptor TNF- α , IL-1 β dan IL-6 pada ikan koi (*Cyprinus carpio*) yang terinfeksi parasite *Myxobolus koi* secara jelas dan terperinci yang selanjutnya dibandingkan literatur.

4.4. PROSEDUR PENELITIAN

4.4.1. PENGAMBILAN SAMPEL

Sampel Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) diambil dari Desa Nglegok Kecamatan Nglegok Kabupaten Blitar dengan ukuran 5-7 cm, ikan yang diambil merupakan ikan dengan gejala klinis infeksi parasit *Myxobolus koi* dari 3 kolam yang berbeda.

Sedangkan untuk negatif control ikan sehat diambil dari lokasi yang berbeda.

Pengambilan contoh media pembawa lebih didasarkan pada pendekatan aspek patogen dalam suatu populasi. Pendekatan ini mengandung pengertian bahwa apabila dalam suatu populasi ditemukan patogen target pada minimal 1 (satu) contoh uji, maka dapat disimpulkan bahwa seluruh populasi positif terinfeksi oleh patogen tersebut. Teknik pengambilan contoh media pembawa dapat dilakukan dengan *selective sampling* dan/atau *random sampling*. *Selective sampling* adalah pemilihan media pembawa yang digunakan sebagai contoh terutama didasarkan pada abnormalitas (adanya ketidaknormalan) populasi yang tampak secara visual sesuai target penyakit (Anonymous, 2017).

4.4.2. HISTOPATOLOGI

Histopathologi adalah studi tentang mikroanatomi jaringan spesifik, metode ini telah berhasil digunakan sebagai alat diagnostic dalam ilmu kedokteran dan kedokteran hewan sejak dulu investigasi seluler dilakukan sejak pertengahan abad ke-19 (Robert R.J, 2012). Ilmu ini mempelajari perubahan abnormal dari sel atau jaringan yang digunakan untuk mendiagnosa penyakit, sehingga merupakan pendukung dari suatu diagnose (Hossain *et al.*, 2007).

4.4.2.1. Pembuatan Blok Jaringan

- a) Spesimen difiksasi menggunakan larutan 10% formalin minimal selama 24 jam. Specimen yang mengandung chitin difiksasi menggunakan larutan Davidson maksimal 24 jam kemudian dipindahkan kedalam larutan buffer formalin 10%.
- b) Spesimen dicatat pada buku agenda sesuai nomor sampel, kemudian sampel dipotong menjadi bagian kecil berukuran ± 1 cm. Sampel dimasukkan dalam cassette atau wadah spesimen dan diberi label sesuai dengan nomor sampel.
- c) Masukkan kedalam wadah tissue processor dan set program pada alat tersebut sesuai kebutuhan kita.
- d) Proses dehidrasi menggunakan larutan alkohol bertingkat mulai dari alkohol 70 %, 80% (2x ulangan), 85% masing-masing selama 2 (dua) jam. Selanjutnya pindah ke alkohol absolut sebanyak 3x ulangan masing-masing 2 (dua) jam.
- e) Clearing menggunakan xylol sebanyak 3x ulangan, masing-masing selama 30 menit.
- f) Embeding menggunakan parafin cair dalam dengan suhu 58° C sebanyak 2 x ulangan, masing-masing selama 2 jam.
- g) Pencetakan (blocking) dengan mengeluarkan spesimen dari casete untuk dicetak menggunakan cetakan parafin (*mould*), selanjutnya hasil block dimasukkan dalam freezer selama 5 menit. Keluarkan blok jaringan dari cetakan dan rapikan dengan membentuk bujur sangkar ukuran 1,5 cm.
- h) Dengan menggunakan microtome, jaringan dipotong dengan ketebalan 3-5 μ , potongan jaringan segera diapungkan dalam waterbath yang telah berisi akuades yang dipanaskan hingga suhu 50° C. Kemudian angkat pita parafin tersebut menggunakan obyek glass, kering anginkan dan diberi label.

4.4.2.2. Pewarnaan Jaringan

- a) Potongan jaringan yang telah menempel pada obyek glass disusun dalam staining jar kemudian dimasukkan kedalam inkubator dengan suhu 37°C selama ± 1 jam selanjutnya obyek glass tersebut dikeringkan.
- b) Dilakukan proses deparafinasi menggunakan larutan xylol sebanyak 2 kali ulangan masing-masing selama 5 menit.
- c) Rehidrasi, menggunakan alkohol mulai dari alkohol absolut, alkohol 95% sebanyak 2x ulangan masing-masing 10 kali celupan atau ± 1 .
- d) Masukkan kedalam akuades 10 kali celupan.
- e) Dilanjutkan proses pewarnaan menggunakan pewarna Hematoxylin selama 2 menit kemudian dicuci dengan air mengalir selama 5 menit, dan dilanjutkan dengan pewarnaan eosin selama 10 menit.
- f) Dehidrasi menggunakan alkohol mulai dari alkohol absolut, alkohol 95%.
- g) Clearing menggunakan xylol sebanyak 2x ulangan masing-masing selama 10 kali celupan atau ± 1 menit.
- h) Mounting, slide-slide yang berisi potongan jaringan dikeluarkan dari staining jar satu persatu, kemudian ditutup dengan cover glass yang telah diberi entelan.
- i) Preparat jaringan kemudian diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 40x untuk dianalisa.
- j) Amati kelainan jaringan yang ada, kemudian bandingkan dengan jaringan normal.

4.4.3. SEM (*Scanning Electron Microscopy*)

Pengamatan dilakukan dengan SEM dengan mengawetkan jaringan yang terinfeksi Myxobolus pada larutan 2.5% glutaraldehyde selama 2 jam pada suhu

4 °C dilanjutkan dengan proses dehidrasi dengan ethanol dan dikeringkan kemudian dibilas dengan campuran absolute acetone dan amyl acetate dengan perbandingan rasio tiap larutan 3:1, 2:2 dan 1:3 dan yang terakhir dengan 100% amyl acetate.

Jaringan dikeringkan pada titik kritis menggunakan CO₂ pada HCP: 2 Critical Point Dryer (Hitachi), kemudian dilapisi dengan *metallic gold* pada IB-2 ion coater dan diperiksa dengan Hitachi S-530 Scanning Electron Microscope pada voltase 15 dan 20 KV. (Saha dan Bandyopadhyay, 2017).

4.4.4. Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

4.4.4.1. EKSTRAKSI

DNA diekstraksi dengan menggunakan *Silica Extraction Kit* (Gene) dari jaringan yang diawetkan dalam larutan etanol absolut. Masing-masing sampel jaringan insang dan usus yang teridentifikasi *Myxobolus* maupun yang sehat dimasukkan ke dalam mikrotube 1,5 ml, tambahkan dengan 900 ul GT Buffer, haluskan dengan menggunakan pastle penggerus, sentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 3 menit. Larutan lapisan diambil 600 ul dipindahkan ke dalam mikrotube 1,5 ml yang baru, masukkan silica 40 ul, vortex agar homogen dan disentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 15 detik (tidak boleh lebih dari 20 detik). Setelah di sentrifugasi buang larutannya, cuci *pellet silica* dengan 500 ul GT Buffer, vortex sampai pellet silica membentuk suspensi, di sentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 15 detik (tidak boleh lebih dari 20 detik), buang larutan, tambahkan 1 ml ethanol 70% untuk mencuci *pellet silica* dan vortex sampai *pellet silica* membentuk suspensi. Sentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 15 detik (tidak boleh lebih dari 20 detik), buang ethanol, gunakan mikropipet untuk mengambil ethanol yang masih tersisa, tambahkan 1 ml ddH₂O untuk meresuspensikan *pellet silica*, vortex sampai *pellet silica* membentuk suspense.

Inkubasi pada suhu 55°C selama 10 menit, homogenkan dengan di vortex selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 2 menit, kemudian pindahkan 500 ul dari larutan atas ke dalam mikrotube baru dan siap digunakan (Nurekawati, A.D., 2016).

4.4.4.2. AMPLIFIKASI

Amplifikasi bertujuan untuk memperbanyak DNA dari template, penelitian ini menggunakan Primer untuk amplifikasi merupakan primer spesifik pada 18S SSU rDNA untuk mendeteksi *Myxobolus* sp. pasangan primer yang digunakan untuk mendeteksi parasite *Myxobolus* sp adalah 1 set primer spesifik (Camus dan Griffin, 2010) sebagai berikut :

Tabel 2. Primer *Myxobolus* sp

NO	PRIMER	SEQUENCE (5'-3')	DIRECTION	SIZE (bp)
1.	ERB1	ACCTGGTTGATCCTGCCAG	Forward	2-20
2.	ERB10	CCTCCGCAGGTTACCTACGG	Reverse	2079-2059

Sedangkan untuk susunan primer untuk TNF α , IL1- β (Forlenza *et al.*, 2008) dan IL-6 (Kadowaki *et al.*, 2013) adalah sebagai berikut :

Tabel 3. Primer TNF α , IL1- β dan IL-6

NO	GENES	SEQUENCE (5'-3')	DIRECTION	SIZE (bp)	Acc Number
1.	IL-6	GATTGGTACAACGAAGAAGA	Forward	256	AY102633
2.	IL-6	GCATGACCCATATATGACCCA	Reverse		
3.	IL-1 β	ACGCCACCAAGAGCCTTTTA	Forward	206	AJ245635
4.	IL-1 β	GCAGCCCATATTTGGTCAGA	Reverse		
5.	TNF α	GCTGTCTGCTTCACGCTCAA	Forward	106	AJ311800
6.	TNF α	CCTTGGAAGTGACATTTGCTTTT	Reverse		

Amplifikasi dengan menggunakan masing-masing primer dengan prosedur sebagai berikut :

1. Primer Myxobolus sp ERB1 dan ERB 10

total volume campuran reaksi PCR sebanyak 25 μ l, yang terdiri dari Master Mix (KAPABiosytems, KK510). Primer Forward (ERB1) 2 μ l, Primer Reverse (ERB10) 2 μ l, Template DNA 2 μ l, Nuclease free water 19 μ l. Amplifikasi dilakukan dengan setting suhu *Predenaturasi* pada 94 °C selama 2 menit, dilanjutkan *denaturasi* 94 °C selama 1 menit, *annealing* 58°C selama 1 menit, *extension* 72°C selama 1 menit 30 detik sebanyak 35 siklus dan ditambah *final elongation* 72°C selama 5 menit.

2. Primer IL-6

total volume campuran reaksi PCR sebanyak 25 μ l, yang terdiri dari Master Mix (KAPABiosytems, KK510). Primer Forward 2 μ l, Primer Reverse 2 μ l, Template DNA 2 μ l, Nuclease free water 19 μ l. Amplifikasi dilakukan dengan setting suhu *Predenaturasi* pada 95°C selama 3 menit, dilanjutkan *denaturasi* 95 °C selama 30 detik, *annealing*, *extension* 72°C selama 1 menit sebanyak 34 siklus dan ditambah *final elongation* 72°C selama 5 menit. Optimasi suhu dilakukan untuk memperoleh suhu *annealing* terbaik, didapatkan dengan mengatur gradient *thermal cycler* (T 100 Bio Rad) pada 4 tingkatan suhu yang berbeda yaitu 58,2°C, 56,5 °C, 54,5 °C dan 52,7 °C.

3. Primer IL-1 β

total volume campuran reaksi PCR sebanyak 25 μ l, yang terdiri dari Master Mix (KAPABiosytems, KK510). Primer Forward 2 μ l, Primer Reverse 2 μ l, Template DNA 2 μ l, Nuclease free water 19 μ l. Amplifikasi dilakukan dengan setting suhu *Predenaturasi* pada 95°C selama 3 menit, dilanjutkan *denaturasi* 95 °C selama 30 detik, *annealing*, *extension* 72°C selama 1 menit sebanyak 34 siklus dan ditambah *final elongation* 72°C selama 5 menit. Optimasi suhu

dilakukan untuk memperoleh suhu annealing terbaik, didapatkan dengan mengatur gradient *thermal cycler* (T 100 Bio Rad) pada 4 tingkatan suhu yang berbeda yaitu 58°C, 56,1°C, 53,8°C dan 51,9°C.

4. Primer TNF α

total volume campuran reaksi PCR sebanyak 25 μ l, yang terdiri dari Master Mix (KAPABiosystems, KK510). Primer Forward 2 μ l, Primer Reverse 2 μ l, Template DNA 2 μ l, Nuclease free water 19 μ l. Amplifikasi dilakukan dengan setting suhu Predenaturasi pada 95°C selama 2 menit, dilanjutkan denaturasi 95°C selama 1 menit, annealing, extension 72°C selama 30 detik sebanyak 40 siklus dan ditambah final elongation 60°C selama 1 menit. Optimasi suhu dilakukan untuk memperoleh suhu annealing terbaik, didapatkan dengan mengatur gradient *thermal cycler* (T 100 Bio Rad) pada 4 tingkatan suhu yang berbeda yaitu 60°C, 58°C, 56,1°C dan 53,8°C.

4.4.4.3. ELEKTROFORESIS

Hasil amplifikasi DNA diperiksa menggunakan 1,5 % gel agarose direndam menggunakan TAE buffer 1X. Lubang pada gel diisi secara berurutan dengan marker, 8 μ l hasil amplifikasi dan blanko kontrol. Proses elektroforesis dilakukan selama 45 menit dengan voltase 100 volt. Agarose yang telah ditambahkan SyBr save (Invitrogen) selama 15 menit direndam dalam buffer TAE 1x. Gel diletakkan pada *gel documentation*, diamati di bawah sinar UV dan didokumentasikan.

4.5. ANALISA DATA

Data yang diperoleh meliputi hasil uji PCR dan Sekuensing pada masing-masing organ target disajikan secara deskriptif dalam bentuk dokumentasi foto band

DNA dan data nukleotida sekuens gen target. Data tersebut selanjutnya dianalisa, sehingga diharapkan dapat menjelaskan mekanisme parameter reseptor respon imun tersebut terhadap sistem imunitas ikan koi (*Cyprinus carpio*). Analisa data sekuensing yang diperoleh, dianalisa menggunakan program Mega ver.6.06 (software) dan dibandingkan dengan sekuens nukleotida GenBank dengan menu pilihan Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*) pada situs NCBI dan dibantu dengan menggunakan metode ClustalW2 (Thompson *et al.*, 1994). Sedangkan untuk menganalisa kekerabatan (homologinya) digunakan metode *Neighbour Joining* (NJ tree) dan ditampilkan dengan menu *TreeViewX* (Page, 1996).

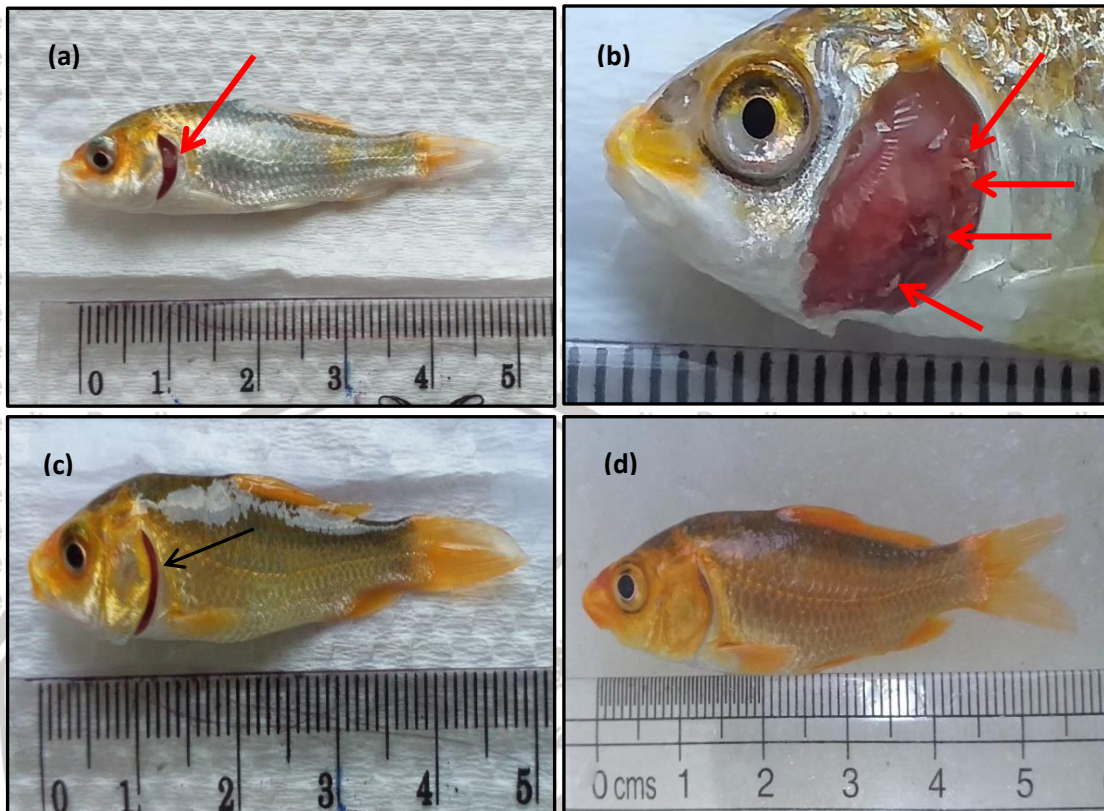


5. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Gejala Klinis

Benih ikan sampel diambil dengan ukuran 5-7 cm dengan berat 8-10 gram sebanyak 8 ekor. Pengambilan ikan sampel dilakukan di kolam pembesaran milik pembudidaya ikan koi yang berlokasi di Desa Kemloko dan Desa Kedungwaru Kecamatan Nglegok Kabupaten Blitar Jawa Timur. (8°02'04.3"S 112°12'12.2"E)

Lampiran 1. Pengamatan gejala klinis dilakukan pada kolam pembesaran, ikan yang terinfeksi parasit *Myxobolus* akan memiliki gerakan *operculum* yang lebih cepat dibandingkan ikan sehat dan pada ikan yang terinfeksi berat ikan akan sering menuju permukaan air untuk bernafas (Sumuduni *et al.*, 2018). Pada ikan yang terinfeksi terdapat nodul putih pada insang dan *operculum* yang tidak dapat menutup dengan sempurna (**Gambar 12a,b**) serta insang akan berwarna lebih pucat (**Gambar 12c**). (Camus dan Griffin. 2010 ; Maftuh *et al.*, 2018). Insang selain memiliki fungsi pernafasan juga berfungsi dalam pengaturan pertukaran garam dan air serta berperan utama dalam ekskresi nitrogen, sedikit kerusakan struktural pada insang dapat membuat ikan rentan terhadap osmoregulasi serta sulit dalam pernafasan (Cengiz, 2006 ; Robert, R.J., 2012). Hasil pengamatan secara klinis ikan yang terinfeksi *Myxobolus koi* ditampilkan pada **Gambar 12** berikut ini.



Gambar 12. Gejala klinis ikan koi (*Cyprinus carpio*) yang terinfeksi parasit *Myxobolus koi* (a) Nodul putih pada lamella insang (b) Warna insang terlihat lebih pucat dan terdapat kista pada lamella insang (c) Operculum tidak dapat menutup dengan sempurna (d) Ikan tanpa gejala klinis infeksi parasit.

5.2. Histopatologi

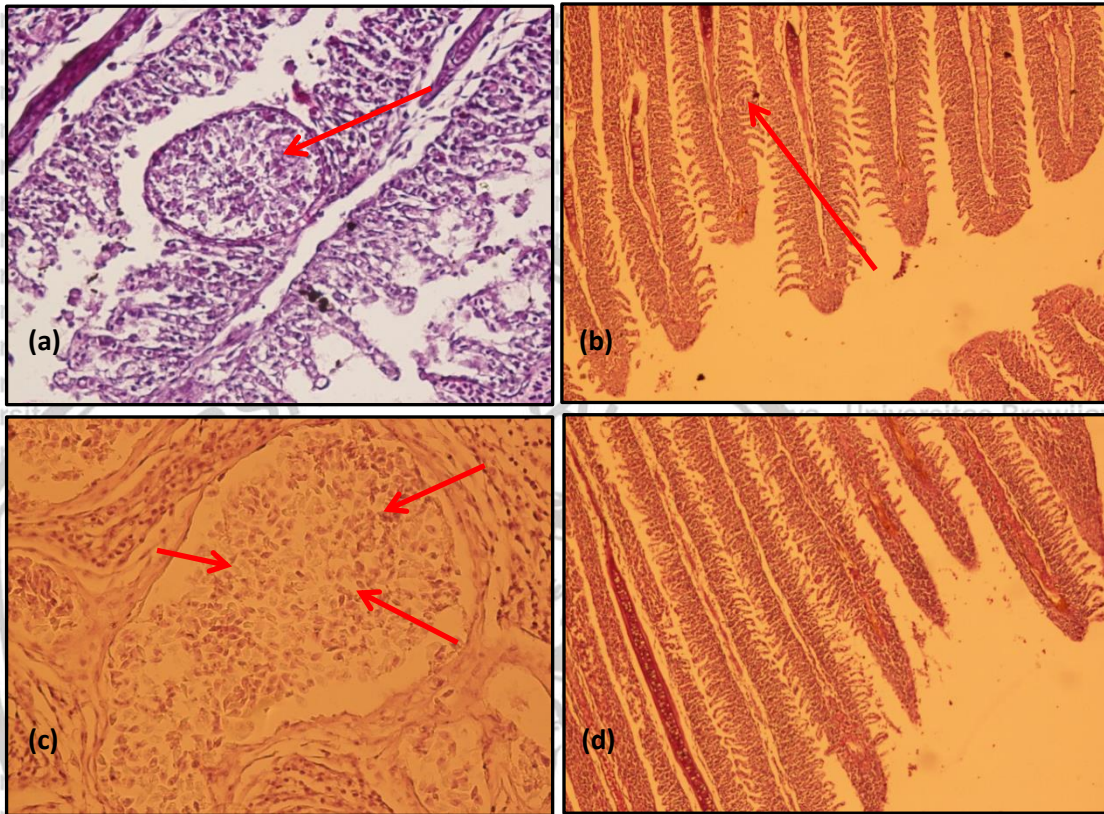
Kerusakan struktur pada insang ikan sangat berpengaruh terhadap pengaturan osmosis sehingga proses pernafasan dan osmoregulasi ikan terganggu.

Dari hasil pengamatan histologi didapatkan perubahan yang ditandai oleh hiperplasia tulang rawan lamella primer yang menyelimuti kista parasit dan adanya proses enkapsulasi yang mengelilingi kista oleh tulang rawan insang ikan yang terinfeksi (**Gambar 13a,c**). Menurut Sumuduni *et al.*, (2018) kista parasit di enkapsulasi dengan dinding yang tipis, homogen, dan non-seluler, yang dikelilingi oleh lapisan *chondroblast* atau *chondrocytes* yang berasal dari inang. Sel yang

berdekatan dengan parasit berbentuk rata sementara sel-sel di pinggiran mengalami hipertrofi, bagian lamella yang terinfeksi sangat sering terjadinya penyatuan dua lamella primer. Mayoritas kista dienkapsulasi secara terpisah dan hanya dalam beberapa kasus kapsul melampirkan menjadi satu, enkapsulasi dari kista di filamen insang dan lengkungan insang menyebabkan kerusakan parah dari arsitektur insang dan pengurangan permukaan pernapasan, yang mungkin menjelaskan tanda-tanda respirasi, seperti seringnya ikan yang terinfeksi mengambil udara dari permukaan air dan peningkatan laju pernapasan ikan. Kista parasit yang diamati terdapat berbagai lokasi filamen insang seperti bagian dasar, tengah dan apical dan sebagian besar ditemukan berdekatan dengan tulang rawan filamen insang dan pada lengkungan insang (**Gambar 13b**).

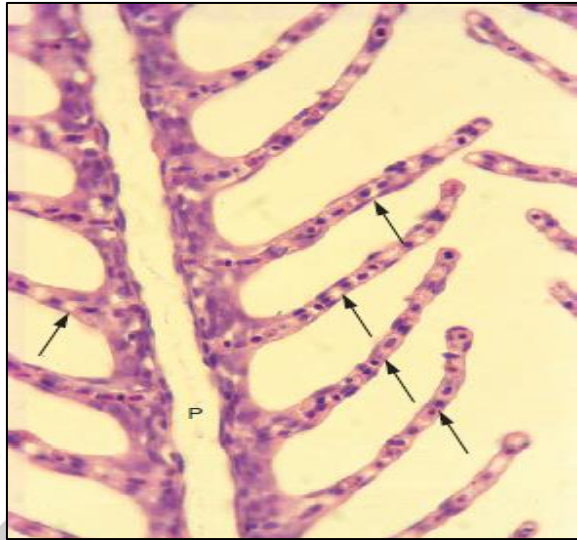
Reaksi histopatologi yang paling umum terjadi pada infeksi myxosoa adalah terbentuknya granulomata dengan tahap pembentukan enkapsulasi parasit oleh lapisan jaringan epitel yang saling berhubungan dengan tujuan mengisolasi parasit agar tidak tersebar ke seluruh jaringan. Proses enkapsulasi merupakan salah satu bentuk pertahanan inang terhadap parasit untuk kemudian dikeluarkan dari tubuh, namun beberapa parasit dapat bertahan hidup di dalam jaringan tubuh inang yang menyebabkan kematian. *Respiratory burst* pada fagosit memiliki peran penting pada inang untuk melawan infeksi parasite myxosoa, pada beberapa studi *in vitro* menunjukkan infeksi parasit myxosoa menyebabkan produksi *reactive oxygen spesies* (ROS) dan *reactive nitrogen spesies* yang berfungsi sebagai *cytotoxic effector molecules* untuk melawan pathogen. Pada beberapa myxosoa parasite memproduksi protease yang menyebabkan *lysis* pada bagian *cartilage* insang, sehingga inang akan melawan infeksi dengan memproduksi anti protease (Bobadilla,

2008 ; Bobadilla *et al.*, 2015). Hasil pengamatan histopatologi pada organ insang ikan koi ditampilkan pada **Gambar 13** berikut ini.



Gambar 13. Perubahan histopatologi yang diakibatkan *Myxobolus koi* pada insang (a) terdapat proses enkapsulasi pada kista parasit (x400) (b) Spora parasit *Myxobolus koi* yang menempel pada lamella insang (x40) (c) Spora parasit *Myxobolus koi* (x40) (d) insang koi yang tidak terinfeksi parasit (x40).

Menurut Maftuh *et al* (2018) *Myxobolus* sp. secara khusus menyerang insang di lengkungan dan filamen insang. Pertukaran gas terjadi di seluruh permukaan lamella sekunder (**Gambar 14**), sehingga kerusakan pada lamella insang akan mengganggu keseluruhan fungsi fisiologis tubuh ikan (Gjurčević *et al.*, 2007 ; Robert, R.J., 2012).

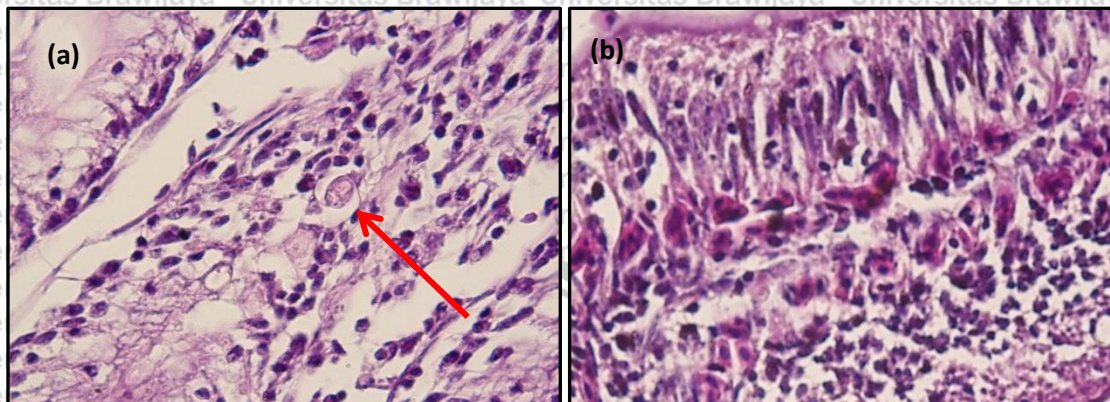


Gambar 14. Bagian lamella insang (P) lamella primer dan lamella sekunder ditunjukkan dengan tanda panah (x50) (Robert, R.J., 2012)

Gangguan fungsi respirasi yang diakibatkan nekrosis di insang dapat menyebabkan kematian pada ikan, perubahan histopatologis dasar pada insang ikan mas akibat myxobolus diantaranya adalah hiperplasia tulang rawan primer lamella yang membungkus kista, mengakibatkan hilangnya bagian permukaan alat pernafasan yang membuat daya serap oleh sel darah merah akan berkurang. (Kabata, 1985 ; Cengis, 2006 ; Nurekawati, 2016).

Dalam usus ikan normal, struktur jaringan usus bisa diwarnai seluruhnya, struktur vila, sel epitel mukosa, sel piala dan lamina propria masih terlihat dengan jelas (**Gambar 15b**). Namun pada usus ikan yang terinfeksi hanya ditemukan spora parasit tetapi tidak ditemukan proses enkapsulasi seperti yang terjadi pada insang (**Gambar 15a**), sehingga tidak terlihat dengan jelas adanya kerusakan jaringan pada usus. Perubahan morfologi pada dinding usus berhubungan dengan gangguan fungsional usus, pada usus yang terinfeksi yang menyebabkan lumen akan

mengerut dan dinding usus menebal Masoumian *et al.*, 1996. Hasil pengamatan histopatolgi pada organ usus ikan koi ditampilkan pada **Gambar 15**. berikut ini.



Gambar 15. Histologi usus ikan koi (a) kista *Myxobolus koi* pada usus ditunjukkan dengan tanda panah (x1000) (b) Struktur sel usus normal (x400).

Menurut Liu *et al.*, (2017) Perkembangan plasmodia spora parasit tidak sama namun menghasilkan kompresi mekanis yang signifikan dari jaringan yang berdekatan, biasanya akan menggelembung ke dalam lapisan lendir usus. Otot akan berbentuk melingkar yang jauh lebih tebal daripada jaringan yang tidak terpengaruh oleh parasit, sehingga diduga tidak ada respon pertahanan yang berbeda pada fokus infeksi.

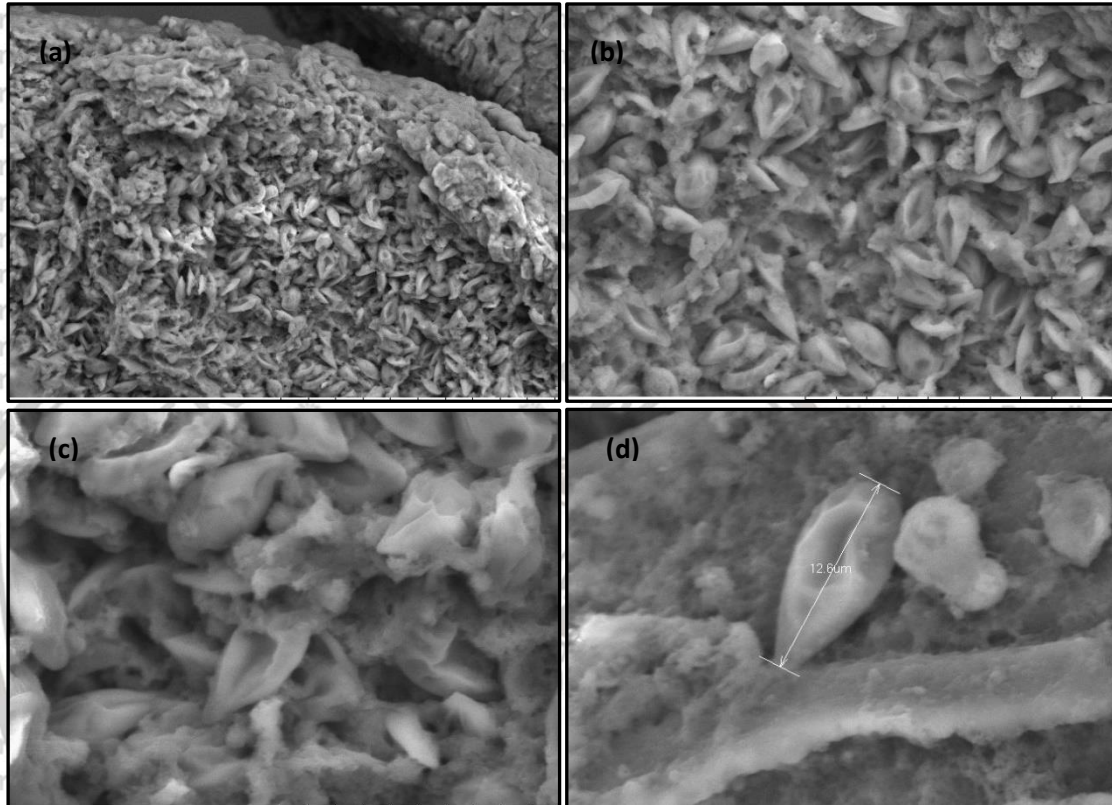
5.3. SEM (Scanning Electron Microscopy)

Hasil Penggunaan transmisi dan pemindaian mikroskop elektron dalam diagnosis memperlihatkan spora *Myxobolus* menutupi bagian lamella insang.

(**Gambar 16a**), spora *Myxobolus koi* berukuran panjang spora 12,6 μm dengan perbesaran 5000x. (**Gambar 16d**) Panjang spora berkisar antara 12-15 μm (Camus dan Griffith, 2010).

Kematian koi ini disebabkan oleh gangguan pernapasan, dihasilkan dari parasitisme masif insang oleh tipe myxobolid myxozoan dengan fitur morfologis paling sesuai dengan dengan *Myxobolus koi*. Hasil pengamatan

Scanning Electron Microscopy pada organ insang ikan koi ditampilkan pada **Gambar 16.** berikut ini.



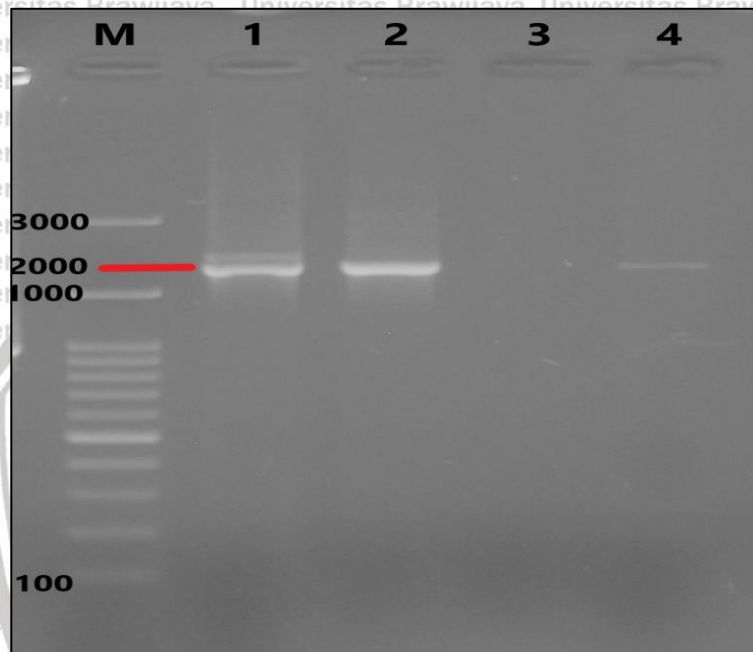
Gambar 16. Spora *Myxobolus koi* yang menginfeksi insang koi diamati dengan Scanning Electron Microscopy (a) spora dengan jumlah besar yang menempel pada insang koi dengan perbesaran x800 (scale bar = 100 μ m) (b) spora dengan perbesaran x1800 (scale bar = 50 μ m) (c) spora dengan perbesaran x4000 (scale bar = 20 μ m) (d) ukuran spora myxobolus 12.6 μ m dengan perbesaran x5000 (scale bar = 20 μ m)

5.4. Hasil Uji PCR *Myxobolus koi*

Organ Ikan koi diambil bagian usus dan insang untuk selanjutnya dilakukan pemeriksaan secara molekular dengan metode PCR konvensional pada ikan yang secara klinis terinfeksi dan tidak terinfeksi. DNA diekstraksi dengan menggunakan *Silica Extraction Kit* kemudian dilakukan proses amplifikasi dengan menggunakan

primer spesifik ERB1 (Forward) dan ERB10 (Reverse), dari hasil elektroforesis ikan yang secara klinis terinfeksi *Myxobolus koi* akan muncul pita (*band*) pada 2000 bp.

Hasil elektroforesis pada organ insang dan usus ikan koi ditampilkan pada **Gambar 17**. berikut ini.



Gambar 17. Hasil elektroforesis, target band parasit *Myxobolus* muncul pada 2000 bp Keterangan : M = Marker ; (1,2 ikan terinfeksi *Myxobolus*) (3,4 ikan sehat) 1 = Insang Ikan Koi positif terinfeksi *Myxobolus* ; 2 = Usus Ikan Koi positif terinfeksi *Myxobolus* ; 3 = Insang Ikan Koi yang negatif terinfeksi *Myxobolus* ; 4 = Usus Ikan Koi positif terinfeksi *Myxobolus*

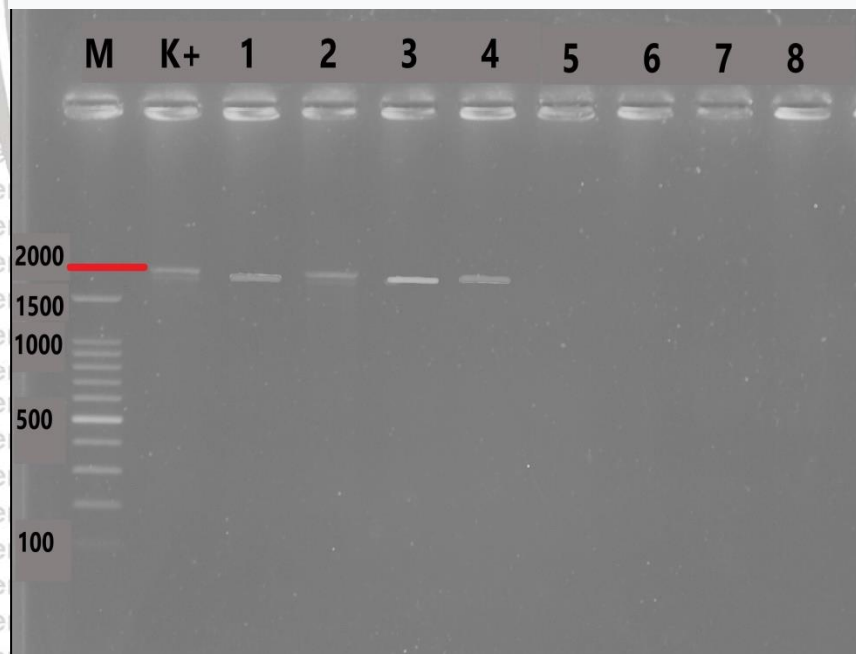
Dari uji PCR didapatkan pada ikan yang secara klinis terinfeksi *Myxobolus*

Gambar 17 (1,2) hasil elektroforesis menunjukkan band akan muncul di 2000 bp, namun pada ikan yang secara klinis terindikasi sehat (4) band tetap muncul meskipun tidak terlalu jelas (positif ringan). Hal ini membuktikan serangan parasit tidak selalu dimulai dengan adanya gejala klinis tertentu. Pengamatan parasit biasanya dilakukan secara mikroskopis namun sulit untuk mengidentifikasi tahap perkembangan myxospores dan juga pada tahap infeksi ringan. Pemeriksaan

berbasis DNA dengan teknik molekuler memiliki beberapa keunggulan dibandingkan observasi mikroskopis karena sangat spesifik dan sensitif sehingga dapat mendeteksi infeksi pada stadium awal dan infeksi yang sangat ringan (Jeon *et al.*, 2017).

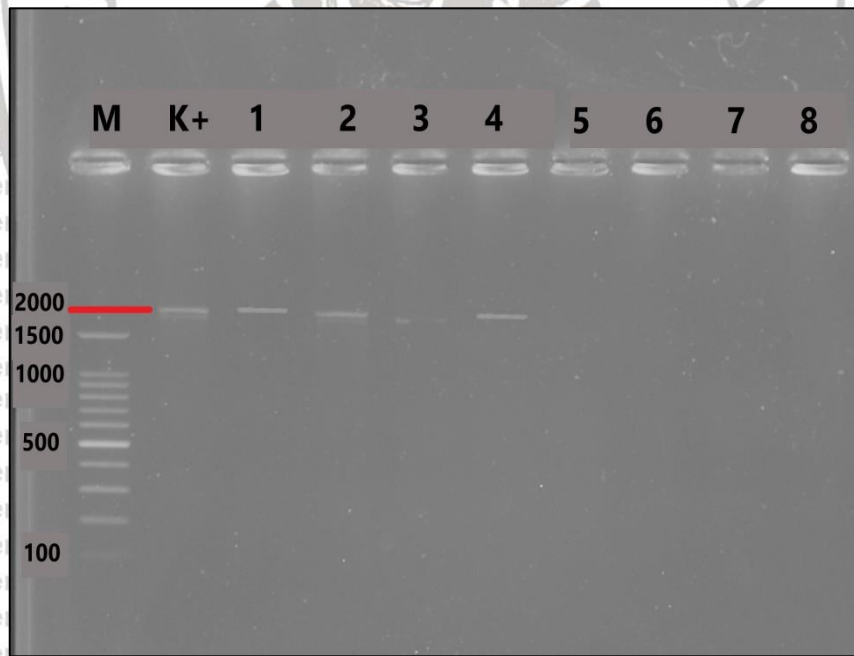
Hasil pemeriksaan pada organ insang menunjukkan bahwa sampel ikan dengan gejala klinis akan muncul pita (*band*) yang spesifik terhadap kontrol positifnya yaitu di 2000 bp. Ikan yang menunjukkan gejala klinis infeksi *Myxobolus* diperoleh pita pada 2000 bp atau sejajar dengan kontrol positifnya, namun pada sampel ikan yang secara klinis tidak terinfeksi *Myxobolus* ternyata juga muncul pita pada 2000 bp. Hasil elektroforesis pada organ insang ikan koi ditampilkan pada

Gambar 18. berikut ini.



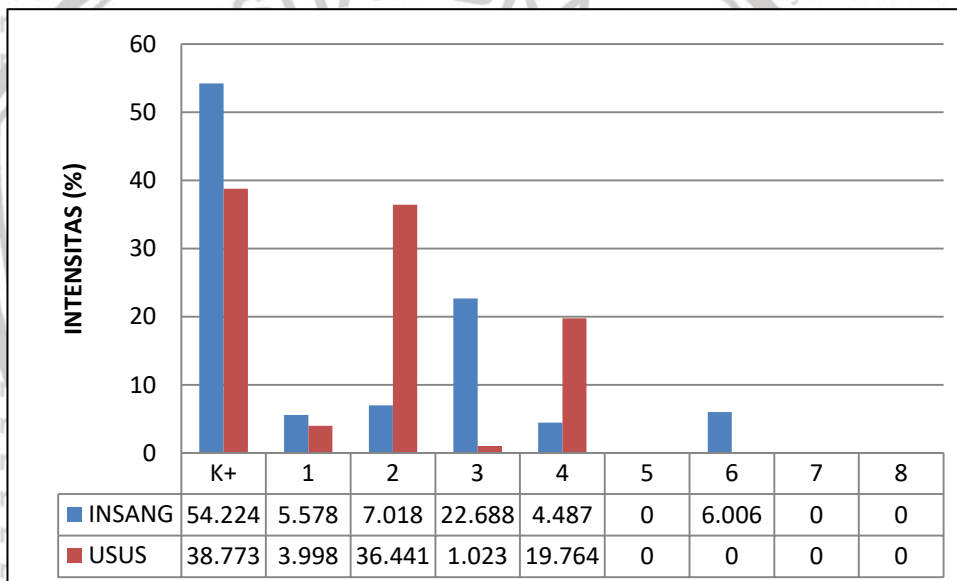
Gambar 18. Hasil Elektroforesis pada organ insang Keterangan : M = Marker (1500 bp) ; K+ = Kontrol Positif ; 1 – 4 = Sampel positif insang pada ikan yang secara klinis terinfeksi parasit ; 5 – 8 = Sampel negative

Hasil elektroforesis terhadap 8 ekor ikan koi di organ insang yaitu 4 ekor ikan secara klinis terinfeksi Myxobolus (kode sampel 1-4) dan secara klinis sehat (kode sampel 5-8). Hasil elektroforesis menunjukkan pada kode sampel 1-4 dan 6 muncul pada band pada 2000 bp. Sedangkan pada organ usus hasil elektroforesis hanya muncul pada kode sampel 1-4. Kemunculan band menunjukkan kandungan copy genom DNA parasit Myxobolus pada target organ sampel, sedangkan pada target organ yang tidak muncul pada hasil elektroforesis diduga karena target organ tidak memiliki kandungan genom DNA parasit myxobolus atau memiliki kandungan yang sangat kecil sehingga tidak dapat tervisualisasi dengan metode PCR konvensional. Hasil elektroforesis pada organ usus ikan koi ditampilkan pada **Gambar 19**. berikut ini.



Gambar 19. Hasil elektroforesis pada usus Keterangan : M = Marker (1500 bp) ; K+ = Kontrol Positif ; 1-4 = Sampel positif usus pada ikan yang secara klinis terinfeksi parasit ; 5-8 = Sampel negatif

Semiquantitatif PCR dianalisa dengan menggunakan software ImageJ versi 1.52A. Ikan dengan persentase intensitas tertinggi pada masing-masing organ terlihat pada kode sampel 2 dan 3. Kode sampel 2 pada bagian usus dengan intensitas 36,441 % dan kode sampel 3 pada bagian insang dengan intensitas 22,688 %. Dari hasil nilai intensitas persentase yang tertinggi dan terendah kemudian dilanjutkan dengan pengujian parameter respon molekuler TNF α , IL-1 β dan IL-6. Hasil uji PCR secara semiquantitatif pada organ insang dan usus ikan koi ditampilkan pada **Gambar 20**, berikut ini.



Gambar 20. Hasil semiquantitatif PCR organ insang dan usus pada ikan koi (*Cyprinus carpio*) ; ikan sehat kode sampel 1-4, ikan sakit kode sampel 5-8

5.5. Analisa Nukleotida Parasit *Myxobolus koi*

Kriteria utama dari klasifikasi Myxozoa pada awalnya adalah berdasarkan morfologi spora, namun karena memiliki keragaman pengelompokan taksonomi yang luas maka analisa nukleotida lebih efektif untuk dilakukan. Analisa nukleotida dilakukan untuk mengetahui materi genetik dari parasit, nukleotida merupakan bahan baku utama penyusun materi genetik tersusun atas basa nitrogen, gula

pentosa (keduanya disebut nukleosida) dan ester fosfat, terdapat empat jenis nukleotida utama yang menyusun DNA makhluk hidup yaitu : Adenin (A), Guanin (G), Timin (T) dan Sitosin (C) (Toha *et al.*, 2016). Setelah proses amplifikasi dilanjutkan proses sekuensing untuk mengetahui susunan DNA dari parasit, Sekuensing DNA merupakan proses atau teknik penentuan urutan basa nukleotida pada suatu segmen molekul DNA, merupakan informasi paling mendasar suatu gen atau genom karena mengandung instruksi yang dibutuhkan untuk pembentukan tubuh makhluk hidup. Sekuensing DNA selanjutnya dapat dimanfaatkan untuk menentukan identitas maupun fungsi gen atau fragmen DNA dengan cara membandingkan sekuens-nya dengan sekuens DNA lain yang sudah diketahui (Robert, 2012 ; Fiala *et al.*, 2015 ; Lokapirnasari *et al.*, 2017).

Hasil runutan nukleotida gen *Myxobolus* disesuaikan dengan database atau *library* yang tersimpan dalam genbank yaitu *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) melalui program BLAST, untuk mendapatkan persentase kesamaan dengan *data base*. Sisi homolog runutan nukleotida gen DNA dari spesies yang diperoleh dan hasil penelusuran melalui program BLAST selanjutnya disejajarkan (*multiple alligment*) dengan menggunakan *ClustalW*. Identifikasi spesimen dilakukan melalui konstruksi pohon kekerabatan dan persentase indeks kesamaan. Analisis penanda genetik, keragaman genetik, jarak genetik dari runutan nukleotida gen parsial DNA *myxobolus* dilakukan menggunakan program MEGA versi 6.06 (Tokamura *et al.*, 2013 ; Fahmi *et al.*, 2017).

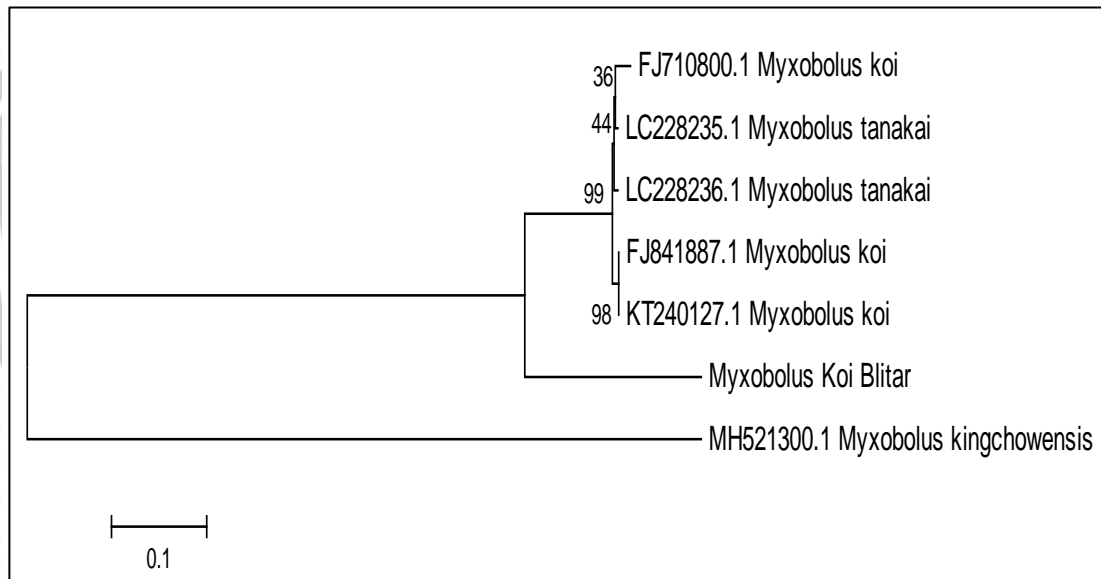
Hasil sequensing DNA parasit *Myxobolus koi* yang menginfeksi ikan koi (*Cyprinus carpio*) di Blitar memiliki kemiripan (*percent identity*) dari data Gen Bank dengan beberapa organisme. (**Tabel 5**). Kemiripan atau tingkat homologi dari sampel antara 95,99 – 99,37% dengan *E-value* 0,0, kemiripan tertinggi terjadi pada

kode sampel KT.240127.1 yaitu pada *Myxobolus koi* yang menginfeksi ikan Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) di Barat Daya China, kemiripan dikatakan tinggi apabila sekuen DNA memiliki nilai persen identity >70% dan *E-value* <10⁻⁴ (Claverie dan Notredame, 2003). Hasil BLAST sekuen *Myxobolus koi* dengan data GEN Bank dapat dilihat pada **Lampiran 2**.

Tabel 5. Percent Identity (%) sampel dibandingkan dengan Gen Bank

No	Kode Gen Bank	Organisme	Parasit	E-value	Percent Identity (%)	Sumber
1	KT.240127.1	Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	<i>Myxobolus koi</i>	0.0	99,37%	Fan, W. 2015
2	FJ841887.1	Koi (<i>Cyprinus carpio</i>)	<i>Myxobolus koi</i>	0.0	99,16%	Camus,A. C. and Griffin,M.J. 2010
3	LC228236.1	Common carp (<i>Cyprinus carpio</i>) dan Japanese silver crucian carp (<i>Carassius langsdorfii</i>)	<i>Myxobolus tanakai</i>	0.0	97,90%	Kato <i>et al.</i> , 2017
4	LC228235.1	Common carp (<i>Cyprinus carpio</i>) dan Japanese silver crucian carp (<i>Carassius langsdorfii</i>)	<i>Myxobolus tanakai</i>	0.0	97,48%	Kato <i>et al.</i> , 2017
5	FJ710800.1	Gibel carp (<i>Carassius auratus gibelio</i>)	<i>Myxobolus koi</i>	0.0	96,21%	Zhang <i>et al.</i> , 2010
6	MH.521300	<i>Carassius gibelio</i>	<i>Myxobolus kingchowsis</i>	0.0	95,99%	Wang, M. 2018

Analisis filogenetik dengan menggunakan program komputer ClustalW dengan *bootstrap* 1000 kali, terhadap susunan basa nukleotida utamanya sekuen sampel *Myxobolus koi* bertujuan untuk membandingkan hubungan kekerabatan antara sampel dengan isolat pembanding. Isolat *Myxobolus koi* dari GenBank dapat digunakan sebagai acuan atau referensi untuk analisa terkait dengan data *genomic* dari suatu isolat yang ada sehingga dapat diperkirakan kecepatan evolusi yang terjadi dan dapat direkonstruksi hubungan evolusi antara satu organisme dengan yang lain. Hasil analisa filogenetik dapat dilihat pada **Gambar 21** berikut ini.



Gambar 21. Pohon filogenetik sampel *Myxobolus koi* dibandingkan dengan isolat yang lain yang menggunakan metode *neighbor joining* dengan software Mega 6.06 (Tamura *et al.*, 2013) digunakan untuk membandingkan isolat parasit *Myxobolus koi* dari benih ikan koi (*Cyprinus carpio*) dengan 6 isolat pembanding (Tabel 5). Jarak genetik sampel *Myxobolus koi* dapat dilihat pada Tabel 6, Nilai jarak genetik ke 7 jenis *Myxobolus* berkisar antara 0,273 hingga 1,416. Nilai jarak tertinggi (1,416) terdapat pada *Myxobolus kingchowensis* kode sampel MH.521300, sedangkan terdekat (0,273)

pada sampel *Myxobolus koi* pada ikan koi (*Cyprinus carpio*) kode sampel FJ841887.1 dan *Myxobolus koi* pada ikan rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) kode sampel KT240127.1.

Tabel 6. Jarak genetik sampel *Myxobolus koi*

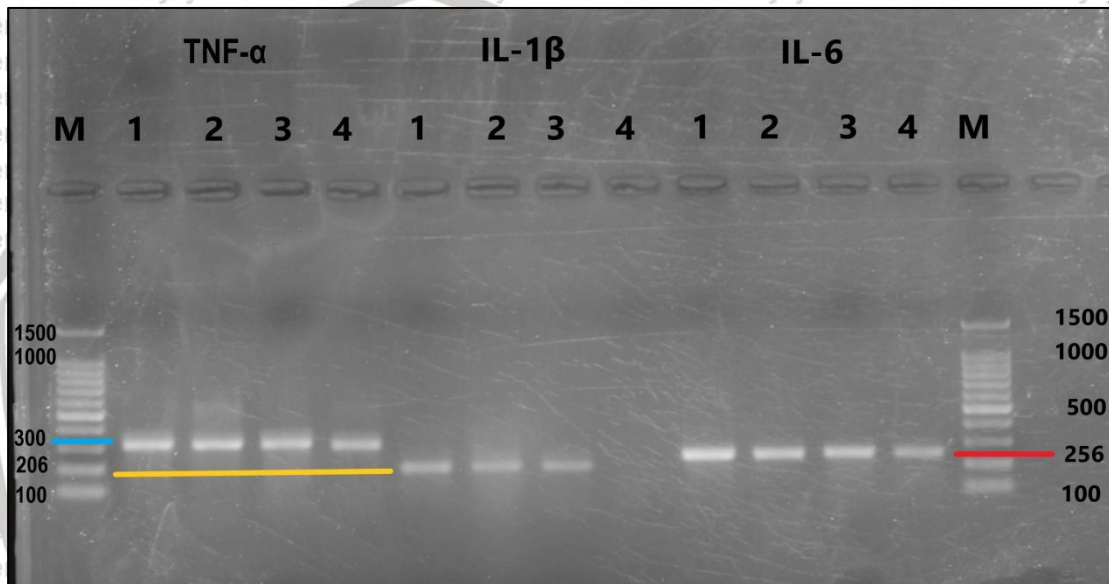
		Univer 1	Univer 2	Univer 3	Univer 4	Univer 5	Univer 6
1	Myxobolus Koi Blitar						
2	FJ710800.1 Myxobolus koi	0.302					
3	FJ841887.1 Myxobolus koi	0.273	0.024				
4	KT240127.1 Myxobolus koi	0.273	0.024	0.000			
5	LC228235.1 Myxobolus tanakai	0.291	0.018	0.012	0.012		
6	LC228236.1 Myxobolus tanakai	0.291	0.022	0.013	0.013	0.007	
7	MH521300.1 Myxobolus kingchowensis	1.416	1.335	1.340	1.340	1.323	1.319

5.6. Respon Molekuler

Respon molekuler diuji dengan metode PCR konvensional pada parameter TNF α , IL-1 β dan IL-6 di insang dan usus Ikan Koi (*Cyprinus carpio*). Sampel yang diuji adalah organ dengan persentase intensitas yang tertinggi dan terendah dari hasil pcr semiquantitatif Kode sampel 2 merupakan sampel positif Myxobolus pada usus, kode sampel 3 sampel positif Myxobolus pada insang dan kode sampel 8 merupakan sampel negative Myxobolus.

Sitokin TNF α , IL-1 β dan IL-6 adalah sitokin proinflamasi yang meningkat ketika terjadi reaksi inflamasi, disekresi oleh monocytes dan makrofag untuk merespon infeksi parasit, bakteri dan virus (Chistiakov *et al.*, 2007 ; Gonzalez *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2007). Pada **Gambar 22** hasil elektroforesis menunjukkan pada organ insang dan usus di ikan yang positif dan negative Myxobolus, respon dari sitokin menunjukkan TNF α , IL-1 β dan IL-6 terekspresi pada masing-masing band, TNF α muncul pada 300 bp ; IL-1 β = 206 bp dan IL-6 = 256 bp. Menurut Bird *et al.*, 2005 dan Bo *et al.*, 2015) sitokin juga ditemukan pada jaringan ikan yang sehat

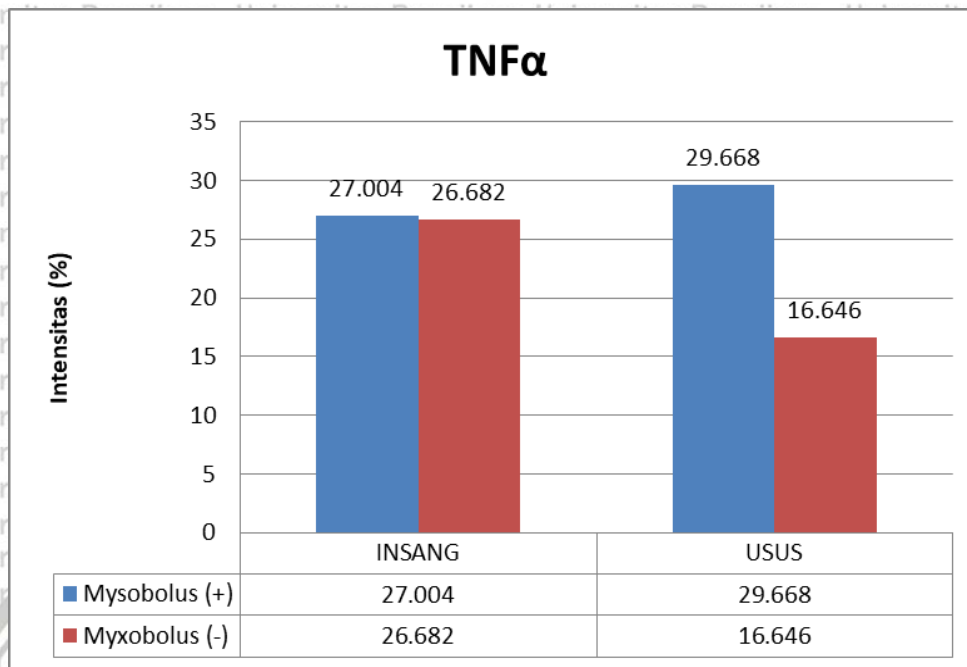
seperti pada jaringan otot, hati, kulit, sirip, jantung, ginjal, limpa, insang, saluran pencernaan dan otak, sehingga pada ikan yang negative Myxobolus sitokin TNF α , IL-1 β dan IL-6 juga terekspresi dalam persentase intensitas yang lebih kecil. Hasil elektroforesis sitokin TNF α , IL-1 β dan IL-6 pada organ insang dan usus ikan koi (*Cyprinus carpio*) ditampilkan pada **Gambar 22**. berikut ini.



Gambar 22. Hasil elektroforesis sitokin TNF α , IL-1 β dan IL-6 pada organ insang dan usus ikan koi (*Cyprinus carpio*) Keterangan : 1 = Insang positif Myxobolus ; 2 = Usus positif Myxobolus ; 3 = Insang negative Myxobolus ; 4 = Usus negative Myxobolus ; TNF α = 300 bp ; IL-1 β = 206 bp ; IL-6 = 256 bp

5.6.1. TNF- α

Optimasi suhu dilakukan untuk memperoleh suhu annealing terbaik, dari 4 gradien suhu diperoleh suhu terbaik sebesar 53,8°C kemudian dilanjutkan tahap amplifikasi dan elektroforesis, hasil elektroforesis ekspresi TNF- α muncul pada pita di 300 bp (**Gambar 22**). Hasil perbandingan intensitas (%) semiquantitatif PCR sitokin TNF- α pada organ insang dan usus ikan koi ditampilkan pada **Gambar 23** berikut ini.



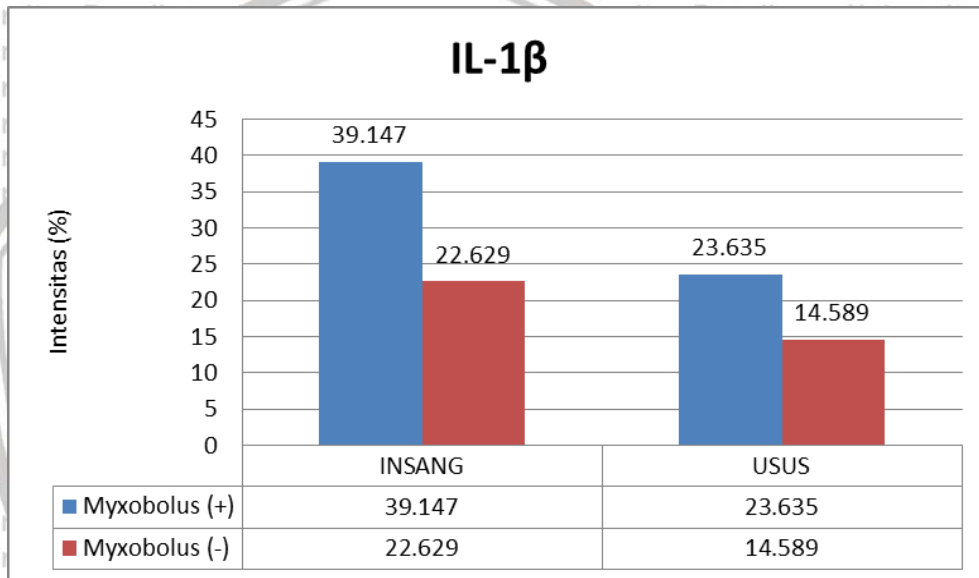
Gambar 23. Perbandingan intensitas (%) semiquantitatif PCR sitokin TNF α pada organ insang dan usus ikan koi.

Hasil uji pcr secara semikuantitatif pada ikan koi menunjukkan terdapat perbedaan intensitas (%) antara ikan koi yang terinfeksi dan yang tidak (**Gambar 23**). Ikan yang terinfeksi memiliki intensitas TNF α yang lebih tinggi dibandingkan dengan ikan sehat, insang pada ikan sehat memiliki intensitas TNF- α 26,682 % dan pada ikan terinfeksi 27,004 % pada usus ikan sehat memiliki intensitas TNF- α 29,668 % dan pada usus ikan yang terinfeksi 16,646 %.

TNF- α memainkan peran sentral dalam respon inflamasi sitokin penginduksi kuat dari beberapa tanda respons jalur inflamasi (Grayifera *et al.*, 2008, Kadowaki *et al.*, 2009). Sitokin TNF- α diproduksi oleh beberapa sel diantaranya makrofag, monosit, polimorfonuklear leukosit, sel mast dan sel otot polos, sehingga akan meningkat ketika terjadi proses inflamasi dan terjadi tanggapan seluler terhadap fagositosis, kemotaksis dan produksi oksigen reaktif dan nitrogen (Xiaojing, 2001).

5.6.2. IL-1 β

Optimasi suhu dilakukan untuk memperoleh suhu annealing terbaik, dari 4 gradien suhu diperoleh suhu terbaik sebesar 51,9°C kemudian dilanjutkan tahap amplifikasi dan elektroforesis, hasil elektroforesis ekspresi TNF- α muncul pada band 206 bp (**Gambar 22**). Hasil perbandingan intensitas (%) semiquantitatif PCR sitokin IL-1 β pada organ insang dan usus ikan koi ditampilkan pada **Gambar 24** berikut ini.



Gambar 24. Perbandingan intensitas (%) semiquantitatif PCR sitokin IL-1 β pada organ insang dan usus ikan koi.

Hasil uji pcr secara semikuantitatif pada ikan koi menunjukkan terdapat perbedaan intensitas (%) antara ikan koi yang terinfeksi dan yang tidak (**Gambar 24**). Ikan yang terinfeksi memiliki intensitas IL-1 β yang lebih tinggi dibandingkan dengan ikan sehat, insang pada ikan sehat memiliki intensitas IL-1 β 22,629 % dan pada ikan terinfeksi 39,147 % pada usus ikan sehat memiliki intensitas IL-1 β 14,589 % dan pada usus ikan yang terinfeksi 23,635 %. Pada ikan sehat intensitas IL-1 β terekspresi pada organ insang dan usus Menurut Bo *et al.*, (2015). IL-1 β

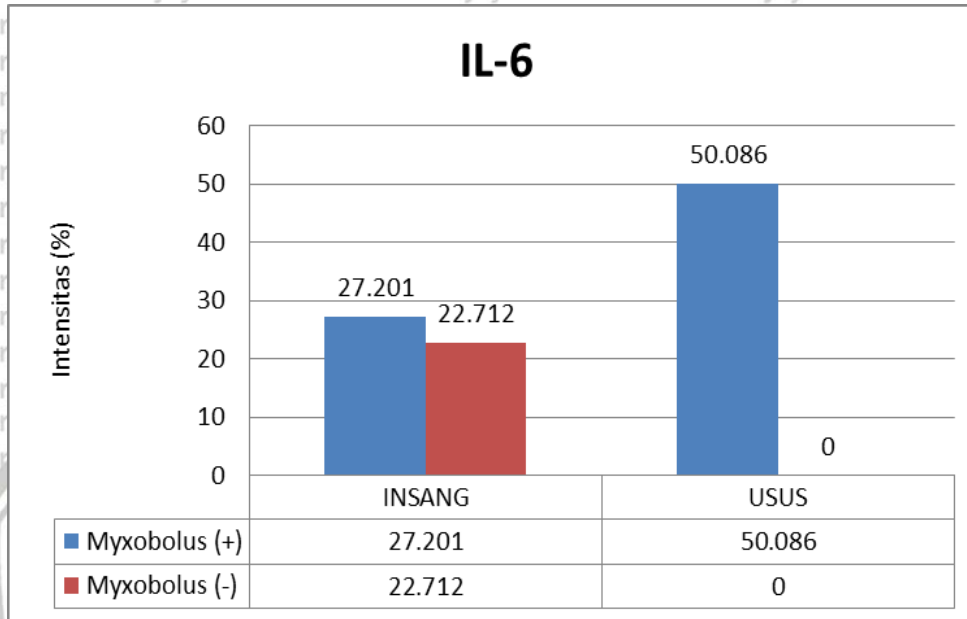
terekspresi pada berbagai tingkat di jaringan ikan yang sehat, termasuk otot, hati, usus, kulit, sirip, jantung, otak, ginjal insang, dan limpa.

IL-1 β memiliki fungsi fisiologis yang beragam dan perannya dalam mengatur proses inflamasi pada ikan sehingga pada organ yang terinfeksi akan memiliki intensitas yang lebih tinggi dibandingkan ikan sehat. IL-1 β merupakan sitokin yang bersifat pro inflamasi sehingga intensitas akan meningkat ketika terdapat proses inflamasi (Zou *et al.*, 2016). IL-1 β sitokin yang diproduksi dan disekresikan oleh berbagai jenis sel namun kebanyakan diproduksi dalam sel sistem kekebalan tubuh bawaan (*innate*), seperti monosit dan makrofag sehingga penting pada proses respon imun inang terhadap infeksi dan cedera (Faliek *et al.*, 2008 ; Castejon, G.L dan David Brough, 2011). Sitokin IL-1 β telah digambarkan sebagai salah satu mediator yang paling penting dan paling cepat pada proses inflamasi di ikan mas (Tanekhy *et al.*, 2009).

5.6.3. IL-6

Optimasi suhu dilakukan untuk memperoleh suhu annealing terbaik, dari 4 gradien suhu diperoleh suhu terbaik sebesar 52,7°C kemudian dilanjutkan tahap amplifikasi, hasil elektroforesis ekspresi IL-6 muncul pada band 256 bp (**Gambar 22**). Hasil perbandingan intensitas (%) semiquantitatif PCR sitokin IL-6 pada organ insang dan usus ikan koi ditampilkan pada **Gambar 24** berikut ini. Hasil uji pcr secara semikuantitatif pada ikan koi menunjukkan terdapat perbedaan intensitas (%) antara ikan koi yang terinfeksi dan yang tidak (**Gambar 25**). Ikan yang terinfeksi memiliki intensitas IL-6 yang lebih tinggi dibandingkan dengan ikan sehat, insang pada ikan sehat memiliki intensitas IL-6 22,712 % dan

pada ikan terinfeksi 27,201 %, pada usus ikan sehat intensitas IL-6 tidak terekspressi dan usus ikan yang terinfeksi 50.086%.



Gambar 25. Perbandingan intensitas (%) semiquantitatif PCR sitokin IL-6 pada organ insang dan usus ikan koi.

Menurut Iliev *et al.*, (2007) IL-6 memiliki banyak fungsi antara lain kontrol produksi imunoglobulin, diferensiasi limfosit dan monosit, sekresi kemokin dan migrasi leukosit menuju tempat inflamasi, sehingga akan memiliki persentase intensitas yang lebih tinggi dibandingkan ikan yang terinfeksi. Sedangkan di ikan sehat IL-6 juga terekspressi karena IL-6 juga terdeteksi di limpa, insang, saluran pencernaan dan otak pada ikan yang sehat (Bird *et al.*, 2005).

5.7. Analisa Nukleotida Sitokin

5.7.1. TNF- α

Mengacu pada hasil sekuensing setelah dilakukan BLAST kemudian dibandingkan hasil runutan nukleotida gen TNF- α yang disesuaikan dengan database atau *library* yang tersimpan dalam genbank NCBI diperoleh hasil untuk

isolat TNF- α insang koi identik dengan urutan nukleotida dari GenBank untuk genom KJ923252.1 (isolat dari China). Dengan percent identity 75% dan e-value 0,16 dengan ikan Crucian Carp (*Carrasius carrasius*) dapat dilihat pada **Tabel 7**, sedangkan pada organ usus ikan koi identik dengan genom JX181982.1 (Isolat dari China) dan AJ311800.2 (Isolat dari Eropa). Dengan percent identity 85,19% dan e value 4e-04 dengan ikan Common Carp (*Cyprinus carpio*) dapat dilihat pada **Tabel 8**.

Tabel 7. Percent Identity (%) sitokin TNF- α pada insang Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) dibandingkan dengan Gen Bank

No	Kode Gen Bank	Organisme	Sitokin	E-value	Percent Identity (%)	Sumber
1	KJ923252.1	Crucian carp (<i>Carassius carassius</i>)	TNF- α 1	0,16	75	Athanas,R. and Xue,L, 2014

Tabel 8. Percent Identity (%) sitokin TNF- α pada usus Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) dibandingkan dengan Gen Bank

No	Kode Gen Bank	Organisme	Sitokin	E-value	Percent Identity (%)	Sumber
1	KJ923252.1	Crucian carp (<i>Carassius carassius</i>)	TNF- α 1	5e-60	79,15	Athanas,R. dan Xue,L, 2014
2	KJ923253.1	Crucian carp (<i>Carassius carassius</i>)	TNF- α 2	1e-41	75,71	Athanas,R. dan Xue,L, 2014
3	JX181982.1	common carp <i>Cyprinus carpio</i>	TNF- α 4	4e-04	85,19	Zhao et al., 2012
4	AJ311800.2	<i>Cyprinus carpio</i>	TNF- α	4e-04	85,19	Saeij et al., 2003

TNF- α adalah salah satu sitokin yang diproduksi utama dengan aktifasi makrofag, selain itu Natural killer cells, neutrophils, mast cells, eosinophils, neurons

Carassius carassius tumor necrosis factor alpha 1 (TNFalpha1) gene, complete cds
 Sequence ID: [KJ923252.1](#) Length: 1723 Number of Matches: 1

Range 1: 155 to 242 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
48.2 bits(52)	0.16	66/88(75%)	11/88(12%)	Plus/Plus

```

Query 7  GCTGTCTGCTTTGTGCTCTGCA--GGTGA--ACCCA---CATGCACGT---GCATGTCAT 56
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 155 GCTGTCTGCTTACGCTCAACAAGGTGACAAACCAAGCCATGCACATCATGCATGTGAT 214

Query 57  TGTAATATGCCATTTTCAGGTCATATTT 83
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 215 TGTAATATGCCATTTTCAGGTCATATTT 242
    
```

Gambar 26. Hasil Blast dan Alligment TNF- α insang ikan koi dengan data Gen Bank

Cyprinus carpio tumor necrosis factor alpha4 (TNFalpha4) mRNA, complete cds
 Sequence ID: [JX181982.1](#) Length: 1318 Number of Matches: 2

Range 1: 331 to 384 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
58.1 bits(63)	4e-04	46/54(85%)	5/54(9%)	Plus/Plus

```

Query 248  CGCTGAG-CTCACAT---AGAAAAATCTTTCAAATCAAATGTCACTTCCAAGG 296
           ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 331  CGCTGAGGCTCACATTAAGAGATCATCTTTCAAAGCAAATGTCACTTCCAAGG 384
    
```

Range 2: 301 to 328 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
51.8 bits(56)	0.016	28/28(100%)	0/28(0%)	Plus/Plus

```

Query 128  AGTCTCAGAACAATCAGGAAGGCGGAAA 155
           ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 301  AGTCTCAGAACAATCAGGAAGGCGGAAA 328
    
```

Cyprinus carpio partial mRNA for tumour necrosis factor alpha one (TNF-alpha gene)
 Sequence ID: [AJ311800.2](#) Length: 1335 Number of Matches: 2

Range 1: 331 to 384 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
58.1 bits(63)	4e-04	46/54(85%)	5/54(9%)	Plus/Plus

```

Query 248  CGCTGAG-CTCACAT---AGAAAAATCTTTCAAATCAAATGTCACTTCCAAGG 296
           ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 331  CGCTGAGGCTCACATTAAGAGATCATCTTTCAAAGCAAATGTCACTTCCAAGG 384
    
```

Range 2: 301 to 328 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
51.8 bits(56)	0.016	28/28(100%)	0/28(0%)	Plus/Plus

```

Query 128  AGTCTCAGAACAATCAGGAAGGCGGAAA 155
           ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 301  AGTCTCAGAACAATCAGGAAGGCGGAAA 328
    
```

Gambar 27. Hasil Blast dan Alligment TNF- α usus ikan koi dengan data Gen Bank

dan CD4+ lymphocytes (Patel, H dan V. H. Patel, 2015). Sitokin ini secara kritis merangsang sel survival, apoptosis dan nekrosis, berkontribusi pada proses fisiologis dan patologis yang bersifat proinflamasi dan antiinflamasi. Sel utama yang

memproduksi TNF- α adalah monosit dan makrofag dengan produksi tambahan dari limposit B dan T, sel Natural Killer, polimorphonuclear leukosit, eosinophil untuk merespon racun dari bakteri dan stimulus invasive lainnya (Ma, 2001).

Sitokin proinflamasi yang dilepaskan oleh beberapa sel imun selama infeksi dan kerusakan jaringan pada beberapa tingkat inflamasi dan pada kondisi yang berat.

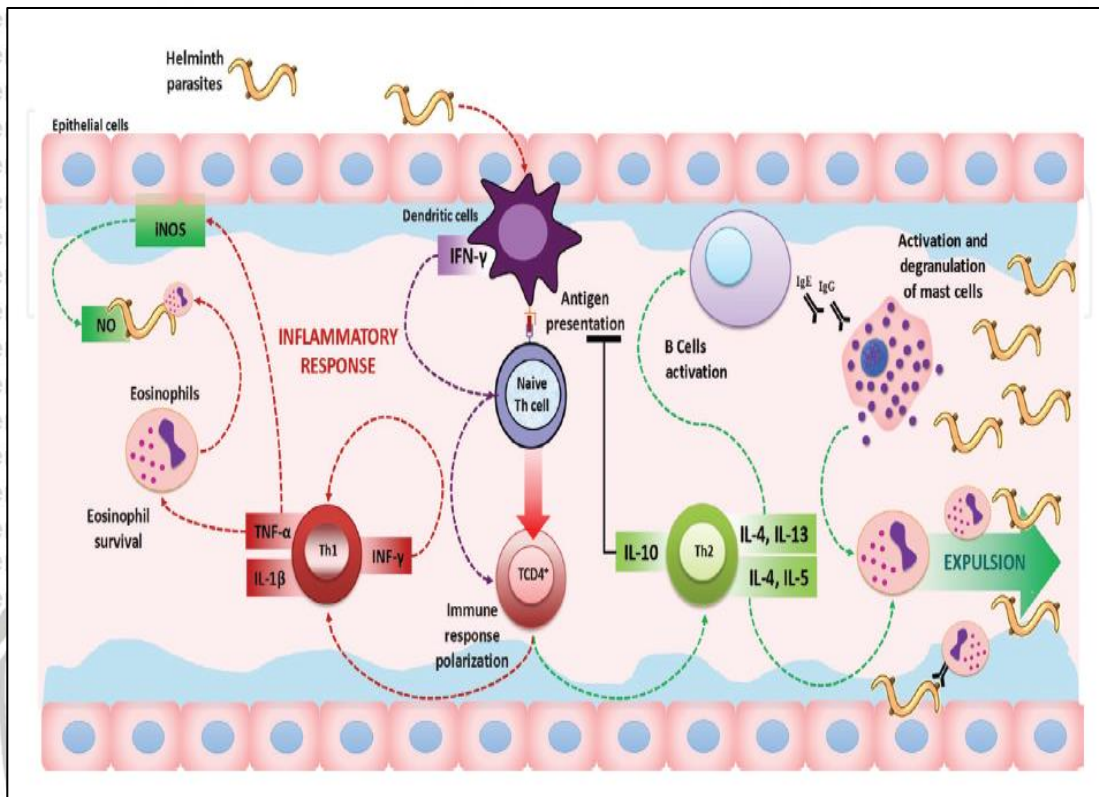
TNF- α memiliki 2 bentuk yaitu terikat dalam membran dan dalam bentuk larutan sesuai dengan kondisi fisiologi yang berbeda (Roca *et al.*, 2008). Respon imun

untuk melawan parasit awalnya dirangsang oleh tipe respon imun Th1 dan Th2, hasil penggabungan keduanya (TH1 dan Th2) akan tergantung oleh sel CD4+ dan sel T.

yang merupakan pembentukan lingkungan sitokin ketika adanya infeksi parasit sehingga akan menekan respon inflamasi untuk mengeliminasi infeksi parasit.

PAMPs yang berasal dari parasit akan merangsang aktivasi dan maturasi sel dendrit, mengenalkan pembentukan sel imun Th1 dengan hasil yang signifikan pada

peningkatan sitokin (Il-12, IFN γ , Il-1 β dan TNF- α). Mekanisme sekresi TNF- α ditampilkan pada **Gambar 28** berikut ini.



Gambar 28. Mekanisme sekresi TNF α (Carillo *et al.*, 2018)

5.7.2. IL-1 β

Berdasarkan hasil sekuensing setelah dilakukan BLAST kemudian dibandingkan hasil runutan nukleotida gen IL-1 β yang disesuaikan dengan database atau library yang tersimpan dalam genbank NCBI diperoleh hasil untuk isolat IL-1 β insang koi identik dengan urutan nukleotida dari GenBank untuk genom AJ245635.1, XM_019080073.1, AB010701.1 dan KC008576.1 dapat dilihat pada Tabel 9, sedangkan pada organ usus identik dengan genom AJ245635.1, AJ419849.1, KC008576.1 dan AJ419848.1 dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 9. Percent Identity (%) sitokin IL-1 β pada insang Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) dibandingkan dengan Gen Bank

No	Kode Gen Bank	Organisme	Sitokin	E-value	Percent Identity (%)	Sumber
1	AJ245635.1	<i>Cyprinus carpio</i>	IL-1 β	1e-73	92,72	Engelsma <i>et al.</i> , 2001
2	XM_019080073.1	<i>Cyprinus carpio</i>	IL-1 β	2e-31	95,70	Ncbi
3	KC008576.1	<i>Cyprinus carpio</i>	IL-1 β	2e-31	95,70	Feng <i>et al.</i> , 2012
4	AB010701.1	<i>Cyprinus carpio</i>	IL-1 β	2e-31	95,70	Fujiki <i>et al.</i> , 2000

Tabel 10. Percent Identity (%) sitokin IL-1 β pada usus Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) dibandingkan dengan Gen Bank

No	Kode Gen Bank	Organisme	Sitokin	E-value	Percent Identity (%)	Sumber
1	AJ245635.1	<i>Cyprinus carpio</i>	IL-1 β	2e-55	83,98	Engelsma <i>et al.</i> , 2001
2	AJ419849.1	<i>Carassius auratus</i>	IL-1 β 2	1e-44	80,10	Wang <i>et al.</i> , 2001
3	AJ419848.1	<i>Carassius auratus</i>	IL-1 β	5e-19	75,17	Wang <i>et al.</i> , 2001
4	KC008576.1	<i>Cyprinus carpio</i>	IL-1 β	2e-18	83,87	Feng <i>et al.</i> , 2012

IL-1 β merupakan sitokin yang bersifat proinflamasi yang penting pada system respon pertahanan inang pada infeksi dan luka, IL-1 β diproduksi tingkat tipe sel yang luas setelah aktivasi pattern recognition receptors (PRRs) inang oleh pathogen associated molecular patterns (PAMPs) atau danger associated molecular patterns (DAMPs). IL-1 β di sintesis sebagai signal peptide awal yang diperlukan pada proses pelepasan protein aktif, signal ini terbagi menjadi intracellular or extracellular (Chuang *et al.*, 2011 ; Weber *et al.*, 2010 ; Secombes *et al.*, 2011 ; Zou, J dan Secombes C J., 2016).

Cyprinus carpio IL-1 gene for interleukin-1-beta
 Sequence ID: [AJ245635.1](#) Length: 2455 Number of Matches: 1

Range 1: 1564 to 1769 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
293 bits(324)	2e-75	190/206(92%)	12/206(5%)	Plus/Plus

```

Query 2      CTGGAGCAATGCAATACAAAGGTAGATTTTAA-----AAGCTTTTGCATCTTA-TGCAT 54
Sbjct 1564   CTGGAGCAATGCAATACAAAGGTAATTTTATAACACAAGCTTTCCATCTTAATGCAT 1623

Query 55     GACTTCCGAAATGTCCTTTTGACG-TTCCCCCTACACATTTACGTTTCTTTCAGTTCAA 113
Sbjct 1624   GACTTCCGAAATGTCCTTTTGACGGTCCCCCTACACATTTATGTTTCTTTCAGTTCAA 1683

Query 114    TTCAGTATGTCAACATTCTGTGTCGAGTGCAACACAAAAGGAAGCACAGCC----TGGCTG 169
Sbjct 1684   TTCAGTATGTCAACATTCTGTGTCGAGTGCAACACAAAAGGAAGCACAGCCTGTGTGCTG 1743

Query 170    GGAATTTCCAACAGCAACCTCTACCT 195
Sbjct 1744   GGAATTTCCAACAGCAACCTCTACCT 1769
    
```

PREDICTED: Cyprinus carpio interleukin-1 beta-like (LOC109062992), mRNA
 Sequence ID: [XM_019080073.1](#) Length: 1232 Number of Matches: 1

Range 1: 591 to 683 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
145 bits(160)	6e-31	88/93(95%)	4/93(4%)	Plus/Plus

```

Query 107    AGTTCAATTTCAGTATGTCAACATTCTGTGTCGAGTGCAACACAAAAGGAAGCACAGCC--- 163
Sbjct 591    AGTTCAATTTCAGTATGTCAACATTCTGTGTCGAGTGCAACACAAAAGGAAGCACAGCCTGT 650

Query 164    -TGGCTGGGAATTTCCAACAGCAACCTCTACCT 195
Sbjct 651    GTGCCTGGGAATTTCCAACAGCAACCTCTACCT 683
    
```

Cyprinus carpio interleukin-1 beta mRNA, complete cds
 Sequence ID: [KC008576.1](#) Length: 1213 Number of Matches: 1

Range 1: 524 to 616 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
145 bits(160)	6e-31	88/93(95%)	4/93(4%)	Plus/Plus

```

Query 107    AGTTCAATTTCAGTATGTCAACATTCTGTGTCGAGTGCAACACAAAAGGAAGCACAGCC--- 163
Sbjct 524    AGTTCAATTTCAGTATGTCAACATTCTGTGTCGAGTGCAACACAAAAGGAAGCACAGCCTGT 583

Query 164    -TGGCTGGGAATTTCCAACAGCAACCTCTACCT 195
Sbjct 584    GTGCCTGGGAATTTCCAACAGCAACCTCTACCT 616
    
```

Cyprinus carpio mRNA for interleukin-1 beta, complete cds
 Sequence ID: [AB010701.1](#) Length: 1213 Number of Matches: 1

Range 1: 524 to 616 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
145 bits(160)	6e-31	88/93(95%)	4/93(4%)	Plus/Plus

```

Query 107    AGTTCAATTTCAGTATGTCAACATTCTGTGTCGAGTGCAACACAAAAGGAAGCACAGCC--- 163
Sbjct 524    AGTTCAATTTCAGTATGTCAACATTCTGTGTCGAGTGCAACACAAAAGGAAGCACAGCCTGT 583

Query 164    -TGGCTGGGAATTTCCAACAGCAACCTCTACCT 195
Sbjct 584    GTGCCTGGGAATTTCCAACAGCAACCTCTACCT 616
    
```

Gambar 29. Hasil Blast dan Alligment IL-1β insang ikan koi dengan data Gen Bank

Cyprinus carpio IL-1 gene for interleukin-1-beta
 Sequence ID: [AJ245635.1](#) Length: 2455 Number of Matches: 1

Range 1: 1564 to 1769 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
226 bits(250)	2e-55	173/206(84%)	28/206(13%)	Plus/Plus
Query 2	CTGGAGCAATGCAATACAAAGGTAG-----TA-----CTTTTGCATCTTA-TGCAT	46		
Sbjct 1564	CTGGAGCAATGCAATACAAAGGTAATTTTTATAACACAAGCTTTTCCATCTTAATGCAAT	1623		
Query 47	GACTTCCGAAATGTCCTTTTGACGGTTCCCCCTACACATTTTACGTTTCTTCAGTTCAA	106		
Sbjct 1624	GACTTCCGAAATGTCCTTTTGACGGTTCCCCCTACACATTTTATGTTTCTTCAGTTCAA	1683		
Query 107	TTCAAGTATGTCAACATTCGTGTCGAGTGCACACAAAAA-GAAGC-----CACG	153		
Sbjct 1684	TTCAAGTATGTCAACATTCGTGTCGAGTGCACACAAAAAAGGAGCAGCCTGTGTGCCTG	1743		
Query 154	GGAAATTTCCAACAGCAACCTCTACCT	179		
Sbjct 1744	GGAAATTTCCAACAGCAACCTCTACCT	1769		

Carassius auratus il-1b-1 gene for interleukin-1 beta-1, exons 1-7
 Sequence ID: [AJ419848.1](#) Length: 5860 Number of Matches: 1

Range 1: 3534 to 3682 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
105 bits(116)	5e-19	112/149(75%)	13/149(8%)	Plus/Plus
Query 42	TGCATGACTTCCGAAATGTCCTTTTGACGGTTCCCCCTACACATTTTACGTTTCTTCAG	101		
Sbjct 3534	TGCATGACTTCCGAAATGTCCTTTTGACATTACCTCCTACACATTTTGTCTCTTCAG	3593		
Query 102	TTCAATTGATGTCACCAATTCGTGTCGAGTGCACACAAAAAAGAG--CCAC-----	152		
Sbjct 3594	TTCAATTGATGTCACCAATTCGTGTCGAGTGCACACAAAAAAGAGCCAGCCTGTGT	3653		
Query 153	----GGGAATTTCCAACAGCAACCTCTAC	177		
Sbjct 3654	GCCTGGCGATCTCCAACAGCAACCTCTAC	3682		

Carassius auratus il-1b-1 gene for interleukin-1 beta-1, exons 1-7
 Sequence ID: [AJ419848.1](#) Length: 5860 Number of Matches: 1

Range 1: 3534 to 3682 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
105 bits(116)	5e-19	112/149(75%)	13/149(8%)	Plus/Plus
Query 42	TGCATGACTTCCGAAATGTCCTTTTGACGGTTCCCCCTACACATTTTACGTTTCTTCAG	101		
Sbjct 3534	TGCATGACTTCCGAAATGTCCTTTTGACATTACCTCCTACACATTTTGTCTCTTCAG	3593		
Query 102	TTCAATTGATGTCACCAATTCGTGTCGAGTGCACACAAAAAAGAG--CCAC-----	152		
Sbjct 3594	TTCAATTGATGTCACCAATTCGTGTCGAGTGCACACAAAAAAGAGCCAGCCTGTGT	3653		
Query 153	----GGGAATTTCCAACAGCAACCTCTAC	177		
Sbjct 3654	GCCTGGCGATCTCCAACAGCAACCTCTAC	3682		

Cyprinus carpio interleukin-1 beta mRNA, complete cds
 Sequence ID: [KC008576.1](#) Length: 1213 Number of Matches: 1

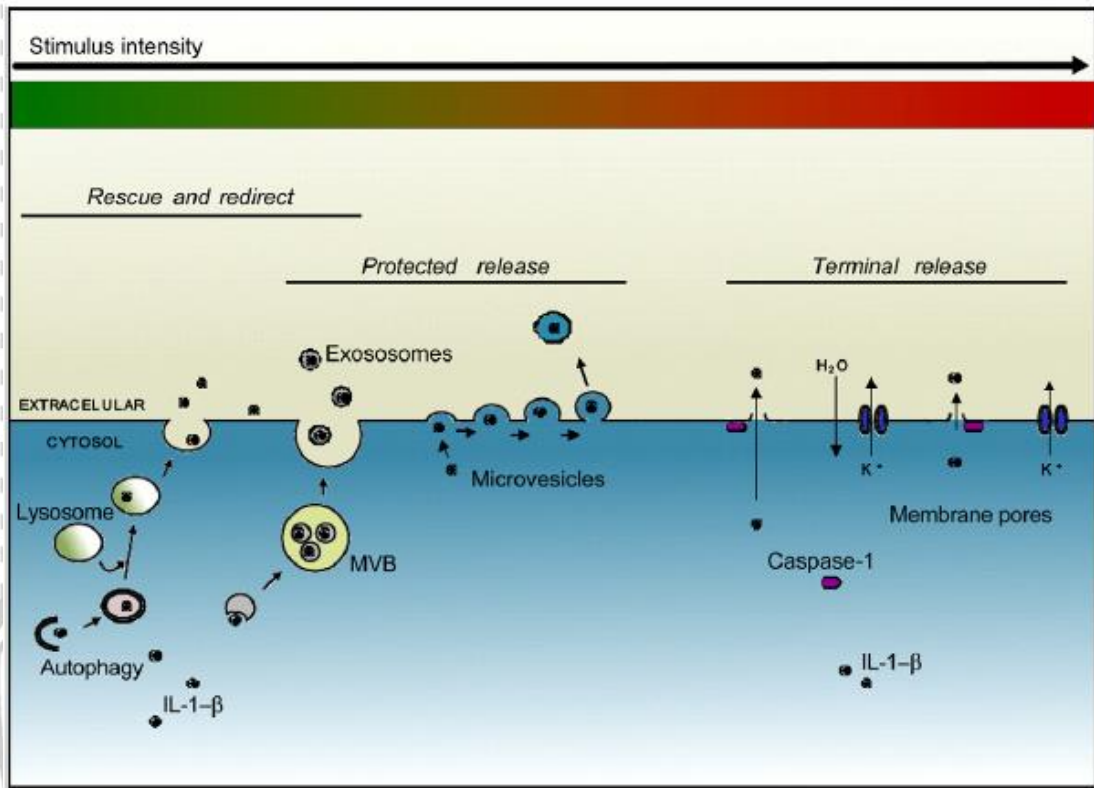
Range 1: 524 to 616 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
104 bits(114)	2e-18	78/93(84%)	13/93(13%)	Plus/Plus
Query 100	AGTTC AATT CAGTATGTCAACATTCGTGTCGAGTGCACACAAAAA-GAAGC-----	149		
Sbjct 524	AGTTC AATT CAGTATGTCAACATTCGTGTCGAGTGCACACAAAAAAGGAGCAGCCTGT	583		
Query 150	---CACGGGAATTTCCAACAGCAACCTCTACCT	179		
Sbjct 584	GTGCCTGGGAATTTCCAACAGCAACCTCTACCT	616		

Gambar 30. Hasil Blast dan Alligment IL-1 β usus ikan koi dengan data Gen Bank

IL-1 β dirilis sebagai respons terhadap PAMPs dan DAMPs yang dapat mengaktifkan variasi, yang dibentuk karena peradangan. mekanisme sekresi dapat dipengaruhi oleh tipe dan kekuatan stimulus dari inflamasi. beberapa rangsangan yang paling dikenal dan paling banyak digunakan yang mensekresi IL-1 β . ATP ekstraseluler yang bertindak melalui P2X7 reseptor menginduksi rilis tergantung-caspase-1 dari IL-1 β dan tergantung pada pembentukan inflammasom NLRP3, Inflammasom adalah platform pensinyalan kunci yang mendeteksi mikroorganisme patogen dan steril stressor, dan yang mengaktifkan sitokin pro-inflamasi yaitu IL-1 β (NLRP3 adalah reseptor pengenalan pola (PRR) famili NOD). Pada kondisi homeostatis, reseptor berada dalam bentuk tidak aktif karena terikat dengan HSP90 dan SGT1, *Inflammasome* NLRP3 mampu memecah IL-1 β inaktif menjadi bentuk aktifnya. Sehingga produk utama dari inflammasome NLRP3 adalah IL-1 β aktif. (Castejon,G.L and David Brough. 2011 ; Latz *et al.*, 2013).

Menurut Castejon,G.L dan David Brough (2011) terdapat 3 kategori mekanisme sekresi IL-1 β (**Gambar 31**) yaitu pengalihan untuk penyelamatan (*redirect rescue*), pelepasan untuk perlindungan (*protected released*) dan pelepasan terminal (*terminal release*)



Gambar 31. Mekanisme sekresi IL-1 β

5.7.3. IL-6

Berdasarkan hasil sekuensing setelah dilakukan BLAST kemudian dibandingkan hasil runutan nukleotida gen IL-6 yang disesuaikan dengan database atau *library* yang tersimpan dalam genbank NCBI diperoleh hasil untuk isolat IL-6 insang koi identik dengan urutan nukleotida dari GenBank untuk genom KJ923252.1 (isolat dari China) **Tabel 11.** sedangkan pada organ usus identik dengan genom JX181982.1 (Isolat dari China) dan AJ311800.2 (Isolat dari Eropa) **Tabel 12.**

Tabel 11. Percent Identity (%) sitokin IL-6 pada insang Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) dibandingkan dengan Gen Bank

No	Kode Gen Bank	Organisme	Sitokin	E-value	Percent Identity (%)	Sumber
1	AY102633.1	<i>Cyprinus carpio</i>	IL-6	5e-90	89,58	Fujiki <i>et al.</i> , 2003
2	LN590684.1	<i>Cyprinus carpio</i>	-	3e-55	84,36	Tang, 2014

Tabel 12. Percent Identity (%) sitokin IL-6 pada usus Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) dibandingkan dengan Gen Bank

No	Kode Gen Bank	Organisme	Sitokin	E-value	Percent Identity (%)	Sumber
1	AY102633.1	<i>Cyprinus carpio</i>	IL-6	1e-85	87,64	Fujiki <i>et al.</i> , 2003

IL-6 berfungsi sebagai mediator untuk memberi tanda terjadinya beberapa kondisi yang muncul, IL-6 dihasilkan dalam lesi infeksi dan mengirimkan sinyal peringatan ke seluruh tubuh. Tanda patogen eksogen, yang dikenal sebagai Pathogen -Associated Molecular Patterns (PAMPs) akan dikenal dengan lesi yang terinfeksi oleh Pathogen-Recognition Receptors (PRRs) sebagai sel imun monosit dan makrofag. PRRs ini meliputi Toll-like receptors (TLRs), retinoic acid-inducible gen-1-like reseptor, reseptor like-domain oligomerisasi yang berfungsi mengikat nukleotida, dan reseptor DNA. Mereka merangsang berbagai jalur pensinyalan termasuk NF- κ B, dan meningkatkan transkripsi mRNA sitokin inflamasi seperti IL-6, tumor necrosis factor TNF- α , dan IL-1 β . TNF- α , dan IL-1 β juga mengaktifkan faktor transkripsi untuk menghasilkan IL-6.

Selain itu IL-6 juga mengeluarkan sinyal peringatan jika terjadi kerusakan jaringan, Damage-associated molecular patterns (DAMPs) yang dilepaskan dari sel yang rusak atau sekarat dalam peradangan non infeksi seperti luka bakar atau

trauma, secara langsung atau tidak langsung meningkatkan peradangan(Tanaka, T dan Tadimitsu Kishimoto, 2014 ; Tanaka *et al.*, 2014).

Cyprinus carpio IL-6 subfamily-like cytokine M17 gene, complete cds
 Sequence ID: [AY102633.1](#) Length: 2064 Number of Matches: 1

Range 1: 849 to 1107 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
343 bits(379)	5e-90	232/259(90%)	26/259(10%)	Plus/Plus
Query 1	TGATTGGTACAACGAAGAAGAGATGCT-----AGCCTA-TATGGTCA-CAGTTG	47		
Sbjct 849	TGATTGGTACAACGAAGAAGAGATGCTCTGACAATGTAAGCCTAATATGGTCAACAGTTG	908		
Query 48	CTTGGGTGGTTTCCACATACAATGAGGTGATCCCTCCATTACAAAACCTGGGCTGTTTT	107		
Sbjct 909	CTTGGGTGGTTTCCACATACAATGAGGTGATCCCTCCATTACAAAACCTGGGCTGTTTT	968		
Query 108	AAGAGTGGGAGGGAATATGTGGAAACTGTAATTTAACTCTTTGACAGTATAAACTGTAC	167		
Sbjct 969	AAGAGTGGGAGGGAATATGTGGAAACTGTAATTTAACTCTTTGACAGTATAAACTGTAC	1028		
Query 168	AAGAATATACAATAATGTGGAAATGAGTC--TCAGAA----AGCC-----GGTATGGG	214		
Sbjct 1029	AAGAATATACAATAATGTGGAAATGAGTCCTTCAGAATAATAGCCAAATTTAGGTATGGG	1088		
Query 215	TCATATATCGGTCATGCAA 233			
Sbjct 1089	TCATATATGGGTCATGCAA 1107			

Range 2: 20753714 to 20753920 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
217 bits(240)	1e-52	176/211(83%)	18/211(8%)	Plus/Plus
Query 1	TGATTGGTACAACGAAGAAGAGATGCT-----AGCCTA-TATGGTCA-CAGTTG	47		
Sbjct 20753714	TGATTGGTACAACGAAGAAGAGATGCTCTGACAATGTAGCCTAATATGGTCAACAGTTG	20753773		
Query 48	CTTGGGTGGTTTCCACATACAATGAGGTGATCCCTCCATTACAAAACCTGGGCTGTTTT	107		
Sbjct 20753774	CTTGGGTGGTTTCCACATACAATGAGGTGATCCCTCCATTACAAAACCTGGGCTGTTTT	20753829		
Query 108	AAGAGTGGGAGGGAATATGTGGAAACTGTAATTTAACTCTTTGACAGTATAAACTGTAC	167		
Sbjct 20753830	GAGAGTGGGTGGGAATATGTGGAAACTGTAATTTAGCTCTTTGACAGTATATACAGTAC	20753889		
Query 168	AAGAATATACA-ATAATGTGGAATGAGTCT 197			
Sbjct 20753890	ATGAATAGACATAAAATGTGGAATTAATCT 20753920			

Range 3: 20754647 to 20754759 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
140 bits(154)	3e-29	99/113(88%)	13/113(11%)	Plus/Plus
Query 134	TGTAAATTTAACTCTTTGACAGTATAAACTGTACAAGAATATACAATAATGTGGAAATGA	193		
Sbjct 20754647	TGTAAATTTAACTCTTTGACAGTATAAACTGTACAAGAATATACAATAATGTGGAAATGA	20754706		
Query 194	GTC--TCAGAA----AGCC-----GGTATGGGTCATATATCGGTCATGCAA 233			
Sbjct 20754707	GCTTTTCAGAATAATAGCCAAATTTAGGTATGGGTCATATATCGGTCATGCAA 20754759			

Range 4: 20754558 to 20754646 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
101 bits(111)	3e-17	76/89(85%)	13/89(14%)	Plus/Plus
Query 1	TGATTGGTACAACGAAGAAGAGATGCT-----AGCCTA-TATGGTCA-CAGTTG	47		
Sbjct 20754558	TGATTGGTACAACGAAGAAGAGATGCTCTGACAATGTAAGCCTAATATGGTCAACAGTTG	20754617		
Query 48	CTTGGGTGGTTTCCACATACAATGAGGTG 76			
Sbjct 20754618	CTTGGGTGGTTTCCACATACAATGAGGTG 20754646			

Gambar 32. Hasil Blast dan Alligment IL-6 insang ikan koi dengan data Gen Bank



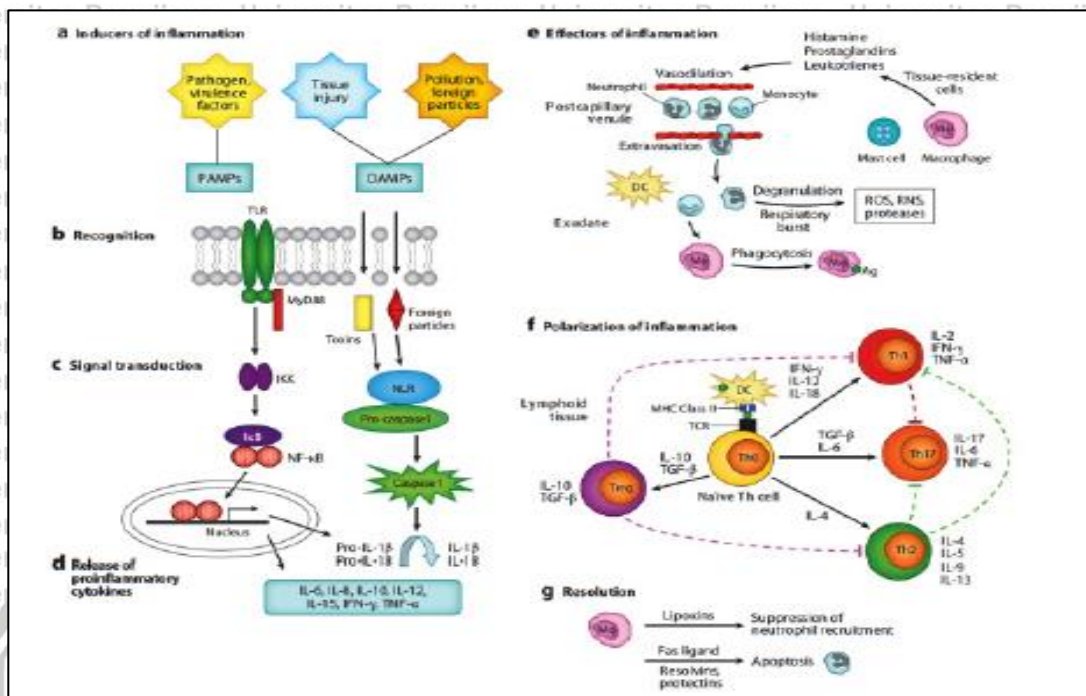
Cyprinus carpio IL-6 subfamily-like cytokine M17 gene, complete cds
 Sequence ID: [AY102633.1](#) Length: 2064 Number of Matches: 1

Range 1: 849 to 1107 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
327 bits(362)	1e-85	227/259(88%)	29/259(11%)	Plus/Plus
Query 1	TGATTGGTACAACGAAGAAGAGATGCT---ACA-----ATGGTC-ACAGTTG	43		
Sbjct 849	TGATTGGTACAACGAAGAAGAGATGCTCTGACAATGTAAGCCTAATATGGTCAACAGTTG	908		
Query 44	CTTGGGTGGTTTCCACATACAATGAGGTGATTCCTCCATTTACAAAATGGGCTGTTTT	103		
Sbjct 909	CTTGGGTGGTTTCCACATACAATGAGGTGATTCCTCCATTTACAAAATGGGCTGTTTT	968		
Query 104	AAGAGTGGGAGGGAATATGTGGGAACGTAAATTTAACTCTTTGACAGTATAAACTGTAC	163		
Sbjct 969	AAGAGTGGGAGGGAATATGTGGGAACGTAAATTTAACTCTTTGACAGTATAAACTGTAC	1028		
Query 164	AAGAATATACAATAATGTGGAAATGAG---TTCAGAATCA-----TTAGGTATGGG	211		
Sbjct 1029	AAGAATATACAATAATGTGGAAATGAGCTTTCAGAATAATGCCAAATTTAGGTATGGG	1088		
Query 212	TCATATATCGGTATGCAA 230			
Sbjct 1089	TCATATATGGGTATGCAA 1107			

Gambar 33. Hasil Blast dan Alligment IL-6 usus ikan koi dengan data Gen Bank

Peradangan terdiri dari aliran yang diatur ketat oleh molekul pensinyalan imun yang disebut sitokin. Langkah pertama dari aliran jalur inflamasi melibatkan identifikasi kerusakan akibat infeksi (**Gambar 34**) yang diperoleh dengan mendeteksi *pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)* yang diarahkan pada motif umum molekul yang diekspresikan oleh patogen yang penting untuk kelangsungan hidup. *Damage-associated molecular patterns (DAMPs)* dikenali oleh sistem imun bawaan, adalah molekul endogen. *Trans membran Toll-like reseptor (TLRs)*, domain pengikat nukleotida intraseluler dan reseptor yang mengandung leusin-berulang (reseptor NOD-like atau NLRs) adalah reseptor yang disandikan dengan garis kuman yang mengenali sinyal kerusakan. Tahap ketiga dari aliran ini adalah transkripsi dan terjemahan gen yang menginduksi ekspresi sitokin proinflamasi seperti interleukin-1-beta (IL-1 β), IL-6, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) (Tanaka *et al.*, 2014).



Gambar 34. Mekanisme ekspresi IL-6

6. KESIMPULAN dan SARAN

6.1. KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah :

1. Hasil elektroforesis pada ikan yang secara klinis terinfeksi *Myxobolus koi* menunjukkan pita (*band*) muncul di 2000 bp, namun pada ikan yang secara klinis terindikasi sehat *band* tetap muncul meskipun tidak terlalu jelas (positif ringan).
2. Hasil sequencing DNA parasit *Myxobolus koi* yang menginfeksi ikan koi (*Cyprinus carpio*) di Blitar memiliki kemiripan (*percent identity*) dari data Gen Bank dengan beberapa organisme. Kemiripan atau tingkat homologi dari sampel antara 95,99 – 99,37% dengan *E-value* 0.0, kemiripan tertinggi terjadi *Myxobolus koi* yang menginfeksi ikan Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) di Barat Daya China
3. Hasil elektroforesis menunjukkan pada organ insang dan usus di ikan yang positif dan negative *Myxobolus koi*, respon dari sitokin menunjukkan TNF α , IL-1 β dan IL-6 terekspresi pada masing-masing band, TNF α muncul pada 300 bp ; IL-1 β = 206 bp dan IL-6 = 256 bp. Sitokin juga ditemukan pada jaringan ikan yang sehat seperti pada jaringan otot, hati, kulit, sirip, jantung, ginjal, limpa, insang, saluran pencernaan dan otak, sehingga pada ikan yang negative *Myxobolus* sitokin TNF α , IL-1 β dan IL-6 juga terekspresi dalam persentase intensitas yang lebih kecil.

4. Ikan yang terinfeksi memiliki intensitas TNF α yang lebih tinggi dibandingkan dengan ikan sehat, insang pada ikan sehat memiliki intensitas TNF- α 26,682 % dan pada ikan terinfeksi 27,004 % pada usus ikan sehat memiliki intensitas TNF- α 29,668 % dan pada usus ikan yang terinfeksi 16,646 %, insang pada ikan sehat memiliki intensitas IL-1 β 22,629 % dan pada ikan terinfeksi 39,147 % pada usus ikan sehat memiliki intensitas IL-1 β 14,589 % dan pada usus ikan yang terinfeksi 23,635 % sedangkan IL-6 insang pada ikan sehat memiliki intensitas 22,712 % dan pada ikan terinfeksi 27,201 %, pada usus ikan sehat intensitas IL-6 tidak terekspresi dan usus ikan yang terinfeksi 50.086%.

6.2. SARAN

Berdasarkan hasil penelitian untuk mendapatkan hasil kuantitatif perlu adanya pegujian sitokin pro inflamasi TNF α , IL-1 β dan IL-6 dengan menggunakan metode *Real Time PCR*.

DAFTAR PUSTAKA

Ahmed. I., Ishtiyag Ahmad, Shoaib Ali Dar, Mohd Awas, Harpreet Kaur, Bashir Ahmad Ganai, Basit Amin Shah. 2019. *Myxobolus himalayaensis* sp. nov. (Cnidaria: Myxozoa) parasiting Schizothorax richardsonii (Cyprinidae: Schizothoracinae) from River Poonch in North West Himalaya, India. *Aquaculture Reports* 14 : 100192.

Andree, K.B. Elizabeth Mac connell, Ronald P. Hendrick. 1998. Nested Polymerase Chain Reaction For The Detection Of Genomic DNA Of *Myxobolus Cerebralis* In Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases Of Aquatic Organisms*. *Dis Aquat Org* 34: 145-154

Anonymous. 2013. Keputusan Menteri Kelautan Dan Perikanan Nomor 26/KEPMEN-KP/2013. www.bkipm.kkp.go.id. Diakses pada tanggal 15 Agustus 2018.

Anonymous. 2017. Keputusan Kepala Badan Karantina Ikan, Pengendalian Mutu, Dan Keamanan Hasil Perikanan Nomor 117/KEP-BKIPM/2017 Tentang Petunjuk Teknis Pengambilan Contoh Uji Media Pembawa. www.bkipm.kkp.go.id. Diakses pada tanggal 15 Agustus 2018.

Anonymous. 2017. Pemeriksaan Patologi Ikan Dengan Teknik Histologi. Prosedur Kerja Laboratorium Penguji Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu Dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Surabaya I

Antiabong, John F., Ngoepe, Mafora G., and Adakole S. Abechi. 2016. Semi-quantitative digital analysis of polymerase chain reaction electrophoresis gel: Potential applications in low-income veterinary laboratories. *Veterinary World*, EISSN: 2231-0916.

Athanas,R. and Xue,L. 2014. Molecular cloning and Expression Patterns of two Tumor Necrosis Factor Alpha Genes in Crucian carp (*Carassius carassius*). *JOURNAL Unpublished*. College of Marine Sciences, Ningbo University, Zhejiang China

Atkinson, S.D., Pavla Bartošová-Sojková, Christopher M. Whipps, and Jerri L. Bartholomew. 2015. Approaches for Characterising Myxozoan Species Chapter 6. *Myxozoan Evolution, Ecology and Development*. DOI 10.1007/978-3-319-14753-6_6

Baerwald, M.R., 2013. Temporal expression patterns of rainbow trout immune-related genes in response to *Myxobolus cerebralis* exposure. *Fish & Shellfish Immunology* 35 p 965-971

Bird, S *et al.*, 2005. Characterisation And Expression Analysis Of An Interleukin 6 Homologue In The Japanese Pufferfish, *Fugu rubripes*. *Developmental and Comparative Immunology* 29 .775–789

Bo Y.X., Xue-Hong Song, Kang Wu, Bo Hu, Bing-Yao Sun, Zhao-Jun Liu, Jian-Gui Fu. 2015. Characterization of Interleukin-1 β as a Proinflammatory Cytokine in Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish & Shellfish Immunology* 46 p 584-595

Bobadilla, S. A. 2008. Fish Immune Response To Myxozoan Parasites. *Parasite*, 15, 420-425

Bobadilla S.A., Heike Schmidt-Posthaus, Thomas Wahli, Jason W. Holland, and Chris J. Secombes. 2015. Fish Immune Responses to Myxozoa Chapter 14. *Myxozoan Evolution, Ecology and Development*. DOI 10.1007/978-3-319-14753-6_14

Bobadilla S.A., Itziar Estensoro, Jaume Perez-Sanchez. 2016. Immunity To Gastrointestinal Microparasites Of Fish. *Developmental and Comparative Immunology* 64 p 187-201

Brody. T, 2016, Clinical trials (second edition) Study Design, Endpoints dan Biomarkers, Drug Safety, dan FDA dan ICH Guidelines 2016, Pages 377-419

Camus., A.C dan Matt J. Griffin. 2010. Molecular Characterization Dan Histopathology Of Myxobolus Koi Infecting The Gills Of A Koi, *Cyprinus Carpio*, With An Amended Morphological Description Of The Agent *J. Parasitol.*, 96(1), 2010, pp. 116–124

Camus., A.C, Jennifer A. Dill, Thomas G. Rosser, Linda M. Pote2 dan Matt J. Griffin. 2017. *Myxobolus axelrodi* n. sp. (Myxosporea: Myxobolidae) a parasite infecting the brain and retinas of the cardinal tetra *Paracheirodon axelrodi* (Teleostei: Characidae). *Parasitol Res* (2017) 116:387-397. DOI 10.1007/s00436-016-5301-1

Carrillo J.L.M., Juan Francisco Contreras-Cordero, Oscar Gutiérrez-Coronado, Paola Trinidad Villalobos-Gutiérrez, Luis Guillermo Ramos-Gracia and Viridiana Elizabeth Hernández-Reyes. 2018. Cytokine Profiling Plays a Crucial Role in Activating Immune System to Clear Infectious Pathogens *IntechOpen*. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.80843>

Castejon,G.L and David Brough. 2011. Survey Understanding the Mechanism of IL-1 β Secretion. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 22 p 189-195

Castro, R and Carolina Tafalla. 2015. Overview of Fish Immunity. *Mucosal Health in Aquaculture*. Elsevier Inc

Cengiz, E.I. 2006. Gill and Kidney Histopathology in The Freshwater Fish *Cyprinus Carpio* After Acute Exposure to Deltamethrin. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 22 200–204

Chen, Young-mao, Ting-yu Wang, dan Tzong-yueh Chen. 2014. "Immunity to Betanodavirus Infections of Marine Fish." *Developmental dan Comparative Immunology* 43 (2). Elsevier Ltd: 174–83. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.07.019>.

Chistiakov D.A., B. Hellemans, F.A.M. Volckaert. 2007. Review on The Immunology of European Sea Bass *Dicentrarchus labrax*. Veterinary Immunology and Immunopathology 117 p 1–16

Chuang Y.T., Yu-Chuan Lin, Kuan-Hung Lin, Ting-Fang Chou, Wen-Chih Kuo, Kai-Ting Yang, Pei-Rung Wu, Ruey-Hwa Chen, Adi Kimchi and Ming-Zong Lai. 2011. Tumor Suppressor Death-Associated Protein Kinase Is Required For Full IL-1 β Production. Blood, Volume 117, Number 3

Chung, K.F. 2009. Cytokines. Chapter 27. Asthma and COPD: Basic Mechanisms and Clinical Management

Claverie, J., Notredame, C. 2003. Bioinformatics for Dummies, Wiley Publishing Inc, New York. 325

Costa M.M., Tanja Maehra, Patricia Diaz-Rosales, Christopher J. Secombesa, Tiehui Wang. 2011. Bioactivity Studies Of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Interleukin-6: Effects On Macrophage Growth And Antimicrobial Peptide Gene Expression. Molecular Immunology 48 p.1903– 1916

Danilova *et al.*, 2005. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. Nature Immunology Volume 6 Number 3. doi:10.1038/ni1166

Deriyanti, A. 2016. Korelasi Kualitas Air dengan Prevalensi *Myxobolus* pada Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) di Sentra Budidaya Ikan Koi Kabupaten Blitar Jawa Timur. Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga. Skripsi

Dezfuli B.S., G. Castaldelli and L. Gia. 2017. Histopathological And Ultrastructural Assessment Of Two Mugilid Species Infected With Myxozoans And Helminthes. Journal of Fish Disease.

Dixon B and R.J.M Stet. 2001. The Relationship Between Major Histocompatibility Receptors and Innate Immunity in Teleost Fish. Developmental and Comparative Immunology 25 p683-699

Djumadi. 1998. Pengembangan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) kuantitatif dengan standar internal untuk kuantitas DNA Mitokondria. Tesis. Program pasca sarjana Universitas Indonesia. Jakarta.

Dowal, R. 1996. Freshwater Fish of South Eastern Australia Chatswood. NSW. Australia. Reed Books. 247 PP

Dyková, I, Ivan Fiala dan Pin Nie. 2003. New data on *Myxobolus longisporus* (Myxozoa: Myxobolidae), a gill infecting parasit of carp, *Cyprinus carpio haematopterus*, from Chinese lakes . FOLIA PARASITOLOGICA 50: 263–268

Eales, Lesley-Jane. 2003. Immunology for life scientists. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England

- Engelsma, M.Y., Stet, R.J., Schipper, H. and Verburg-van Kemenade, B.M. 2001. Regulation of interleukin 1 beta RNA expression in the common carp, *Cyprinus carpio* L. JOURNAL Dev. Comp. Immunol. 25 (3), 195-203
- Eszterbauer, E. 2004. Genetic relationship among gill-infecting *Myxobolus* species (Myxosporea) of cyprinids: molecular evidence of importance of tissue-specificity DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS. Dis Aquat Org. Vol. 58: 35-40
- Fahmi M.R., Ruby Vidia Kusumah, Idil Ardi, Shofihar Sinansari, dan Eni Kusrini. 2017 DNA *Barcoding* Ikan Hias Introduksi. Jurnal Riset Akuakultur, 12 (1), 29-40
- Faliex E., Catherine Da Silva, Gael Simon, Pierre Sasal. 2008. Dynamic Expression of Immune Response Genes in The Sea bass, *Dicentrarchus labrax*, Experimentally Infected With the Monogenean *Diplectanum aequans*. Fish & Shellfish Immunology 24, 759-767
- Fan, W., 2015. Mortality Associated with Infectious Haematopoietic Necrosis in Farmed Adult Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) at Southwest China. Unpublished. Submitted (02-JUL-2015) Aquaculture, Sichuan Agriculture University
- Feng, X., He, J., Chen, Y., Jia, S., Sun, Z., Zhao, X., Zhang, J., Yang, Z., Wang, W. and Lu, Q. 2012. Molecular cloning and expression analysis of interleukin-1 beta from common carp, *Cyprinus carpio* L. JOURNAL Unpublished
- Fiala J., Pavla Bartošová-Sojková, and Christopher M. Whipps. 2015. Classification and Phylogenetics of Myxozoa Chapter 5. Myxozoan Evolution, Ecology and Development/. DOI 10.1007/978-3-319-14753-6_14
- Forlenza *et al.*, 2008. Transcriptional analysis of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) immune response to the fish louse *Argulus japonicus* Thiele (Crustacea: Branchiura) Fish & Shellfish Immunology (2008) 25, 76-83
- Fujiki, K., Shin, D.H., Nakao, M. and Yano, T. 2000. Molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin-1 beta, high affinity immunoglobulin E Fc receptor gamma subunit and serum amyloid A. JOURNAL Fish Shellfish Immunol. 10 (3), 229-242
- Fujiki, K., Nakao, M. and Dixon, B. 2003. Molecular cloning and characterisation of a carp (*Cyprinus carpio*) cytokine-like cDNA that shares sequence similarity with IL-6 subfamily cytokines CNTF, OSM and LIF. JOURNAL Dev. Comp. Immunol. 27 (2), 127-136
- Glenney, G.W dan Gregory D. Wiens. 2007. Early Diversification of the TNF Superfamily in Teleosts : Genomic Characterization and Expression Analysis. *The Journal of Immunology*, 178: 7955-7973.
- Grayfer, L., John G. Walshc, Miodrag Belosevic. 2008. Characterization and Functional Analysis of Goldfish (*Carassius auratus* L.) Tumor Necrosis Factor-Alpha. Developmental and Comparative Immunology 32, 532-543
- Grabner D.S., H. Yokoyama, S. Shirakashi and R. Kinam. 2012. Diagnostic PCR assays to detect and differentiate *Kudoa septempunctata*, *K. thyrsites* and

K. lateolabracis (Myxozoa, Multivalvulida) in muscle tissue of olive flounder (Paralichthys olivaceus) Aquaculture 338-341 p.36-40.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.01.022>

Gunanti Mahasri. 2017. Development of Spore Protein of *Myxobolus koi* as an Immunostimulant for Prevent of Myxobolus on Gold Fish (*Cyprinus carpio Linn*) by Oral Immunisation. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ.*

Gornati., R , Elena Papis, Simona Rimoldi, Valentina Chini, Genciana Terova, Mariangela Prati, Marco Saroglia, Giovanni Bernardini. 2005. Molecular markers for animal biotechnology: sea bass (*Dicentrarchus labrax, L.*) HMG-CoA reductase mRNA Gene 344 299-305

Gómez., D, Jerri Bartholomew, J. Oriol Sunyer. 2014. Biology and Mucosal Immunity to Myxozoans. *Developmental dan Comparative Immunology* 43 243-256

Gomez D, et al., 2013. The Mucosal Immune System of Fish: The Evolution of Tolerating Commensals While Fighting Pathogens, *Fish & Shellfish Immunology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.09.032>

Gonzalez S.F., Kurt Buchmann, Michael E. Nielsen. 2007. Real-time Gene Expression Analysis in Carp (*Cyprinus carpio L.*) skin: Inflammatory Responses Caused by The Ectoparasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish & Shellfish Immunology* 22 p 641-650

Gupta, Aditya dan Harpreet Kaur. 2017. A New pathogen, *Myxobolus holzeriae* Myxosporea: Myxozoa) causing severe gill disease in an Indian major carp *Labeo rohita* in a cold water wetland, Punjab (India). *Microbial Pathogenesis* 111 244-251

Guptaa, A and Harpreet Kaur. 2018. *Myxobolus okamurae* sp. nov. (Myxosporea: Myxozoa) causing severe gill myxoboliosis in the cyprinid *Labeo bata* in a cold water wetland, Punjab (India). *Microbial Pathogenesis* 115 (2018) 86-92

Guo, Q., Mingjun Huang, Yang Liu, Xiuping Zhang dan Zemao Gu. 2018. Morphological Plasticity In *Myxobolus bütschlii*, 1882: A Taxonomic Dilemma Case And Renaming Of A Parasite Species Of The Common Carp. *Parasites & Vectors* 11:399. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2943-0>

Gjurčević, E, Z. Petrinc, Z. Kozarić, S. Kužir, V. Gjurčević Kantura, M. Vučemilo, P. Džaja. 2007. Research Note Metacercariae Of *Centrocestus Formosanus* In Goldfish (*Carassius Auratus L.*) Imported Into Croatia. *Helminthologia*, 44, 4: 214 – 216

Hadi A. A. and S. F. Alwan. 2012. Histopathological Changes In Gills, Liver And Kidney Of Fresh Water Fish, *Tilapia zillii*, Exposed To Aluminum. *Int. J. of Pharm. & Life Sci. (IJPLS)*, Vol. 3, Issue 11: November: 2012, 2071-2081

Hong S., Ronggai Li, Qiaqing Xu, Chris J. Secombes and Tiehui Wang. 2013. Two Types of TNF- α Exist in Teleost Fish: Phylogeny, Expression, and

Bioactivity Analysis of Type-II TNF- α in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. The Journal of Immunology 191:5959-5972

Hossain, M.K., M.D Hossain, M. Habibur Rahman. 2017. Histopathology Of Some Diseased Fishes. J. Life Earth Sci., Vol. 2(2) 47-50

Huss, R. 2015. Biomarkers Chapter 19. Translational Regenerative Medicine. Elsevier Inc

Iliev, D.B., Barbara Castellana, Simon Mac Kenzie, Josep V. Planas, Frederick W. Goetz. 2007 Cloning and Expression Analysis of an IL-6 Homolog in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Molecular Immunology 44 p 1803–1807

Jang., Y.H, Dharaneedharan Subramanian, Seung-Hwan Won, Moon-Soo Heo, 2017. Immune response of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) infected with the myxosporean parasit *Kudoa septempunctata*. Fish & Shellfish Immunology 67 .172-178

Jacobson, G., Simon Muncaster, Koen Mensink, Maria Forlenza, Nick Elliot, Grant Broomfield, Beth Signal, Steve Bird. 2017. Omics Dan Cytokine Discovery In Fish: Presenting The Yellowtail Kingfish (*Seriola lalandi*) As A Case Study Developmental dan Comparative Immunology 75 (63-76)

Jeon, C.H, Jeung-Wan Do, U-Hwa Nam, Wi-Sik Kim and Jeong-Ho Kim. 2017. Development of PCR method for detecting *Kudoa iwatai* (Myxozoa: Multivalvulida) from rock bream *Oplegnathus fasciatus*. Parasitol Res 116:789–796. DOI 10.1007/s00436-016-5354-1

Kabata, Z. 1985. Parasites and Diseases of Fish Cultured in The Tropics. Taylor and Francis Ltd.

Kadowaki, T., Hideaki Harada, Yoshifumi Sawada, Chie Kohchi, Gen-Ichiro Soma, Yukinori Takahashi, Hiroyuki Inagawa. 2009. Two Types of Tumor Necrosis Factor- α in Bluefin Tuna (*Thunnus orientalis*) genes: Molecular cloning and expression profile in response to several immunological stimulants. Fish & Shellfish Immunology 27 p 585–594

Kadowaki, T *et al.*, 2013. Orally Administered LPS Enhances Head Kidney Macrophage Activation With Down-Regulation Of IL-6 In Common Carp (*Cyprinus carpio*). Fish & Shellfish Immunology 34 1569-1575

Koppang, E.O., Agnar Kvellestad, Uwe Fischer. 2015. Fish Mucosal Immunity : Gill (Chapter 5). Mucosal Health in Aquaculture. Elsevier Inc

Kato, E., Kasai, A., Tomochi, H., Li, Y.C. dan Sato, H. 2017. Four *Myxobolus* spp. (Myxosporea: Bivalvulida) from the gill lamellae of common carp (*Cyprinus carpio*) and Japanese silver crucian carp (*Carassius langsdorfii*) in the western part of Japan, with the description of three new species (*M. tanakai n. sp.*, *M. paratoyamai n. sp.*, and *M. ginbuna n. sp.*). Parasitol. Res. In press. DOI:10.1007/s00436-017-5545-4

Koichiro Tamura, Glen Stecher, Daniel Peterson, Alan Filipinski, and Sudhir Kumar 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*:30 2725-2729

Kaur. H, Rajni Attri, Jyoti Joshi. 2016. Molecular identification of a new myxozoan, *Myxobolus dermiscalis* n. sp. (Myxosporea) infecting scales of *Labeo rohita* Hamilton in Harike Wetland, Punjab (India). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 5 p139-144.

Kiruba-Sankar , R., J. Praveen Raj, K. Saravanan, K. Lohith Kumar, J. Raymond Jani Angel, Ayyam Velmurugan, S. Dam Roy. 2018. *Invasive Species in Freshwater Ecosystems – Threats to Ecosystem Services Chapter 9. Biodiversity and Climate Change Adaptation in Tropical Islands. Elsevier Inc*

Latz E., T. Sam Xiao, dan Andrea Stutz. 2013. Activation and Regulation of the Inflammasomes. *Nat Rev Immunol.* 13 (6): doi:10.1038/nri3452.

Li, S., Xuejing Li, Xuyun Gen, Yue Chen, Junli Wei, Jinsheng Sun. 2014. Identification And Characterization Of Lipopolysaccharide-Induced TNF-Alpha Factor Gene From Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 157 p 182– 189

Liu, X. H, S. Yuan, Y. L. Zhao, P. Fang, H. Chen, J. Y. Zhang. 2016. Morphological and molecular characterization of *Myxobolus sheyangensis* n. sp. (Myxosporea:Myxobolidae) with intralamellar sporulation in allogynogenetic gibel carp, *Carassius auratus gibelio* (Bloch) in China. *Parasitol Res* (2016) 115:3567–3574.

Liu. X, Congjie Hua, Qianqian Zhang, Yuanli Zhao, Dong Zhang dan Jinyong Zhang. 2017. *Myxobolus taibaiensis* sp. n. (Myxozoa: Myxosporea) Infecting the Intestinal Wall of Common Carp *Cyprinus carpio* Linnaeus in China. *Folia Parasitologica* 2017, 64: 001 doi: 10.14411/fp.2017.001

Liu y., Alena Lövy, Zemao Gu, Ivan Fiala. 2019. Phylogeny of Myxobolidae (Myxozoa) and the evolution of myxospore appendages in the *Myxobolus* clade. *International Journal for Parasitology* 49. 523–530

Lokapirnasari, W.P., Adriana Monica Sahidu, Tri Nurhajati, Koesnoto Supranianondo, Andreas Berny Yulianto. 2017. Sekuensing 16S DNA Bakteri Selulolitik Asal Limbah Cairan Rumen Sapi Peranakan Ongole. *Jurnal Veteriner.* Vol. 18 No. 1 : 76-82. DOI: 10.19087/jveteriner.2017.18.1.7

Lu, R, Z Chang, J Sun, F Yang, G Nie, dan H Ji. 2016. “Fish & Shell Fi Sh Immunology Molecular Cloning , Expression dan Functional Characterization of Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor-Associated Factor (TRAF) - Interacting Protein (TRIP) in Grass Carp , *Ctenopharyngodon Idella*” 57: 406–12. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.08.041>.

Ma, Xiaojing. 2001. TNF- α and IL-12: a balancing act in macrophage functioning. *Microbes and Infection*, 3, 121–129

Magnado ttiir, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology* 20:137-151

Maftuch, M., Ellana Sanoesi, Ichfat Farichin, Bagus Amin Saputra, Luqman Ramdhani, Sarifa Hidayati, Nurul Fitriyah, Asep A. Prihanto. 2018. Histopathology of gill, muscle, intestine, kidney, dan liver on *Myxobolus* sp.-infected Koi carp (*Cyprinus carpio*). *J Parasit Dis (Jan-Mar)* 42(1):137–143

Mao *et al.*, 2019. Evidence for Paternal DNA Transmission to Gynogenetic Grass Carp. *BMC Genetics* 20:3. <https://doi.org/10.1186/s12863-018-0712-x>

Masoumian, M., F. Baska, K. Molnar. 1996. *Myxobolus nodulointestinalis* sp.n. (Myxosporea, Myxobolidae) a Parasite of the Intestine of *Barbus sharpeyi*. *Diseases of Aquatic Organism*. Vol.24 :35-39

Mathews, Patrick D., Omar Mertins, José O.L. Pereira, Antonio A.M. Maia, dan Edson A. Adriano. 2018. "Morphology dan 18S RDNA Sequencing of *Henneguya Peruviansis* n. Sp. (Cnidaria: Myxosporea), a Parasit of the Amazonian Ornamental Fish *Hyphessobrycon Loretoensis* from Peru: A Myxosporean Dispersal Approach." *Acta Tropica* 187 (August). Elsevier: 207–13. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.08.012>.

Mo.,Y, Rong Wan, dan Qunwei Zhang. 2012. Application of Reverse Transcription-PCR dan Real-Time PCR in Nanotoxicity Research Methods *Mol Biol.* ; 926: 99–112. doi:10.1007/978-1-62703-002-1_7.

Mladineo, I., dan Barbara A. Block. 2010. Expression of cytokines IL-1b dan TNF-a in tissues dan cysts surrounding *Didymocystis wedli* (Digenea, Didymozoidae) in the Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Fish & Shellfish Immunology* 29 (2010) 487-493

Nguyen *et al.*, 2017. Identification dan expression analysis of two pro-inflammatory cytokines, TNF-a dan IL-8, in cobia (*Rachycentron canadum* L.) in response to *Streptococcus dysgalactiae* infection. *Fish & Shellfish Immunology* 67:159-171

Noel, W., Geert Raes, Gholamreza Hassanzadeh Ghasasbeh, Patrick De Baetselier and Alain Beschin. 2004. Alternatively Activated Macrophages During Parasite Infections. *Trends in Parasitology* Vol.20 No.3

Nurekawati, A.D, Gunanti Mahasri dan Muchammad Yunus. 2016. Identifikasi *Myxobolus* Sp. Pada Famili Cyprinidae Dengan Metode Molokuler Di Provinsi Jawa Timur Dan Jawa Tengah. *Jurnal Biosains*. Vol 18, No 2. <http://dx.doi.org/10.23/bsn.v18i2.3131>

Nurekawati, A.D. 2016. Identifikasi *Myxobolus* sp Pada Famili Cyprinidae Dengan Metode Molekuler di Provinsi Jawa Timur dan Jawa Tengah. Tesis. Sekolah Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Surabaya

Okamura *et al.* (eds.), 2015. *Myxozoan Evolution, Ecology and Development*, DOI 10.1007/978-3-319-14753-6_14, Springer International Publishing Switzerland

Paperna, Ilan. 1991. "Diseases Caused By Parasits In The Aquaculture Of Warm Water Fish," 155–94.

Pastoret *et al.*, 1998 Handbook of vertebrate immunology. by ACADEMIC PRESS

Patel, H and V. H. Patel. 2015. Inflammation and Metabolic Syndrome: An Overview. Current Research in Nutrition and Food Science Vol. 3(3), 263-268

Pellitero, P.A.,2008. Fish Immunity And Parasit Infections: From Innate Immunity To Immunoprophylactic Prospects. Veterinary Immunology and Immunopathology 126.171–198

Prado, M., A. Boix and C. v. Holst. 2013. Development of a real-time PCR method for the simultaneous detection of mackerel and horse mackerel. *Food Control*. 34 : 19-23.

Puntmann V,O. 2009. How-To Guide On Biomarkers: Biomarker Definitions, Validation And Applications With Examples From Cardiovascular Disease. *Postgrad Med J*.2009;85:538–545.

Qua, F., Zhiming Xianga, Yang Zhanga, Jun Li, Shu Xiaoa, Yuehuan Zhanga, Yanping Qina, Yingli Zhoua, Ziniu Yua. 2017. Molecular identification dan functional characterization of a tumor necrosis factor (TNF) gene in *Crassostrea hongkongensis*. *Immunobiology* 222 751–758

Rahman MM and McFadden G. 2006. Modulation of Tumor Necrosis Factor by Microbial Pathogens. *PLoS Pathog* 2(2): e4

Roberts H.E., Brian Palmeiro, E. Scott Weber. 2009. Bacterial and Parasitic Diseases of Pet Fish. *Vet Clin Exot Anim* 12 p 609–638

Robert, R.J. 2012. Fish Pathology Fourth Edition. Blackwell Publishing Ltd.

Roca F.J., Ivan Mulero, Azucena Lopez-Munoz, Maria P. Sepulcre,Stephen A. Renshaw, Jose Meseguer and Victoriano Mulero. 2008. Evolution of the Inflammatory Response in Vertebrates: Fish TNF- α Is a Powerful Activator of Endothelial Cells but Hardly Activates Phagocytes. *The Journal of Immunology*. 181:5071-5081

Ribeiro A.D.O., Rodrigo Antunes Caires, Tatiane Casagrande Mariguela, Luiz Henrique Garcia Pereira, Robert Hanner And Claudio Oliveira.2012. DNA barcodes identify marine fishes of Sao Paulo State, Brazil. *Molecular Ecology Resources*. Blackwell Publishing Ltd. doi: 10.1111/1755-0998.12007

Rifa'i, M. 2018. Autoimun dan Bioregulator (Edisi Revisi). UB Press

Saanin, H., 1984. Taksonomi dan Kunci Identifikasi Ikan. Penerbit Bina Cipta. Jakarta

Saeij, J.P., Stet, R.J., de Vries, B.J., van Muiswinkel, W.B. and Wiegertjes, G.F. 2003. Molecular and functional Characterization of carp TNF: a link between TNF polymorphism and trypanotolerance? *JOURNAL Dev. Comp. Immunol.* 27 (1), 29-41

Safari, Omid, dan Mehrdad Sarkheil. 2018. Dietary Administration of Eryngii Mushroom (Pleurotus Eryngii) Powder on Haemato-Immunological Responses, Bactericidal Activity of Skin Mucus dan Growth Performance of Koi Carp Fingerlings (*Cyprinus Carpio Koi*). *Fish dan Shellfish Immunology* 80 (June). Elsevier: 505–13. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.06.046>.

Sarjito, Slamet Budi Prayitno, dan Alfabetian Harjuno Condro Haditomo. 2013. Buku Pengantar Parasit Dan Penyakit Ikan. Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan Universitas Diponegoro

Saha, M dan P.K. Bandyopadhyay. 2017. Parasitological and histological analysis of a new species of the genus *Thalohanellus* and description of a myxozoan parasite (Myxosporea: Bivalvulida) from cultured ornamental goldfish, *Carassius auratus* L.I. *Aquaculture Reports* 8 : 8–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aqrep.2017.07.001>

Scheller, J., Athena Chalaris, Dirk Schmidt-Arras, Stefan Rose-John. 2011. Review The Pro- And Anti-Inflammatory Properties Of The Cytokine Interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta* 1813 878–888

Secombes, C.J., T. Wang and S. Bird. 2011. Review The Interleukins Of Fish. *Developmental and Comparative Immunology* 35 1336–1345

Sivangala, R dan Sumanlatha, G., 2015. Cytokines that Mediate and Regulate Immune Responses. *Innovative Immunology*. www.austinpublishinggroup.com/ebooks

Sudaryatna, P.E., N.Y. Eriawati, I.F. Panjaitan, N.L. Sumarsih. 2013. Histopatologi Insang Ikan Lele (*Clarias bathracus*) yang Terinfestasi *Dactylogirus* sp. *Acta Veterinaria Indonesiana*. Vol.1, No.2 : 75-80

Sugiyono. 2012. Metode Penelitian Kuantitatif Kualitatif dan R&D. Bandung: Alfabeta.

Sumuduni, B.G.D., D.H.N. Munasinghea, A. Arulkanthan. 2018. Chronological Analysis of The Damages Caused by The Metacercariae Of *Centrocestus formosanus* in The Gills of *Cyprinus carpio* and Lesions Caused by The Adult Flukes In *Ardeola ralloides* : An experimental study. *International Journal of Veterinary Science and Medicine* 6 (2018) 165–171

Sukarni, Maftuch dan Happy Nursyam. 2012. Kajian Penggunaan Ciprofloxacin terhadap Histologi Insang dan Hati Ikan Botia (*Botia macracanthus*, Bleeker) yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *J.Exp. Life Sci.* Vol. 2 No. 1

Slaninova, A., Helena Modra, Martin Hostovsky, Eliska Sisperova, Jana Blahova, Iveta Matejova, Monika Vicenova, Martin Faldyna, Lenka Zelnickova, Frantisek Tichy dan Zdenka Svobodova. 2014. Effects of

Subchronic Exposure to *N,N*-Diethyl-*m*-toluamide on Selected Biomarkers in Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International Volume 2014, Article ID 828515, 8 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/828515>

Tanaka, T. and Tadimitsu Kishimoto. 2014. The Biology and Medical Implications of Interleukin-6. *Cancer Immunol Res*; 2(4)

Tanaka, T., Masashi Narazaki, and Tadimitsu Kishimoto. 2014. IL-6 inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* ;6:a016295

Li, Jiong.-Tang. 2014. Direct Submission NCBI. *Journal Chinese Academy of Fishery Science*, Beijing, China

Tamura K., Glen Stecher, Daniel Peterson, Alan Filipksi, and Sudhir Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*:30 2725-2729.

Thompson, JD., Higgins, DG., and Gibson, JT. 1994. Clustal W : Improving the sensitivity of progressive multiple sequence allignment through sequence weighting, position-specifi gap penalties and weight matric choice. *Nucleic Acid Res* 22: 4673 – 4680.

Toha AHA, Widodo N, Hakim L, Sumitro SB. 2016. Panduan Dasar Analisis Data Genetik untuk Publikasi. *Proyek Marine Biodiversity of Raja Ampat Islands*. Kerjasama Universitas Papua-Universitas Brawijaya. 58 h.

Tom, M and Meirav Auslander. 2005. Transcript And Protein Environmental Biomarkers In Fish—A Review. *Chemosphere* 59 (2005) 155–162

Turner ,M.D., Belinda Nedjai, Tara Hurst, Daniel J. Pennington. 2014. Review Cytokines And Chemokines : At The Crossroads Of Cell Signalling and Inflammatory Disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1843 p 2563–2582

Tanekhy, M., T. Kono and M. Sakai. 2009. Expression profile of cytokine genes in the common carp species *Cyprinus carpio* L. following infection with *Aeromonas hydrophila*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 29(6) p.198-203

Tonguthai., K. 1997. Control of Freshwater Fish Parasits: a Southeast Asian Perspective. *Internorional Journal,for Parasfology*, Vol. 21. No. 10, pp. 1185-I 191.

Turner,M.D., et al. 2014. Review Cytokines And Chemokines: At The Crossroads Of Cell Signalling And Inflammatory Disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1843. 2563–2582

Valiellahi, E.,A. Niazi and M. Farsi. 2009. Semiquantitative RT-PCR Analysis to Assess the Expression of *WCOR 14* Transcripts in Winter-Type Wheat. *Biotechnology* 8 (3) : 323-328

Wang,T., Bird,S., Zou,J. and Secombes,C.J. 2001. Sequencing, gene organisation and differential expression of two goldfish IL-1 beta genes. *JOURNAL Unpublished*

Weber, A., Peter Wasiliew and Michael Kracht. 2010. Interleukin-1 (IL-1) Pathway. *Science Signaling* 3 (105), cm1. DOI: 10.1126/scisignal.3105cm1

Xiaojing Ma. 2001. TNF- α and IL-12 : a Balancing Act in Macrophage Functioning. *Microbes and Infection*, 3 p 121–129

Young-Mao Chen, Ting-Yu Wang, Tzong-Yueh Chen, 2014, Immunity to betanodavirus infections of marine fish *Developmental dan Comparative Immunology* 43. 174–183

Yokoyama, H., Daisuke Inoue, Atsuro Kumamaru dan Hisatsugu Wakabayashi. 1997. *Myxobolus koi* (Myxozoa: Myxosporea) Forms Large-dan Small-Type 'Cysts' in the Gills of Common Carp. *Fish Pathology*, 32(4), 211-217, 1997.12

Yokoyama, H. 2003. A Review: Gaps in Our Knowledge on Myxozoan Parasits of Fishes. *Fish Pathology*, 38(4), 125-136, 2003.12

Zhang, J.M dan Jianxiang An. 2007. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin*. 2007 ; 45(2): 27–37. doi:10.1097/AIA.0b013e318034194e

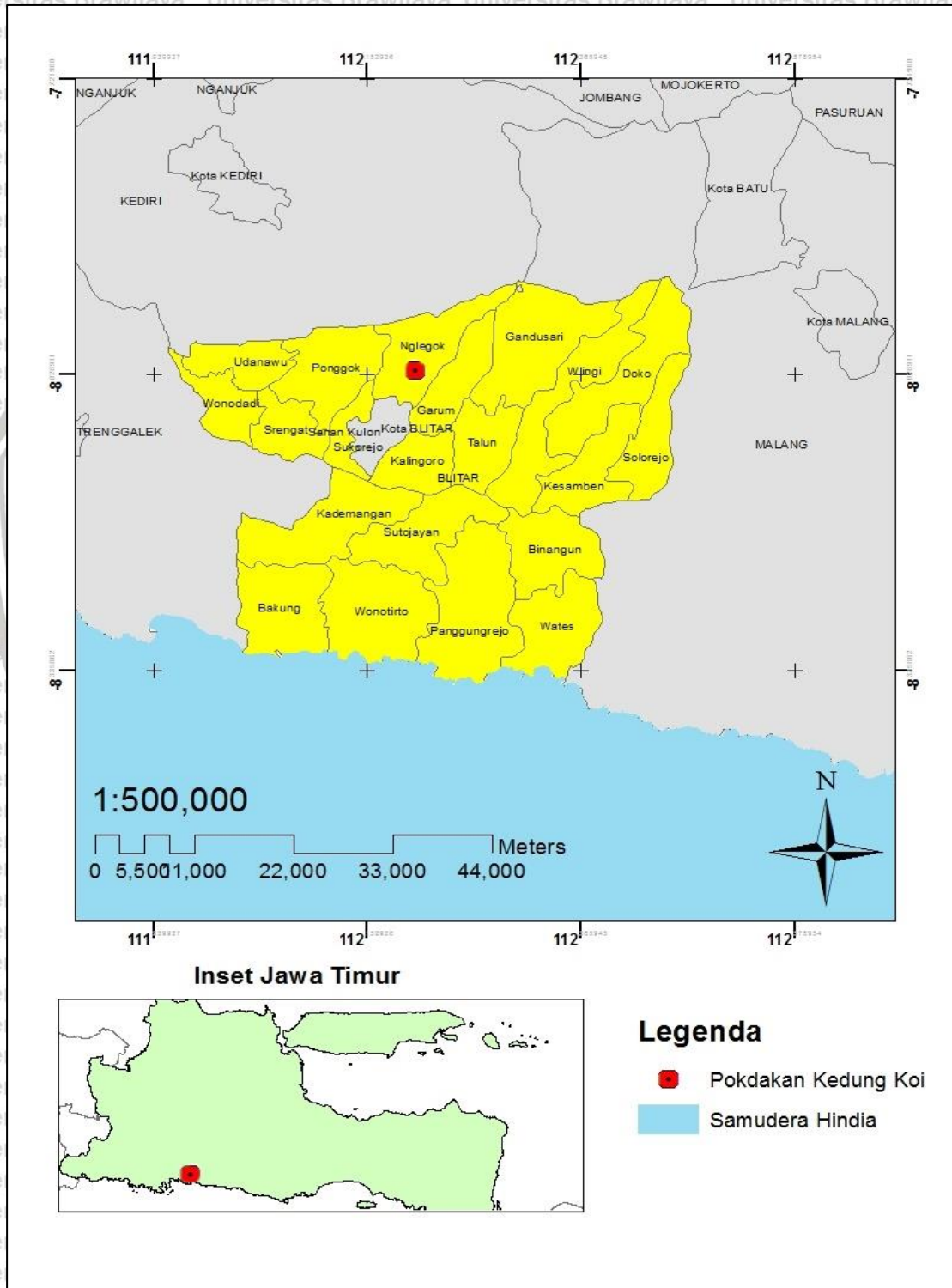
Zhang, J.Y., Yokoyama, H., Wang, J.G., Li, A.H., Gong, X.N., Ryu-Hasegawa, A., Iwashita, M. and Ogawa, K. 2010. Utilization of tissue habitats by *Myxobolus wulii* Landsberg & Lom, 1991 in different carp hosts and disease resistance in allogynogenetic gibel carp: redescription of *M. wulii* from China and Japan. *J. Fish Dis*. 33 (1), 57-68

Zhang, B., Zemaogua, Yang Liu. 2018. Morphological, Histological And Molecular Characterization Of Three *Myxobolus* Species (Cnidaria: Myxosporea) From Silver Carp *Hypophthalmichthys Molitrix* Valenciennes And Bighead Carp *Hypophthalmichthys Nobilis* Richardson In China. *Parasitology International* 67 (2018) 509–516. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2018.04.011>

Zhao, X., Chen, Y., Feng, X., Sun, Z., Jia, S., Wang, W., Zhang, J. and Lu, Q. 2014. Molecular cloning and expression Analysis of common carp (*Cyprinus carpio* L.) tumor necrosis factor- α 4 (TNF α 4). *JOURNAL Unpublished*

Zou, J dan Secombes C.J., 2016. Review The Function of Fish Cytokines. *Biology*, 5, 23; doi:10.3390/biology 5020023

Lampiran 1. Peta Lokasi Pengambilan Sampel



Lampiran 2. Hasil BLAST sequen Myxobolus koi dengan data GEN Bank

```

      10      20      30      40      50
M. Blitar GAGACTGCGG ACGGCTCAGT ATATCAGTGA TTATTGTTTG ATTGTCTTAC
FJ710800.1 GAGACTGCGG ACGGCTCAGT ATATCAGTGA TTATTGTTTG ATTGTCTTAC
FJ841887.1 GAGACTGCGG ACGGCTCAGT ATATCAGTGA TTATTGTTTG ATTGTCTTAC
KT240127.1 GAGACTGCGG ACGGCTCAGT ATATCAGTGA TTATTGTTTG ATTGTCTTAC
LC228235.1 GAGACTGCGG ACGGCTCAGT ATATCAGTGA TTATTGTTTG ATTGTCTTAC
LC228236.1 GAGACTGCGG ACGGCTCAGT ATATCAGTGA TTATTGTTTG ATTGTCTTAC
MH521300.1 GAGACTGCGG AAGGCTCAGT ATATCAGTGA TTATTGTTTG ATTGTCTAAC

      60      70      80      90     100
M. Blitar CCATTGGATA ACCGTGGGAA ATCTAGAGCT AATACATGCA GTTTATTGGC
FJ710800.1 CCATTGGATA ACCGTGGGAA ATCTAGAGCT AATACATGCA GTTTATTGGC
FJ841887.1 CCATTGGATA ACCGTGGGAA ATCTAGAGCT AATACATGCA GTTTATTGGC
KT240127.1 CCATTGGATA ACCGTGGGAA ATCTAGAGCT AATACATGCA GTTTATTGGC
LC228235.1 CCATTGGATA ACCGTGGGAA ATCTAGAGCT AATACATGCA GTTTATTGGC
LC228236.1 CCATTGGATA ACCGTGGGAA ATCTAGAGCT AATACATGCA GTTTATTGGC
MH521300.1 CTATTGGATA ACCGTGGGAA ATCTAGAGCT AATACATGCA GCCAATGGTC

      110     120     130     140     150
M. Blitar GTAGTCGCAA GGTTGCGTCA AAGCATTAT TAGACTTAAC CATCTACTAT
FJ710800.1 GTGGCCGCAA GGTTGCGTCA AAGCATTAT TAGACTTAAC CATCTACTAT
FJ841887.1 GTAGTCGCAA GGTTGCGTCA AAGCATTAT TAGACTTAAC CATCTACTAT
KT240127.1 GTAGTCGCAA GGTTGCGTCA AAGCATTAT TAGACTTAAC CATCTACTAT
LC228235.1 GTTGCCGCAA GGTTGCGTCA AAGCATTAT TAGACTTAAC CATCTACTAT
LC228236.1 GTTATCGCAA GGTGGCGTCA AAGCATTAT TAGACTTAAC CATCTACTAT
MH521300.1 GGGCTTGCTC GG-----CC AAGCATTAT TAGTTTTAAC CAATTACTGC

      160     170     180     190     200
M. Blitar ATGTAAAGGC GAATCTAGAT AACTTTGCTG ATCGCTAGTG CCGACGACGT
FJ710800.1 ACGCAAAGGC GAATCTAGAT AACTTTGCTG ATCGCTCGTG CCGACGACGT
FJ841887.1 ATGTAAAGGC GAATCTAGAT AACTTTGCTG ATCGCTAGTG CCGACGACGT
KT240127.1 ATGTAAAGGC GAATCTAGAT AACTTTGCTG ATCGCTAGTG CCGACGACGT
LC228235.1 ATGTAAAGGC GAATCTAGAT AACTTTGCTG ATCGCTAGTG CCGACGACGT
LC228236.1 ATGTAAAGGC GAATCTAGAT AACTTTGCTG ATCGCTAGTG CCGACGACGT
MH521300.1 GCAAGAAGGT GAATCTAGAT AACTTTGCTG ATCGTTAGTG TGCCAGCGAC

      210     220     230     240     250
M. Blitar TTCAATTGAG TTTCTGCCCT ATCAATTTGT TGGTAAGGTA TTGGCTTACC
FJ710800.1 TTCAATTGAG TTTCTGCCCT ATCAATTTGT TGGTAAGGTA TTGGCTTACC
FJ841887.1 TTCAATTGAG TTTCTGCCCT ATCAATTTGT TGGTAAGGTA TTGGCTTACC
KT240127.1 TTCAATTGAG TTTCTGCCCT ATCAATTTGT TGGTAAGGTA TTGGCTTACC

```


KT240127.1 TGGAGGGCAA GTCCTGGTGC CAGCAGCCGC GGTAATTCCA GCTCCAGTGG
 LC228235.1 TGGAGGGCAA GTCCTGGTGC CAGCAGCCGC GGTAATTCCA GCTCCAGTGG
 LC228236.1 TGGAGGGCAA GTCCTGGTGC CAGCAGCCGC GGTAATTCCA GCTCCAGTGG
 MH521300.1 CTACTGGAGG GCAAGTCCTG GTGCCAGCCC GGGGGTTAAT TCCAGCTCCA

510 520 530 540 550
M. Blitar CGTGATTTAA AGTTGCTGCG TTTAAAACGC TCGTAGTTGG ATCACGCATT
FJ710800.1 CGTGATTTAA AGTTGCTGCG TTTAAAACGC TCGTAGTTGG ATCACGCAGT
FJ841887.1 CGTGATTTAA AGTTGCTGCG TTTAAAACGC TCGTAGTTGG ATCACGCAGT
KT240127.1 CGTGATTTAA AGTTGCTGCG TTTAAAACGC TCGTAGTTGG ATCACGCAGT
LC228235.1 CGTGATTTAA AGTTGCTGCG TTTAAAACGC TCGTAGTTGG ATCACGCAGT
LC228236.1 CGTGATTTAA AGTTGCTGCG TTTAAAACGC TCGTAGTTGG ATCACGCAGT
MH521300.1 GTGGCGTGAT TTAAAGTTGC TCGTATTTAA ACGCTCGTAG TTGGATCATG

560 570 580 590 600
M. Blitar GGCATGTAGT AACACAAATT TGGTCGACTG ACGATTTTCT TTCTCAAGAT
FJ710800.1 GGCATATAGT AACACAGATT TGGTCGAGTG ACGATTTTCT TTTCCGAGAT
FJ841887.1 GGCATGTAGT AACACAAATT TGGTCGACTG ACGATTTTCT TTCTCAAGAT
KT240127.1 GGCATGTAGT AACACAAATT TGGTCGACTG ACGATTTTCT TTCTCAAGAT
LC228235.1 GGCATATAGT AACACAAATT TGGTCGAATG ACGATTTTCT TTCTCGAGAT
LC228236.1 GGCATATAGT AACACAAATT TGGTCGAATG ACGATTTTCT TTCTCGAGAT
MH521300.1 CCGTAACTGT TTGTAGTCTA TGGTCGACTG ACTAGCGAAC ATCTTTGGCT

610 620 630 640 650
M. Blitar TATTGAATCT TGACCGGTTT GTGTGTTAAC GCTATATGTC ACTATTTGCA
FJ710800.1 TATTGGATCT TGACCTGICT GTGTGTTTAC GCTATATGTC ACTATTTGCA
FJ841887.1 TATTGAATCT TGACCGGTTT GTGTGTTAAC GCTATATGTC ACTATTTGCA
KT240127.1 TATTGAATCT TGACCGGTTT GTGTGTTAAC GCTATATGTC ACTATTTGCA
LC228235.1 TATTGGATCT TGACCGGTTT GTGTGTTTAC GCTATATGTC ACTATTTGCA
LC228236.1 TATTGGATCT TGACCGGTTT GTGTGTTTAC GCTATATGTC ACTATTTGCA
MH521300.1 GATTCAGCTG ATGTTTCGCA GTGTAGATAA CAACGCAAAC TGTTACTATT

660 670 680 690 700
M. Blitar CACAAGTATG ATATTTGGTC TGTAGTGAAT CGAGTATCGT GTCTTGTGGA
FJ710800.1 CACAAGTATG ATATTTGGTC TTTAGTGAAT CGAGTATCGT GTCTTGTGGA
FJ841887.1 CACAAGTATG ATATTTGGTC TTTAGTGAAT CGAGTATCGT GTCTTGTGGA
KT240127.1 CACAAGTATG ATATTTGGTC TTTAGTGAAT CGAGTATCGT GTCTTGTGGA
LC228235.1 CACAAGTATG AAATTTGGTC TTTAGTGAAT CGAGTTTCGT GTCTTGTGGA
LC228236.1 CACAAGTATG AAATTTGGTC TTTAGTGAAT CGAGTTTCGT GTCTTGTGGA
MH521300.1 TAATCGCAAG TATGTTGATT GACCTTTACT GAGTTGATGA TCATATTGTG

710 720 730 740 750
M. Blitar GTGTGCCTTG AATAATACAA AGTGCTCCAA GCATGCGCAC GCTTGAATGT
FJ710800.1 GTGTGCCTTG AATAAAACAG AGTGCTCAAA GCAGGCGAAC GCTTGAATGT



FJ841887.1 GTGTGCCTTG AATAAAACAG AGTGCTCAA GCAGGCGAAC GCTTGAATGT
KT240127.1 GTGTGCCTTG AATAAAACAG AGTGCTCAA GCAGGCGAAC GCTTGAATGT
LC228235.1 GTGTGCCTTG AATAAAACAG AGTGCTCAA GCAGGCGAAC GCTTGAATGT
LC228236.1 GTGTGCCTTG AATAAAACAG AGTGCTCAA GCAGGCGAAC GCTTGAATGT
MH521300.1 CGGTTTCGT CTTGAATAAA ACAGAGTGCT CAAAGCAGGC GCGTGCTTGA

760 770 780 790 800
M. Blitar TATAGCATGG AACGAACAAA CGTGTATTTG CGATATGTTG AGCACTTGAA
FJ710800.1 TATAGCATGG AACGAACAAA CGTGTATTTG CACACGTTTG AAGAGTTGGG
FJ841887.1 TATAGCATGG AACGAACAAA CGTGTATTTG CGTATGTTTG AGCAGTTGAG
KT240127.1 TATAGCATGG AACGAACAAA CGTGTATTTG CGTATGTTTG AGCAGTTGAG
LC228235.1 TATAGCATGG AACGAACAAA CGTGTATTTG TGTATGTTTG AGCAGTTGAG
LC228236.1 TATAGCATGG AACGAACAAA CGTGTATTTG CGTACGTTTG GGCAGTTGAG
MH521300.1 ATGTTGTAGC ATGGAACGAA CAAACGTGTA TTCGCGTGCA TCGTGCGAGG

810 820 830 840 850
M. Blitar GCGCAACTTG ATTGCTTGAG CGTACGCAGC ACGCGTCCAA ATACGGATGT
FJ710800.1 GGCAACCTCG ATTTTTTGGG CGTATGCAGC ACCCGCCTAA ATACGGATGT
FJ841887.1 GGCAACTTTG ATTGCTTGAG CGTACGCAGC ACCCGCCAAA ATACGGATGT
KT240127.1 GGCAACTTTG ATTGCTTGAG CGTACGCAGC ACCCGCCAAA ATACGGATGT
LC228235.1 GGCAACTTTG ACTGTTTGAG CGTATGCAGC ACCCGCCTAA ATACGGATGT
LC228236.1 GGCAACTTTG GCTGTTTGAG CGTACGCAGC ACCCGCCTAA ATACGGATGT
MH521300.1 TGAGTGTGCT TCGGTGCGTG TTGATGTATG CATCACCCGC CAAAATACGA

860 870 880 890 900
M. Blitar TGTTTTCGT ATCAGGTGAT GGATTAACAG AGCAGTTAGG GGCATTGGTA
FJ710800.1 TGTTTTTCGT ATCAGGTGAT GATTAACAGG AGCGGTTGGG GGCATTGGTA
FJ841887.1 TGTTTTTCGT ATCAGGTGAT GATTAACAGG AGCGGTTGGG GGCATTGGTA
KT240127.1 TGTTTTTCGT ATCAGGTGAT GATTAMCAGG AGCGGTTGGG GGCATTGGTA
LC228235.1 TGTTTTTCGT ATCAGGTGAT GATTAACAGG AGCGGTTGGG GGCATTGGTA
LC228236.1 TGTTTTTCGT ATCAGGTGAT GATTAACAGG AGCGGTTGGG GGCATTGGTA
MH521300.1 TTGTTGGTTA GTCAATAAGG TGATGATTAA AAGGAGCGGT TGGGGGCATT

910 920 930 940 950
M. Blitar TTTGGCCACG AGAGGTGAAA TTCTTGGACC GGCCAAGACT ACAGAAGCAA
FJ710800.1 TTTGGCCGCG AGAGGTGAAA TTCTTGGACC GGCCAAGGAC TAACAGATAA
FJ841887.1 TTTGGCCGCG AGAGGTGAAA TTCTTGGACC GGCCAAGGAC TAACAGATAA
KT240127.1 TTTGGCCGCG AGARGTGAAA TTCTTGGACC GGCCAAGGAC TAACAGATAA
LC228235.1 TTTGGCCGCG AGAGGTGAAA TTCTTGGACC GGCCAAGGAC TAACAGATAA
LC228236.1 TTTGGCCGCG AGAGGTGAAA TTCTTGGACC GGCCAAGGAC TAACAGATAA
MH521300.1 GGTATTTGGA CGCGAGAGGT GAAATTCAA GACCGTCCAA GGACTAAGTG

960 970 980 990
 1000



Lampiran 3. Hasil Sequen Sampel *Myxobolus koi*

#MEGA

!Title Myxobolus koi;

!Format

DataType=Nucleotide CodeTable=Standard

NSeqs=2 NSites=1363

Identical=- Missing=? Indel=-;

!Domain=Data property=Coding CodonStart=1;

#3540085_M_PMF TGG GGA TAA ATT TTT CTT CCT CGA TTG CGC CTT TTA CGC TGA TTC TAG

#3540086_M_PMR -----

#3540085_M_PMF CAT CGA ACA GGC TTT GAC ACC CGT ACA ATG TCC AGT CCC AGA GCA TCA

#3540086_M_PMR -----

#3540085_M_PMF TGA CAT AAT TCA CTC GGT AGT AGC GAC GGG CGG TGT GTA CAA AGG GCA

#3540086_M_PMR -----

#3540085_M_PMF GGG ACT AAA TCT GCG CAA TTT AAT AAA TTG CAC ATA CTA GGG ATT CCT

#3540086_M_PMR -----

#3540085_M_PMF ATT TCA TGA CGA ATT TAC AAT CGT CAA TCC CCA TCA CGA TAA CAA TTA

#3540086_M_PMR -----

#3540085_M_PMF TAG ATT ACC CAA GTC TTT CGA CCC AGA TAC TTG TTG TTG TTA TCA TTG

#3540086_M_PMR -----

#3540085_M_PMF TAG CGC GCG TGC AGC CCT GAA CAT CGA AGG GCA TCA CTG ACC TGT TAT

#3540086_M_PMR -----

#3540085_M_PMF AGC CAC ACT TCC TCA GGC TTT TAT AAA CCT GTT GTC TCT CCA TAA GGC

#3540086_M_PMR -----

#3540085_M_PMF AGC GTG AAG GTT TTA CCC AAC ACT GCA TAA CAG TAG GGA AAA TCA TCT

#3540086_M_PMR -----

#3540085_M_PMF CCT TTC ACA GAT GAA ACA CGT TCA GTT GCC CTC CCG CAC TCC ACC TAT

#3540086_M_PMR -----

#3540085_M_PMF AAA AAA CTC CTA AGT AAA AAG AAA AAA CCA ACC TTG TTC AAG ATT CTG

#3540086_M_PMR

#3540085_M_PMF GTA CCA ACT GAA ACC CCA AAA AGG ATC ACC ACT ACC CTA AGA AGT TTA
 #3540086_M_PMR
 #3540085_M_PMF TCA TCC AAG CCC GTA GTA TTC AGG CAC CGG GGC CGC CGT CAA ATC TCC
 #3540086_M_PMR
 #3540085_M_PMF GAA AGT TCG GGA CCA CGC TTG TAT CCT AAG ATC CGT CGC AAG TTT TGG
 #3540086_M_PMR
 #3540085_M_PMF ACT AGG TAT TGA TTT CGA CCC ACT TTG TTC TTA ATG GAA CGG TCT GAC
 #3540086_M_PMR
 #3540085_M_PMF AAC GCT TGC TCT GTA GTC TTG GCC GGT CCA AGA ATT CAC CTC TCG GGC
 #3540086_M_PMR
 #3540085_M_PMF CAA ATA CCA TGC CCC AAC GCT CTG TTA ATC ATC ACC TGA TAC GAA ACC
 #3540086_M_PMR
 #3540085_M_PMF AAC ATC CGT ATT TGG CGG TGC TGC GTA CGC TCA CAA TCA ATC TCA ATG
 #3540086_M_PMR
 #3540085_M_PMF CTC AAT CCA AAC ACG TTT GTT CGT TCC ATG CAA CAT TCA AGC GTC CTG
 #3540086_M_PMR
 #3540085_M_PMF CTT CCT TGT TAT TCA AGG CTC CCA AGA CGA TAC CGT TCT AAA CCA ATC
 #3540086_M_PMR
 #3540085_M_PMF AAC TTG GTG CAA ATG GCA TTC GTT AAC CAA ACC GGT CAA GTC ATT GGA
 #3540086_M_PMR
 #3540085_M_PMF AAA AAA TCT GAC CAA TTT GTT ACA TCC GGT GCA TAG TTT AAA CGA ATT
 #3540086_M_PMR
 #3540085_M_PMF TAA TCG CCT GGG TGG AAT CCG GGC TGG GCC CGT GCC CCA GAT TAC AAT
 #3540086_M_PMR
 #3540085_M_PMF GTT AAT TCT TGG GAT TGC CCA AAT TCT TCC CCC CTA AGT ATT GGC CTG
 #3540086_M_PMR
 #3540085_M_PMF CGC TAG TGT GGT ATC CCT CGG AAA ATC CCC TTA TGA GAG CAA CCT ACA
 #3540086_M_PMR
 #3540085_M_PMF TAG GCA GAA AGA CGC AGT GAT TAT CTC CCA ATT TAT AAT TTA ATC ATT
 #3540086_M_PMR
 #3540085_M_PMF TTA ACC TCA TAA ACT GCA GTA TAC AAT TGT TTC CAT GGA AAC ATC TGT
 #3540086_M_PMR



#3540085_M_PMF TCG TCC GCA GTC TCA CGA TAA GAT CGT ATG AAC TTT GGG CAC GTG CAT
#3540086_M_PMR
#3540085_M_PMF GGC TAG TTT GGA ATC GTC ?
#3540086_M_PMR ?



Lampiran 4. Hasil Sequen Sampel TNF- α

1. TNF- α pada insang *Cyprinus carpio*

```
#MEGA
!Title tnfalfa;
!Format
  DataType=Nucleotide CodeTable=Standard
  NSeqs=2 NSites=253
  Identical=. Missing=? Indel=-;
!Domain=Data property=Coding CodonStart=1;
#3540089_TI_PTF GCT GTT GCT GTC TGC TTT GTG CTC TGC AGG TGA ACC CAC ATG CAC GTG
#3540090_TI_PTR .....
#3540089_TI_PTF CAT GTC ATT GTA ATA TGC CAT TTC AGG TAC ATT TTG GCT GTG TCT ATG
#3540090_TI_PTR .....
#3540089_TI_PTF TTG TTC TTG TTC ATT TAT GAA CAA TCA GAA GCG GAA AGG ACA GAC GTT
#3540090_TI_PTR .....
#3540089_TI_PTF TCA ATC TCT TTT CTA TCC AAA TAA ATC TAT TAA AAC ACT GAC TCA TGC
#3540090_TI_PTR .....G.....
#3540089_TI_PTF TTC CCT TCC ACA GAA GCA CAG TCA CAA AAA TCA ATT CAA AAG TCA CTT
#3540090_TI_PTR .....G.....
#3540089_TI_PTF CCA AGG ACA AGG A
#3540090_TI_PTR .....
```

2. TNF- α pada usus *Cyprinus carpio*

```
#MEGA
!Title tnf alfa usus;
!Format
  DataType=Nucleotide CodeTable=Standard
  NSeqs=2 NSites=300
  Identical=. Missing=? Indel=-;
!Domain=Data property=Coding CodonStart=1;
#3540087_TU_PTF GCT GTT GCT GTC TGC TTT ATG CTC AAC AAG GTG AAC CGC CAT ACA CAC
#3540088_TU_PTR .....
#3540087_TU_PTF CAT GCA TGT CAT TGT AAA TAT GCC ATT TCA GGT ACA TAT TTG TGC ATA
#3540088_TU_PTR .....
#3540087_TU_PTF TGT GTA CTT ATT GTT AGT TTC TTG TTC ATT TAG TCT CAG AAC AAT CAG
#3540088_TU_PTR .....
#3540087_TU_PTF GAA GGC GGA AAG GTG AGT TCA GAC CCT CAG TTT CAA TCC TCT TTT TTT
#3540088_TU_PTR .....
#3540087_TU_PTF CCT TCA CAT CAA TAA ATG ATT TGT GAA ACT AAC ATG TAA TCA TGT CTT
#3540088_TU_PTR .....
#3540087_TU_PTF TCC CCT CCG CTG AGC TCA CAT AGA AAA TCT TTC AAA ATC AAA TGT CAC
#3540088_TU_PTR .....
#3540087_TU_PTF TTC CAA GGA CAA
#3540088_TU_PTR .....
```

Lampiran 5. Hasil Sequen Sampel IL-1 β

1. IL-1 β pada insang *Cyprinus carpio*

```
#MEGA
!Title il1beta insang;
!Format
!DataType=Nucleotide CodeTable=Standard
!NSeqs=2 !NSites=197
!Identical=. Missing=? Indel=-;

!Domain=Data property=Coding CodonStart=1;
#3540093_BI_PBF TCT GGA GCA ATG CAA TAC AAA GGT AGA TTT TTA AAG CTT TTG CAT CTT
#3540094_BI_PBR .....
#3540093_BI_PBF ATG CAT GAC TTC CGA AAT GTC CTT TTG ACG TTC CCC CTA CAC ATT TTA
#3540094_BI_PBR .....
#3540093_BI_PBF CGT TTC TTT CAG TTC AAT TCA GTA TGT CAA CAT TCG TGT CGA GTG CAA
#3540094_BI_PBR .....
#3540093_BI_PBF CAC AAA AGG AAG CAC AGC CTG GCT GGG AAT TTC CAA CAG CAA CCT CTA
#3540094_BI_PBR .....
#3540093_BI_PBF CCT AA
#3540094_BI_PBR ----
```

2. IL-1 β pada usus *Cyprinus carpio*

```
#MEGA
!Title il1beta usus;
!Format
!DataType=Nucleotide CodeTable=Standard
!NSeqs=2 !NSites=181
!Identical=. Missing=? Indel=-;

!Domain=Data property=Coding CodonStart=1;
#3540091_BU_PBF TCT GGA GCA ATG CAA TAC AAA GGT AGT ACT TTT GCA TCT TAT GCA TGA
#3540092_BU_PBR .....
#3540091_BU_PBF CTT CCG AAA TGT CCT TTT GAC GGT TCC CCC TAC ACA TTT TAC GTT TCT
#3540092_BU_PBR .....
#3540091_BU_PBF TTC AGT TCA ATT CAG TAT GTC AAC ATT CGT GTC GAG TGC AAC ACA AAA
#3540092_BU_PBR .....
#3540091_BU_PBF GAA GCC ACG GGA ATT TCC AAC AGC AAC CTC TAC CTA A
#3540092_BU_PBR ----
```

Lampiran 6. Hasil Sequen Sampel IL-6

1. IL-6 pada insang *Cyprinus carpio*

```

#MEGA
!Title IL6insang;
!Format
  DataType=Nucleotide CodeTable=Standard
  NSeqs=2 NSites=233
  Identical=. Missing=? Indel=-;

!Domain=Data property=Coding CodonStart=1;
#3540097_GI_PGF TGA TTG GTA CAA CGA AGA AGA GAT GCT AGC CTA TAT GGT CAC AGT TGC
#3540098_GI_PGR .....

#3540097_GI_PGF TTG GGT GGT TTC CAC ATA CAA TGA GGT GAT TCC TTC CAT TTA CAA AAC
#3540098_GI_PGR .....

#3540097_GI_PGF TGG GCT GTT TTA AGA GTG GGA GGG AAT ATG TGG AAA CTG TAA ATT TAA
#3540098_GI_PGR .....

#3540097_GI_PGF CTC TTT GAC AGT ATA AAC TGT ACA AGA ATA TAC AAT AAT GTG GAA ATG
#3540098_GI_PGR .....

#3540097_GI_PGF AGT CTC AGA AAG CCG GTA TGG GTC ATA TAT CGG TCA TGC AA
#3540098_GI_PGR .....

```

2. IL-6 pada usus *Cyprinus carpio*

```

#MEGA
!Title IL6usus;
!Format
  DataType=Nucleotide CodeTable=Standard
  NSeqs=2 NSites=230
  Identical=. Missing=? Indel=-;

!Domain=Data property=Coding CodonStart=1;
#3540095_GU_PGF TGA TTG GTA CAA CGA AGA AGA GAT GCT ACA ATG GTC ACA GTT GCT TGG
#3540096_GU_PGR .....

#3540095_GU_PGF GTG GTT TCC ACA TAC AAT GAG GTG ATT CCT TCC ATT TAC AAA ACT GGG
#3540096_GU_PGR .....

#3540095_GU_PGF CTG TTT TAA GAG TGG GAG GGA ATA TGT GGG AAC TGT AAA TTT AAC TCT
#3540096_GU_PGR .....

#3540095_GU_PGF TTG ACA GTA TAA ACT GTA CAA GAA TAT ACA ATA ATG TGG AAA TGA GTT
#3540096_GU_PGR .....

#3540095_GU_PGF CAG AAT CAT TAG GTA TGG GTC ATA TAT CGG TCA TGC AA
#3540096_GU_PGR .....

```

Lampiran 7. Alat dan Bahan PCR

1. Ekstraksi DNA



Sentrifus



Laruan Silica



Inkubator



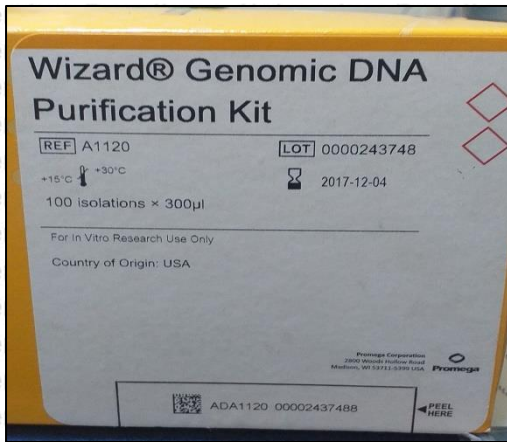
Larutan DEPC H₂O



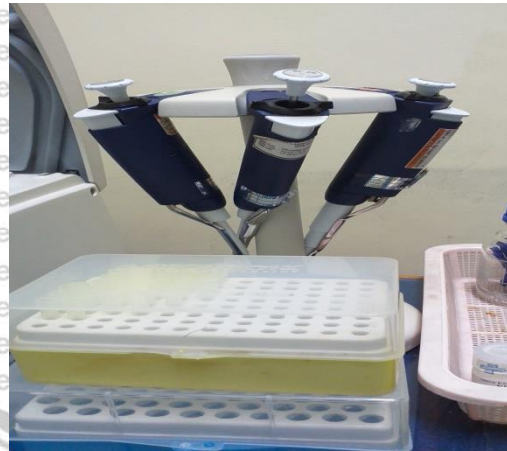
Vortex



Larutan GT Buffer



Kit Ekstraksi



Micropipet

2. Amplifikasi



Thermal cycler



Vortex

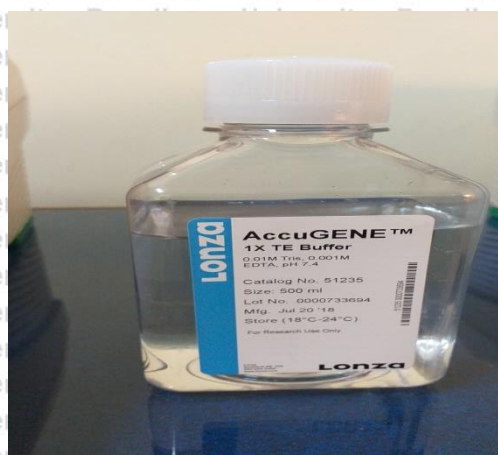


Laminary flow



Master Mix

3. Elektroforesis



Larutan Buffer TAE 1x



Elektroforesis



Agarose



DNA Ladder - Marker



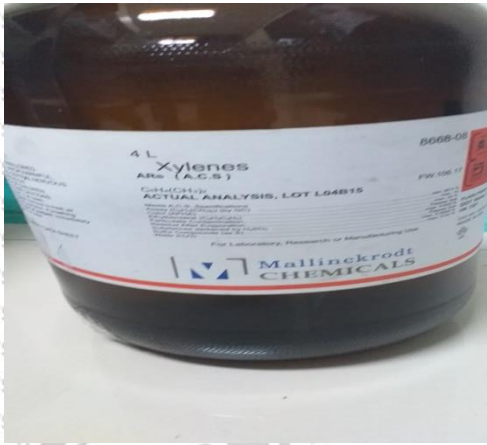
SYBR Safe DNA gel stain



UV gel documentation system



Lampiran 8. Alat dan Bahan Histopatologi



Larutan Xylenes



Microtome



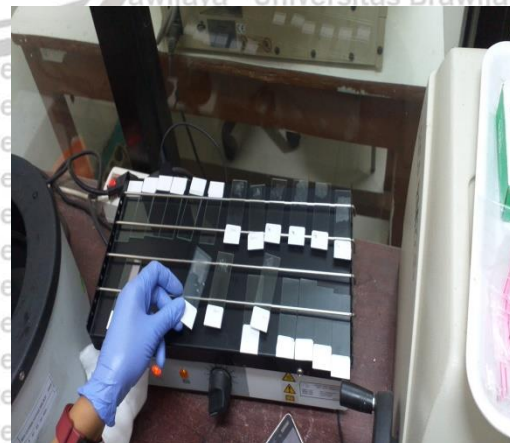
Automatic Tissue Processor



Automatic Tissue Processor



Wax Dispenser



inkubator



Staining Jar



Cassete

