

IDENTIFIKASI KOI HERPESVIRUS PADA DOSIS YANG BERBEDA DENGAN METODE IMUNOHISTOKIMIA STREPTAVIDIN BIOTIN PADA IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)

IDENTIFICATION OF KOI HERPES VIRUS AT DIFFERENT DOSE WITH STREPTAVIDIN BIOTIN METHODS IMMUNOHISTOCHEMISTRY ON TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)

Faricha Risma Nurani, Hari Suprpto dan Suwarno

Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga
Kampus C Mulyorejo - Surabaya, 60115 Telp. 031-5911451

Abstract

KHV is a viral disease in goldfish and Koi Fish (*Cyprinus carpio*) is a highly contagious, infecting all ages or sizes of fish and aquaculture systems. This disease results in mortality between 80% - 100% of the total fish population, with an incubation period of between 1-7 days. KHV infection triggered by a drop in ambient temperature so it is referred to as a virus that attacks when cold (a cold virus). The disease attacks the temperature range of 18-28 ° C and can cause death. This virus attacks can occur at any age of the fish ranging in size from the seed to the parent. The most prominent clinical symptoms due to KHV infection is the sudden death 1-2 days after infection. Other clinical symptoms are necrosis of the gills, sunken eyes, bleeding at the gills, hemorrhage, excess mucus production in the body, and secondary bacterial infections or parasitic infestations.

Streptavidin biotin immunohistochemical method was applied to the study of cells and tissues by staining immunostaining. Technique of determining the existence of (location) antigen (target protein) in tissue using antigen-antibody reaction that begins with histoteknik procedure is the procedure of making tissue sections (histology). This method has high sensitivity and fast so that it can be applied to the detection of KHV antigen in tissues of fish Tilapia (*Oreochromis niloticus*).

This study aims to determine the presence of KHV antigen in tilapia gills after infection. The method used in this study is the experimental method. Dose of virus titer used was 1 ID50, ID50 10, 100 ID50, ID50 1000.

The results showed that the Streptavidin Biotin immunohistochemical examination immunopatologi able to detect KHV virus Ag in the gill tissue of tilapia (*Oreochromis niloticus*) were infected with different doses. In all treatments showed on all the gills are KHV antigen is indicated by the presence of a golden brown color on the gill epithelium. Advised Streptavidin biotin immunohistochemistry test was applied to the detection of the presence or absence of fish-carp KHV carrier as a routine control program and control, including the prevention and outbreak of KHV in Indonesia, because of KHV were attacked in tilapia was persistent and did not show clinical symptoms

Keywords : KHV, Histopathology, Immunohistochemistry

Pendahuluan

KHV merupakan penyakit viral pada Ikan mas dan Ikan koi (*Cyprinus carpio*) yang sangat menular, menginfeksi semua umur atau ukuran ikan dan sistem budidaya. Penyakit ini mengakibatkan mortalitas antara 80% - 100% dari total populasi ikan, dengan masa inkubasi antara 1-7 hari. Infeksi KHV dipicu oleh penurunan suhu lingkungan sehingga disebut sebagai virus yang menyerang saat dingin (*a cold virus*) (Taukhid *et al.* 2010). Penyakit ini menyerang pada kisaran suhu 18-28°C dan dapat menyebabkan kematian, paling sering teramati luka pada insang, sisik, ginjal, limfa, jantung dan sistem gastrointestinal (Gilad *et al.* 2003). Serangan virus ini dapat terjadi pada

berbagai umur ikan mulai dari ukuran benih sampai induk. Gejala klinis yang paling menonjol akibat infeksi KHV adalah kematian mendadak yaitu 1-2 hari setelah infeksi (Wasito, 2013a). Gejala klinis lainnya adalah nekrosis pada insang, mata melesak, perdarahan pada insang, hemorrhage, produksi lendir berlebih pada bagian tubuh dan infeksi sekunder bakteri maupun infestasi parasit (Shapira *et al.* 2005).

Metode yang sudah sering dilakukan untuk mengidentifikasi KHV yaitu dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Diagnosis KHV berdasarkan isolasi virus dan uji PCR mempunyai keterbatasan dalam hal sensitivitas (Bercovier *et al.*, 2005) sehingga diperlukan metode pendekatan diagnosis yang

baru untuk peneguhan diagnosis KHV, yaitu uji histopatologi dan uji imunohistokimia *streptavidin biotin* yang hasil diharapkan mampu mengidentifikasi KHV yang lebih akurat.

Metode imunohistokimia *Streptavidin biotin* diaplikasikan untuk mempelajari sel-sel dan jaringan dengan pewarnaan imunostaining (Brandtzaeg, 1998). Teknik penentuan keberadaan (lokasi) antigen (protein target) dalam jaringan menggunakan reaksi antigen-antibodi yang diawali dengan prosedur histotenik yaitu prosedur pembuatan irisan jaringan (histologi) (Damayanti, 2009). Metode ini mempunyai sensitifitas yang tinggi dan cepat sehingga bisa diaplikasikan untuk deteksi antigen KHV pada jaringan ikan Nila (*Oreochromis niloticus*).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui keberadaan antigen KHV pada insang ikan nila pasca infeksi.

Materi dan Metode

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April-Juni 2014 di Laboratorium Pendidikan Fakultas Perikanan dan Kelautan. Identifikasi virus KHV dan pengujian histopatologi dan imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Balai Besar Karantina Ikan Juanda, isolat virus dilakukan di Laboratorium Pusat Kesehatan Veteriner Masyarakat Surabaya.

Materi Penelitian

Peralatan Penelitian

Peralatan yang digunakan untuk pemeliharaan ikan adalah 24 buah akuarium berukuran 50cmx30cmx30cm³, selang aerasi, batu aerasi. Peralatan untuk pengambilan filtrat virus yaitu mortar, tabung reaksi, rak tabung, vortex, mikropipet 1000 µl, sentrifuge dingin (*Refrigerated microcentrifuge*), lemari es, sarung tangan, spidol marker dan kertas label.

Peralatan untuk Imunohistokimia antara lain cover glass, incubator, lemari es, microcentrifuge tubes, micropipette P200, mikroskop cahaya, objek glass, pippetors, pellet pastel, peralatan elektroforesis, Polaroid film, Polaroid camera, sarung tangan, table top centrifuge/refrigerated microcentrifuge, thermal cycler, timbangan analitik, UV transiluminator dan vortex.

Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah ikan Koi, ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) dengan ukuran panjang rata-rata 5 cm dan pellet ikan.

Bahan untuk Imunohistokimia : *xylene*, etanol, aseton, larutan *buffer saline*, kit *streptavidin biotin* merk lab vision yang berisi :10% *hydrogen peroxide black*, *normal goat serum Anti-Koi Herpesvirus (KHV) monoclonal antibody*, *goat anti-mouse IgG biotin conjugate*, *Streptavidin-horseradish peroxide*, *substrat-chromogen solution*, *counter stain (mayer's hematoxylin)*, *entellan neu* untuk proses mounting, akuades steril.

Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental untuk mengetahui perubahan jaringan insang ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang diuji dengan metode imunohistokimia dengan membandingkan antara perlakuan dan kontrol.

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima perlakuan dan empat kali ulangan. Perlakuan pada penelitian ini yaitu pemberian dosis titer virus 1 ID₅₀, 10 ID₅₀, 100 ID₅₀, 1000 ID₅₀ dan kontrol 0 ID₅₀.

Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel menggunakan *simple random sampling* yaitu mengambil secara acak sampel ikan dari tiap perlakuan yang kemudian dilakukan pemeriksaan imunohistokimia. Pengambilan sampel ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dilakukan setelah 7 hari pemeliharaan.

Variabel Penelitian

Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis titer virus KHV (ID50) yang disuntikan pada ikan nila. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah perubahan histopatologi jaringan insang ikan nila serta keberadaan antigen KHV pada jaringan insang ikan nila. Variabel kendali pada penelitian ini adalah pH, suhu, NH₃ (Amoniak), DO (Oksigen terlarut).

Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data Pengambilan Filtrat Virus

Isolasi virus dilakukan dengan mengambil organ dari ikan yang terinfeksi yang sebelumnya dilakukan uji PCR dengan membaca pita DNA yang positif pada 290 bp (Sunarto *et al.*, 2005b). Isolasi virus dilakukan dengan mengambil bagian insang, ginjal, limpa dan hati yang ditumbuk menjadi pasta halus dalam mortar steril dingin (Sunarto *et. al.*, 2011), diencerkan sampai 10% dengan PBS ditambah dengan 10x penisilin-streptomisin dan diinkubasi semalam pada suhu 4°C. Organ

kemudian dihomogenkan, disentrifugasi pada 2500 rpm pada suhu 4°C dan supernatan disaring pada filter 0,45 µm (Lio-Po *et. al.*, 2009). Hasil penyaringan kemudian diencerkan dengan kelipatan 10-10⁻⁶.

Penyuntikan pada Ikan Koi

Hasil pengenceran selanjutnya disuntikkan ke ikan sebanyak 200 µl secara intraperitoneal (Sunarto *et. al.*, 2005b). Ikan yang telah disuntik dipelihara selama 14 hari pada suhu 23-25°C dan diamati setiap dua kali sehari untuk tanda-tanda klinis penyakit dan mortalitas Ikan diberi makan sekali sehari dengan ransum komersial sebanyak 1% berat badan setiap hari (El-Matbouli *and* Soliman, 2011).

Penentuan Titer Virus pada Ikan Koi

Ikan yang telah disuntik selanjutnya dihitung mortalitasnya dan dimasukkan ke dalam rumus *Reed-Muench*. Jarak proporsional yang diperlukan pada titik akhir kematian 50%, diperoleh sebagai berikut:

Kemudian dilakukan penghitungan untuk mengetahui nilai ID50 yaitu konsentrasi dimana ikan terinfeksi sebanyak 50% dari populasi pada batas waktu tertentu.

$$PD = 10^4$$

$$ID50 = 10^4 \times 0,2 \text{ ml (dosis penyuntikan)}$$

$$10^4 \times 2 \cdot 10^{-1}$$

$$2 \times 10^{-5}$$

$$\text{Titer virus} = 1 \div 2 \times 10^{-5} = 5 \times 10^4 \text{ ID50/ml}$$

Injeksi pada Ikan Nila

Ikan nila yang sudah disiapkan dalam wadah pemeliharaan, selanjutnya akan diinfeksi dengan virus melalui injeksi intra peritoneal. Masing-masing perlakuan akan diinjeksikan virus dengan dosis 0 ID50, 1 ID50, 10 ID50, 100 ID50, 1000 ID50 sebanyak 0,2 ml. Ikan yang sudah diinfeksi dipelihara selama 14 hari. Setelah itu sampel organ ikan yang akan dilakukan imunohistokimia diambil setelah pemeliharaan.

Pengujian Imunohistokimia

Pewarnaan imunohistokimia berguna untuk mendeteksi virus KHV. Teknik ini dilakukan berdasarkan protokol imunohistokimia Aquatic Diagnostic Ltd University of Stirling Scotland. Pengujian imunohistokimia dilakukan pada sediaan jaringan insang yang direndam dalam formalin 10% selama 24 jam. Tahapan imunohistokimia adalah menyiapkan preparat jaringan yang sudah dipotong. Preparat yang sudah disiapkan kemudian dicelupkan ke dalam xylene selama 2x5 menit, 100% etanol selama 5 menit dan 70% etanol selama 3 menit. Selanjutnya preparat dicuci dengan akuades steril dan diinkubasi ke dalam larutan aseton selama 10 menit. Sampel ditetesi *normal goat serum* dan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit, kemudian sampel ditetesi antibodi primer (*anti-KHV monoclonal antibody*) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Setelah itu sediaan preparat dicuci dengan larutan PBS *Free Calcium* selama 10 menit lalu titirkan diatas

$$PD = \frac{(\% \text{ kematian pada pengenceran di atas } 50\%) - (50\%)}{(\% \text{ kematian pada pengenceran di atas } 50\%) - (\% \text{ kematian pada pengenceran di bawah } 50\%)}$$

Keterangan:

PD : proportionate distance atau selang proporsi

Tabel 1. Data Penghitungan Virus untuk Menentukan ID59

Pengenceran Virus	Rasio Mortalitas	Mati	Hidup	Nilai Akumulasi			
				Mati	Hidup	Mortalitas	
						Rasio	Persen
10 ⁻¹	5/0	5	0	17	0	17/17	100
10 ⁻²	4/5	4	1	12	1	12/13	92
10 ⁻³	4/5	4	1	8	2	8/10	80
10 ⁻⁴	3/5	3	2	4	4	4/8	50
10 ⁻⁵	1/5	1	4	1	8	1/9	11

Keterangan: ID50 = 10⁴ x 0,2 ml = 2x10⁵

kertas tissue. Selanjutnya sampel ditetesi antibodi sekunder dan ditambahi dengan cairan *biotinylated secondary antibody* selama 10 menit. Kemudian sampel dicuci dengan larutan PBS Free Calcium selama 10 menit lalu tiriskan diatas kertas tissue. Selanjutnya sediaan preparat diinkubasi dengan streptavidin – peroxidase conjugate selama 5 menit. Setelah itu sediaan dicuci dengan larutan PBS *Free calcium* selama 10 menit lalu tiriskan diatas kertas tissue. Proses selanjutnya adalah menginkubasi sediaan dengan substrat – chromogen pada suhu ruang selama 15 menit lalu cuci dengan aquades selama 10 menit. Tahap terakhir adalah melakukan pewarnaan dengan *counterstain hematoxylin* selama 3 menit dan dicuci dengan aquades dan mounting dengan *entellen neu* untuk pengamatan di bawah mikroskop cahaya. Hasil preparat positif apabila dalam sediaan yang telah dilakukan pewarnaan menggunakan streptavidin-biotin terlihat warna coklat keemasan.

Pemeriksaan imunohistokimia dilakukan berdasarkan banyak atau sedikitnya warna kecoklatan (positif) yang dihasilkan pada slide jaringan yaitu sebagai hasil reaksi antara antigen–antibodi. Selanjutnya preparat dilakukan proses skoring. Skor histologi dilakukan lewat pemeriksaan imunohistokimia dengan pewarnaan metode streptavidin-biotin pada jaringan yang dapat dilihat pada mikroskop cahaya pada pembesaran 400x.

Analisis Data

Hasil dari pemeriksaan imunohistokimia *streptavidin biotin* dan histopatologi jaringan insang ikan nila dilakukan secara statistika dengan menggunakan Kruskal Wallis uji skoring kemudian dilanjutkan dengan uji Z (Siregar, 2011).

Hasil dan Pembahasan

Berdasarkan hasil analisis statistik dengan uji Kruskal Wallis dapat dinyatakan bahwa terdapat perbedaan skor yang signifikan antar perlakuan dengan $p=0,000$ ($p>0,05$). Setelah dilakukan uji perbandingan berganda dengan uji Z dapat diketahui bahwa pada perlakuan kontrol menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan terhadap perlakuan yang lain. Perlakuan 1 ID₅₀ menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap perlakuan 10 ID₅₀ dan berbeda sangat signifikan terhadap perlakuan 100 ID₅₀ dan 1000 ID₅₀. Perlakuan 10 ID₅₀ menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan terhadap

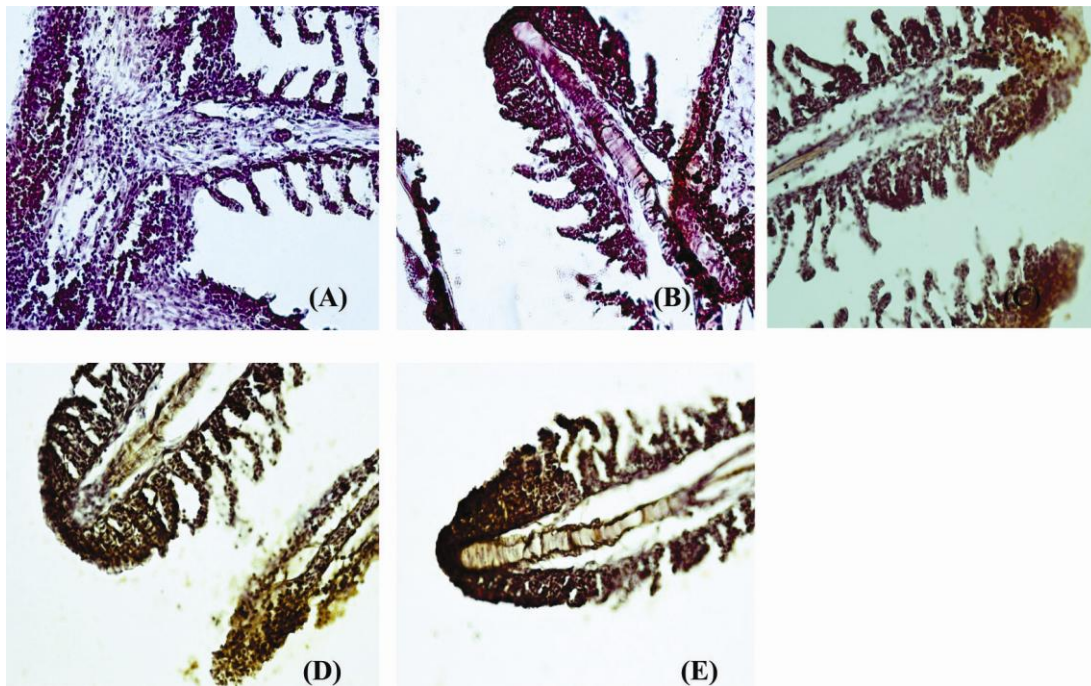
perlakuan 100 ID₅₀ dan 1000 ID₅₀. Perlakuan 100 ID₅₀ menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan terhadap 1000 ID₅₀. Hasil penghitungan statistik skor imunohistokimia jaringan insang ikan nila dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Penghitungan Nilai Skoring Imunohistokimia Insang Ikan Nila

No	Dosis Virus	Rerata Nilai Skoring	Rerata Ranking
1.	Kontrol	0	10,50 ^a
2.	1 ID ₅₀	1	41,00 ^b
3.	10 ID ₅₀	1,25	50,12 ^c
4.	100 ID ₅₀	1,65	66,55 ^d
5.	1000 ID ₅₀	2,35	84,32 ^e

Pemeriksaan imunohistokimia jaringan insang ikan nila berdasarkan banyak sedikitnya warna coklat (+) yang dihasilkan pada slide jaringan yaitu sebagai hasil reaksi antara Ag-Ab. Penilaian dilakukan berdasarkan rata-rata hasil pengamatan pada lima lapang pandang dengan menggunakan pembesaran objektif 20x. Hasil pengamatan imunohistokimia jaringan insang ikan nila pada masing-masing perlakuan menunjukkan skor 0-3 yang artinya mengalami tingkat perubahan warna yang tinggi, sedangkan pada kontrol tidak menunjukkan perubahan warna. Gambar hasil pemerikaan imunohistokimia dapat dilihat pada Gambar 1.

Hasil pengamatan imunohistokimia menunjukkan bahwa pada semua perlakuan terdapat antigen KHV yang ditunjukkan dengan adanya perubahan warna coklat keemasan pada jaringan insang yang telah diwarani dengan Ab dan kromogen. Penghitungan bagian insang yang terjadi perubahan warna dilakukan dengan skoring. Hasil uji statistik skoring insang menunjukkan bahwa pada masing-masing perlakuan berbeda nyata. Dosis virus 1-1000 ID₅₀ yang diinfeksi mampu menginfeksi ikan nila sehingga virion virus dapat terdeteksi setelah dilakukan pemeriksaan. Jumlah virus yang masuk ke dalam tubuh ikan dan mampu menginfeksi ikan berbeda sesuai dosis yang ditentukan. Pada dosis 1000 ID₅₀ yang diinfeksi, Nampak jelas pada hampir semua bagian jaringan insang terdapat Ag KHV. Pada dosis ini jumlah virion virus yang masuk kedalam tubuh ikan lebih banyak sehingga Ag virus yang ada pada jaringan nampak di hampir seluruh bagian jaringan insang yang terwarnai.



Gambar 1. (A) Insang Ikan Nila normal yang diberi Streptavidin biotin dengan antibodi monoclonal anti koi herpesvirus nampak berwarna ungu (1000x); (B) Insang Ikan Nila pemberian dosis virus 1 ID₅₀ berwarna coklat keemasan pada beberapa bagian (C) Insang Ikan Nila pemberian dosis 10 ID₅₀ (D) Insang Ikan Nila pemberian dosis 100 ID₅₀ (E) Insang Ikan Nila pemberian dosis 1000 ID₅₀.

Awal infeksi dimulai dari perlekatan virus pada permukaan tubuh maupun insang. Pada permukaan tubuh diduga virus mampu melewati pertahanan awal tubuh ikan mas berupa mukus dan epitel insang. Nat (2001) menyatakan bahwa untuk proteksi ikan terhadap invasi patogen, permukaan epitel (kulit dan insang) penting sebagai pertahanan awal. Virus juga mampu melewati komponen berbagai substansi pertahanan pada mukus. Magnadottir (2006) menyatakan bahwa mukus ikan mengandung parameter imun seperti lectin, pentraxin, lysozym, protein komplemen, peptida antibakterial dan IgM. Virus yang menempel dan masuk ke organ tubuh bisa berasal dari virus yang terdapat pada feces ikan atau perpindahan virus akibat kontak langsung (kohabitasi) dengan ikan terinfeksi (Hartman *et al.* 2004). Kemudian virus akan masuk ke jaringan pada ruang antar sel. Ligan pada permukaan molekul khusus virion mengikat reseptor pada membran plasma sel (Fenner *et al.* 1995). Virus masuk ke dalam sel melalui fusi antara glikoprotein selubung virus dengan reseptorya yang terdapat di membran plasma (Daily dan Makes 2002). Proses masuknya virus terjadi dengan cara endositosis (endositosis diperantarai sel) (Fenner *et al.* 1995).

Selanjutnya nukleokapsid virus pindah dari sitoplasma ke inti sel, setelah kapsid genom virus dilepas ke dalam inti sel. Genom DNA yang awalnya linear segera berubah menjadi sirkuler (Daily dan Makes 2002).

Faktor yang dapat mempengaruhi keberhasilan pemeriksaan imunohistokimia diantaranya adalah sumber jaringan yang digunakan, adanya Ag dalam jaringan, afinitas ikatan antara Ag dan Ab, tipe Ab yang digunakan dan metode yang digunakan dalam pemuncula Ag.

KHV bisa terdeteksi pada jaringan insang normal ada dugaan bahwa virus KHV dari dalam muscus insang masuk ke dalam air dan bersifat infeksi yang secara efisien mampu menginduksi penyakit KHV pada ikan-ikan lain yang peka. Hipersensitif muscus dianggap sebagai gejala klinis dan lesi patologi awal infeksi KHV (Gilad *et al.*, 2004).

Kulit pada bagian sirip dan tubuh ikan juga dianggap sebagai tempat masuknya virus sehingga ikan dapat terinfeksi KHV dan selanjutnya terjadi Daily SF dan. Makes WIB. 2002. Infeksi virus herpes. Jakarta : Balai Penerbit

Fakultas Kedokteran UI. penyebaran sistemik KHV yang berasal dari insang dan

kulit ke organ-organ internal didalam tubuh ikan. Muskus yang dihasilkan oleh insang sebagai sumber penularan virus, ekskresi virus bersama urin dan tinja juga dianggap berperan penting dalam penyebaran dan penularan KHV pada ikan-ikan lain yang peka.

Pada penelitian ini DNA KHV pada semua ikan nila yang nampak sehat dan juga mengkonsumsi pakan secara normal, setelah dilakukan uji imunopatologi imunohistokimia membuktikan bahwa ikan nila tersebut terinfeksi KHV secara persisten. Hal ini menunjukkan bahwa ikan nila ini diduga sebagai karier KHV yang dapat menyebarkan dan menularkan virus pada ikan-ikan lain yang peka.

Kesimpulan

Pemeriksaan imunohistokimia Streptavidin Biotin mampu mendeteksi Ag virus KHV pada jaringan insang ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang diinfeksi dengan dosis yang berbeda.

Uji imunopatologi imunohistokimia streptavidin biotin perlu diaplikasikan untuk deteksi ada tidaknya ikan-ikan mas carrier KHV sebagai program rutin kontrol dan pengendalian, termasuk pencegahan dan wabah KHV di Indonesia, karena KHV yang menyerang pada ikan nila ini bersifat persisten dan tidak menampakkan gejala klinis.

Daftar Pustaka

- Bercovier H, Fishman Y, Nahary R, Sinal S, Ziotkin A, Eyngor M, Gilad O, Eldar A, Hedrick RP 2005. Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. *BMC Microbiol* 5: 13-19.
- Brandtzaeg, P. 1998. The Increasing Power Of Immunohistochemistry and immunocytochemistry. *Journal of Immunology* 216; 49-67.
- Daili SF dan. Makes WIB. 2002. Infeksi virus herpes. Jakarta : Balai Penerbit Fakultas Kedokteran UI.
- Damayanti, R., Alfinus, I., Rahmadiani., Faizal. 2009. Deteksi Antigen Virus Rabies Pada Jaringan Otak Dengan Metode Imunohistokimia. Seminar Nasional teknologi Peternakan dan Veteriner; 707-719.
- El-Matbouli, M. and H. Soliman. 2011. Transmission of *Cyprinid herpesvirus-3* (CyHV-3) from goldfish to naïve common carp by cohabitation. *Research in Veterinary Science* 90: 536-539.
- Fenner FJ, Gibbs EPJ, Murphy FA, Rott R, Studdert MJ and White DO. 1993. *Virologi veteriner*. California : Academic Press.
- Gilad O., Yun S., Zagmutt-Vergara FJ., Leutenegger CM., Bercovier H., Hendrick RP. 2004. Concentrations of a koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio koi* as assessed by real-time TaqMan PCR. *Dis Aqua Org* 60: 179-187.
- Gilad, O., Yun,S., adkidson. M.A., Way, K., Willits, N.H., bercovier, H., and Hedrick, R.P. 2003. Molecular Comparison of Isolate of An Emerging Fish Pathogen, Koi Herpesvirus, and The Effect of Water Temperature on Mortality of Experimentally Infected Koi. *J Gen Virol*, 84 ; 2661-2668.
- Hartman KH, Yanong RPE, Petty BD, Floyd RF and Riggs AC. 2004. Koi herpes virus (KHV) disease. Publikasi internet.. <http://www.edis.ifasSedu>.
- Isnansetyo, A. dan Kurniastuti. 1995. Teknik Kultur Phytoplankton dan Zooplankton Pakan Alami untuk Pembenihan Organisme Laut. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. Hal 60- 63.
- Kusriningrum. 2008. Perancangan Percobaan. Airlangga University Press. Surabaya. hal 21.
- Lio-Po, G., et. al. 2009. Surveillance of Emerging Fish Viral Pathogens in Some Southeast Asian Countries. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 61(3): 208-214.
- Magnadottir B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish and shellfish Immunology* 20 : 137-151.
- Nat DR. 2001. Characterization of immune system of carp (*Cyprinus carpio* L.) to the hemoflagellata *Trypanoplasma borelly* Laveran and Mesnil. Disertation. Der Universitat Hannover.
- Saphira, Y., et al. 2005. Differential Resistance to KOi herpesvirus (KHV) Carp Interstitial Nephritis and Gill Necrosis Virus (CNGV) Among Common Carp (*Cyprinus carpio*) Strain and Cross Breds. *Aquaculture* 245; 11.
- Siregar, S. 2011. Statistika Deskriptif untuk Penelitian. Dilengkapi Perhitungan Normal & Aplikasi SPSS versi 17. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta. hal 324.

- Sunarto, A., *et al.* 2005b. Field Investigations on a Serious Disease Outbreak among Koi and Common Carp (*Cyprinus carpio*) in Indonesia. *Diseases in Asian Aquaculture* V. hal. 125-135.
- Sunarto, A., *et al.* 2011. Isolation and Characterisation of Koi herpesvirus (KHV) from Indonesia Identification of a New Lineage. *Jurnal of Fish Disease*. 34; 87-101.
- Suprpto, H. 2011. *Histologi Ikan*. Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga. Surabaya. hal 6-13.
- Taukhid, A. M. Lusastuti, W. Andiyani, Rosidah, dan Sriati. 2010. Induksi Kekebalan Spesifik pada Ikan Mas, *Cyprinus carpio* Linn. Terhadap Infeksi Koi herpesvirus (KHV) melalui Teknik Kohabitasi Terkontrol. *Balai Riset Budidaya Air Tawar*. 257-276.
- Taukhid, A., Sunarto, A., Koesharyani, I., Supriyadi, H., Gardenia. *Strategi Pengendalian Penyakit Koi Herpesvirus (KHV)*. 2004. Balai Riset Budidaya Air Tawar.
- Wasito, R., Hastari, W., Bambang, S. 2013a. Identifikasi KHV Dengan Uji Imunopatologi Imunohistokimia Streptavidin Biotin Pada Ikan Mas Karier. *Jurnal Veteriner* 14. No. 1: 37-44.