

IDENTIFIKASI KOI HERVES VIRUS PADA IKAN MAS *Cyprinus carpio* DI SULAWESI UTARA TAHUN 2017 DENGAN MENGGUNAKAN TEKNIK PCR DAN qPCR

[*Identification Of KHV On Common Carp North Sulawesi In 2017 With Methods PCR And qPCR*]

Makkulau Sultan^{1*}, Stenly Wullur² dan Reiny A. Tumbol²

¹)Program Studi Magister Ilmu Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi Manado.

²)Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi, Manado.

E-mail: 78msultan@gmail.com

ABSTRACT

This research aimed to detect the distribution of KHV disease in cultured common carps using conventional PCR and Real Time Quantitative PCR methods in North Sulawesi. The samples were taken from 6 aqua culture centres in North Sulawesi. The results of KHV detection by PCR method showed negative KHV infection because visualization does not form a specific band with the KHV gene that is at 409 bp. Detection of KHV of Ct (Quantification cycle) was greater than the LOD with a confidence level of 95% where Ct LOD is 8.71 for the smallest standard of 1.0×10^2 copies. Ct sample that was read based on qPCR amplification result which was 14,69-18,80 and the value of Ct NTC (Non Template Control) used as a negative control was 17.52.

Keywords : *Commons carp; KHV; Polymerase Chain Reaction; Real Time - Quantitative PCR.*

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi keberadaan penyakit *Koi Herpes Virus* pada ikan mas dengan menggunakan metode PCR dan qPCR di Sulawesi Utara. Sampel uji diambil dari 6 sentral budidaya di Provinsi Sulawesi Utara. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dengan metode PCR diperoleh hasil deteksi yang negatif, karena visualisasi tidak terbentuk band spesifik dengan KHV, yaitu di 409 bp. Deteksi KHV dengan metode qPCR didapat hasil infeksi KHV yang negatif dilihat dari nilai rata-rata Ct (*Quantification cycle*) lebih besar dari LOD dengan tingkat kepercayaan (*confident level*) 95%. Nilai Ct LOD adalah 8,71 untuk standar terkecil $1,0 \times 10^2$ copies, sedangkan Ct sampel hasil amplifikasi qPCR adalah 14,69-18,80 dan nilai Ct NTC (*Non Template Control*) yang digunakan sebagai kontrol negatif adalah 17,52.

Kata kunci: *KHV; Ikan Mas; Polymerase Chain Reaction; Real Time - Quantitative PCR.*

PENDAHULUAN

Penyakit ikan merupakan salah satu faktor pembatas dalam suatu usaha budidaya ikan karena dapat menyebabkan kematian, penurunan kualitas dan produksi ikan. Patogen seperti bakteri, jamur, parasit dan virus yang dalam keadaan normal berada dan hidup bersama dengan ikan dalam sistem pemeliharaan. Namun, hal ini mikroorganisme tersebut akan berubah sifat dan menyebabkan penyakit apabila ada ketidakseimbangan faktor lingkungan. Virus merupakan jenis patogen yang dapat menyebabkan penyakit pada ikan dan mengakibatkan kerugian yang sangat signifikan dalam waktu yang singkat

dengan tingkat kematian yang tinggi dibandingkan jenis patogen lainnya (Sunarto *et al.*, 2009).

Koi Herpes Virus (KHV) atau yang dikenal juga dengan *Cyprinid Herpes Virus 3* (CyHV-3) adalah jenis virus yang menginfeksi ikan mas dan koi dan dapat menyebabkan kematian massal (Hedrick *et al.*, 2008). Hasil deteksi pertama kali di Israel pada tahun 1998 dan selanjutnya di Amerika, wabah KHV dilaporkan telah tersebar di berbagai wilayah seluruh dunia. KHV masuk ke Indonesia pada tahun 2002 melalui perdagangan ikan lintas negara (Hedrick *et al.*, 2008).

Pada tahun 2010 KHV telah tersebar di 17 provinsi di Indonesia (Pusat Karantina

Ikan, 2010). Atas kejadian tersebut kemudian dikeluarkan Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia No. Kep.26/MEN/2013 tentang jenis-jenis hama dan penyakit ikan karantina, golongan, media pembawa serta sebarannya dan virus KHV termasuk penyakit infeksi. Pada tahun 2005 virus KHV telah terdeteksi di daerah Sulawesi Utara berdasarkan pemeriksaan sampel yang berasal dari Tondano dan ditandai dengan kematian massal ikan mas. Namun demikian, data ini hanya berdasarkan pada tanda-tanda klinis ikan yang terserang penyakit sehingga terjadi kematian massal dan bukan berdasarkan pemeriksaan laboratorium secara hispatologi maupun molekuler (Saselah *et al.*, 2012).

Upaya pencegahan secara berkelanjutan penyakit KHV di daerah Sulawesi Utara, perlu dilakukan pemantauan keberadaan penyakit yang sangat merugikan pembudidaya ikan mas dan koi di daerah ini. Berdasarkan hal tersebut maka penelitian ini dilaksanakan dengan tujuan untuk mengidentifikasi penyakit KHV dengan metode PCR dan qPCR pada ikan mas (*Cyprinus carpio*) sebagai bagian dari usaha pencegahan penyakit KHV di daerah Sulawesi Utara.

METODE PELAKSANAAN

Penelitian ini menggunakan sampel ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang diambil pada bulan Juni hingga Agustus Tahun 2017. Ikan uji berasal dari beberapa sentral budidaya di Sulawesi Utara, ada 4 Kabupaten, yaitu Minahasa, Minahasa Utara, Minahasa Tenggara dan Sangihe serta 2 Kota, yaitu Kota Kotamobagu dan Manado. Organ target yang digunakan untuk isolasi DNA adalah insang. Insang dipisahkan dari ikan dengan menggunakan gunting bedah, kemudian difiksasi dengan alkohol 70%. Sampel diambil 2 ekor dari setiap lokasi dengan ukuran panjang rata-rata 6-13 cm. Sampel ikan mas (*Cyprinus carpio*) diambil secara acak menggunakan alat tangkap sibu-sibu. Ikan yang diperoleh selanjutnya diperiksa secara morfologi. Sampel ikan yang diperoleh selanjutnya dibawa ke Laboratorium Biologi Molekuler dan Farmasitika Laut, Fakultas Perikanan

dan Kelautan Universitas Sam Ratulangi Manado untuk dianalisis lebih lanjut.

Ekstraksi DNA

Proses ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan *DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)* dan metode sesuai dengan protokol yang tersedia. Organ insang ikan mas seberat 25 mg, 180 μ l buffer ATL dan 20 μ l Proteinase K dicampur dalam mikrotube 1,5 mL kemudian digerus dan divortex selama 15 detik. Sampel diinkubasi pada suhu 56°C selama 1 jam dengan melakukan vortex pada setiap 15 menit selama waktu inkubasi. Setelah itu, ditambahkan 200 μ l Buffer AL lalu divortex selama 15 detik, kemudian ditambahkan 200 μ l Ethanol (96-100%) dan divortex kembali selama 15 detik. Dituangkan 2 ml sampel ke dalam *DNeasy Mini Spin Column* kemudian disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm, lalu cairan bagian bawah spin column dibuang. Ditambahkan 500 μ l buffer AW1, lalu disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 14.000 rpm, kemudian cairan pada bagian bawah spin column dibuang. Ditambahkan 500 μ l buffer AW2, lalu disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 14.000 rpm, cairan pada bagian bawah spin column dibuang dan spin column ditempatkan pada mikrotube 1,5 ml yang baru dan ditambahkan 200 μ l buffer AE lalu diinkubasi selama 1 menit dan disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm untuk mendapatkan DNA genomic sampel.

Deteksi Koi Herpes Virus Menggunakan Metode PCR

Primer KHV yang digunakan dalam penelitian ini adalah primer KHV F (F: 5'-GGG-TTA-CCT-GTA-CGAG-3') dan primer KHV R (R: 5'-CAC-CCA-GTA-GAT-TAT-GC-3'). Kondisi PCR untuk amplifikasi menggunakan outer primer *Thymidin Kinase* dilakukan dengan pre-denaturasi pada suhu 94°C selama 5 menit dilanjutkan dengan 40 siklus (denaturasi 95°C selama 1 menit, annealing 55°C selama 1 menit, dan elongasi 72°C selama 1 menit) kemudian post elongasi 72°C selama 10 menit dan 4°C. Bahan campuran untuk

reaksi PCR terdiri atas master mix 10x (Promega) sebanyak 12,5 µl, Primer Forward KHV Foward dan Reverse masing-masing 1 µl, DNA Template 2 µl, ddH₂O 8,5 µl, sehingga didapatkan volume total sebanyak 25 µl.

Visualisasi produk PCR dilakukan dengan menggunakan gel elektroforesis. Produk PCR diamati pada gel agarose 1% dalam 1x buffer TBE. Kemudian didokumentasikan dengan UV transiluminator.

Deteksi Koi Herpes Virus Menggunakan metode Real Time Quantitatif PCR (qPCR)

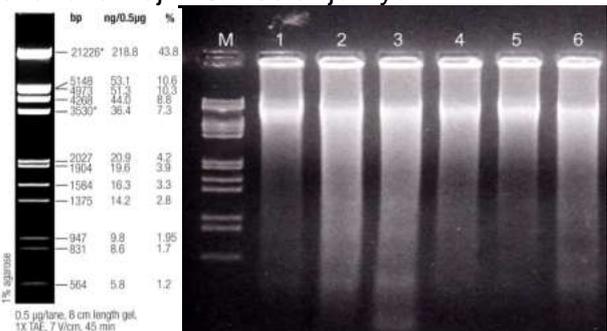
Deteksi Koi Herpes Virus (KHV) dengan metode *Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction* (qPCR) menggunakan *hydrolysis probe*, yaitu satu (1) set primer spesifik dan probe: KHV F: 5'- GAC GCC GGA GAC CTT GTG-3', KHV R ; 5'-CGG GTT CTT ATT TTT GTC CTT GTT-3', sedangkan sekuen KHV probe : 5'-FAM-CTT CCT CTG CTC GGC GAG CAC G-TAMRA-3' (SNI 7959:2014). Campuran larutan *Master mix* RT-qPCR terdiri atas *Fast Universal PCR Master Mix* 2x sebanyak 10 µl dengan konsentrasi akhir 1x, Primer *KHV Forward* (10 µM) 1 µl dengan konsentrasi 0,5 µM, *Primer KHV Reverse* (10 µM) 1 µl dengan konsentrasi akhir 0,5 µM, KHV Probe (5 µM) 1 µl dengan konsentrasi akhir 0,25 µM, *Nuclease Free Water* 2 µl, sehingga didapatkan volume total 15 µl untuk 1 kali reaksi. Homogenisasi semua larutan reagent untuk amplifikasi RT-qPCR dan distribusikan sebanyak 15 µl ke masing-masing tabung. Kemudian ditambahkan 5 µl template DNA (20-30 mg) sampel uji, kontrol positif hasil ekstraksi; kontrol negatif hasil ekstraksi, kontrol negatif hasil amplifikasi PCR; dan 5 tingkatan standar positif (10 copies; 102 copies; 103 copies; 104copies; 105 copies). Selanjutnya diamplifikasi dengan mesin real time qPCR Qiagen rotor gene q.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi DNA

DNA genomik sampel ikan berhasil diekstraksi menggunakan *QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit*. Ekstraksi dengan

DNeasy Blood & Tissue Kit adalah ekstraksi DNA dengan menggunakan Metode *Double Spin Column*. Metode *double spin column* yang menggunakan membran silika untuk menangkap DNA yang telah diisolasi dari sel. Selain itu, penggunaan kit dengan reagen khusus yang biasanya digunakan dalam metode ini mampu meningkatkan kuantitas dan kualitas DNA yang dihasilkan. Reaksi enzimatis dari proteinase K yang digunakan dalam metode ini mampu melisis DNA dari dalam selnya, sehingga mempermudah proses ekstraksi DNA. Penggunaan reagen khusus untuk mengikat dan membersihkan sisa alkohol dan pengotor lainnya, seperti beberapa enzim inhibitor, protein dan kation bivalen yang masih tersisa dari proses preservasi sampel. Proses pembilasan yang lebih dari sekali dengan menggunakan reagen khusus, dan proses sentrifugasi dengan kecepatan tinggi (8000 rpm hingga 14000 rpm) yang diterapkan dalam metode tersebut, mampu menghasilkan ekstrak DNA yang lebih bersih, lebih murni dan dengan konsentrasi yang lebih tinggi. Dengan demikian, ekstrak DNA yang dihasilkan diharapkan mampu mendukung proses selanjutnya (amplifikasi DNA dan sequencing DNA). Hasil Kualitas ekstraksi DNA secara kualitatif dilakukan dengan mengelektroforesis DNA pada 1,5% agarose, band DNA terlihat tegas pada ukuran sekitar 5000 bp (Gambar 1). Hasil ekstraksi DNA telah memenuhi syarat untuk dilakukan uji PCR selanjutnya.



Gambar 1. Kualitas DNA ikan mas yang berasal dari berbagai daerah (M: Marker EcoRI + HindIII (564 bp-21 226 bp); (1). Kabupaten Minahasa, (2). Kota Kotamobagu, (3). Kabupaten Minahasa Utara, (4). Kota Manado, (5). Kabupaten Minahasa Tenggara, (6). Kabupaten Sangihe.

Identifikasi Koi Herpes Virus Menggunakan PCR

Metode deteksi KHV dengan metode single step telah banyak digunakan. Hasil amplifikasi KHV dengan satu step dapat dilihat pada Gambar 2. Kualitas hasil amplifikasi yang dianalisis dengan menggunakan gel agarose 1% dalam 1 x TBE dan di elektroforesis serta divisualisasikan dengan UV transluminator, menunjukkan hasil negatif.



Gambar 2. Hasil Deteksi KHV dengan menggunakan metode PCR. M marker 100 bp, 1. Kabupaten Minahasa, 2. Kota Kotamobagu, 3. kontrol positif, 4. Kabupaten Minahasa Utara, 5. Manado, 6. Kabupaten Minahasa Tenggara dan 7. Kabupaten Sangihe.

Hasil dari identifikasi menunjukkan bahwa semua ikan menunjukkan negatif KHV, terutama ikan yang tidak menunjukkan gejala klinis terdapat pita (band) yang spesifik dengan KHV atau terhadap kontrol positifnya, yaitu di 409 bp. Band yang tervisualisasi adalah band dibawah 409 bp yang merupakan band host dari virus KHV yaitu bank DNA ikan mas. Metode deteksi KHV dapat dilakukan dengan metode single step improve Gray Sph. Metode ini telah banyak digunakan dan dikembangkan untuk deteksi KHV, sedangkan metode double step atau nested belum banyak dikembangkan. Gen KHV memiliki 2 (dua) gen yang belum pernah didapatkan pada genome anggota herpesviridae, yaitu thymidylate kinase (TmkK) dan serine protease inhibitor serta dapat menghasilkan empat gen pengkode protein yang sama dengan yang diekspresikan oleh virus pox, yaitu: thymidylate kinase (TmkK), ribonucleotide reductase (RNR), thymidine kinase (TK) dan B22R-like gene (Ilouze *et al.*, 2006: Novita dan Koesharyani, 2009). Analisis

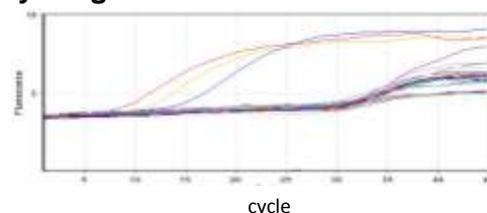
PCR dapat digunakan untuk mengisolasi sekuen TK dan dapat dikembangkan untuk mengamplifikasi fragmen template DNA KHV pada 409 bp, akan tetapi tidak dapat mengamplifikasi fragmen template CCV, CHV ataupun galur sel KF-1 (Bercovier *et al.*, 2008: Novita dan Koesharyani, 2009).

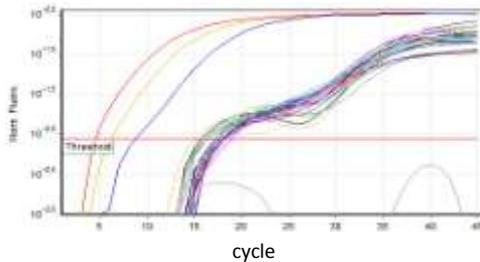
Identifikasi Koi Herpes Virus dengan qPCR (Real Time quantitatif PCR)

Analisa dengan metode Real-Time qPCR dapat menggunakan dye fluorescent seperti SYBR Green dan Probe (seutas oligonukleotida yang dilabel dengan fluorescent tertentu) atau Taq Man Probe. Proses amplifikasi DNA dengan metode Hydrolysis Probe dilakukan dalam tiga tahap, yaitu: tahap inisial denaturasi, tahap amplifikasi, dan tahap pendinginan. Dalam uji ini sebagai positif kontrol digunakan DNA KHV yang berasal dari CEFAS England yang sudah terukur dalam satuan 20.000 copies dan 2.000 copies DNA. Hasil analisa deteksi dan kuantifikasi KHV dari berbagai daerah budidaya ikan mas, ternyata sampel terdeteksi negatif. Aplikasi q-PCR menggunakan hydrolysis probe ini juga dapat digunakan untuk mendeteksi virus dan bakteri (Nam *et al.*, 2005; Granja *et al.*, 2006; Dhar *et al.*, 2001).

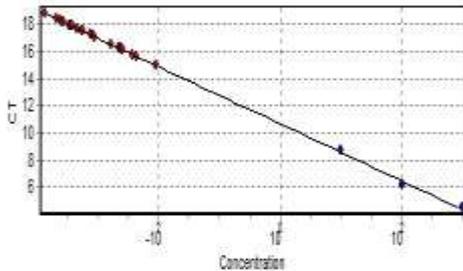
Data sampel uji setelah dianalisa dengan menggunakan software Rotor Gene q dan dibandingkan dengan standar kopi DNA yang digunakan, diperoleh grafik berupa *amplification curve*, *standard curve* (Gambar 3). Hasil pengujian ini mempunyai batas deteksi untuk seluruh sampel terendah adalah $1,0 \times 10^2$ copies (Ct= 8,71) sampai dengan tertinggi $1,0 \times 10^4$ (Ct= 4.52), dengan nilai $R_2=0,99361$ pada nilai slop ($Y=-2,86121$) dan dilaporkan bahwa analisa dikatakan valid jika memiliki nilai koefisien (R_2) > 0,95.

a. Cycling curve





b. Standard Curve



Gambar 3. Kurva/grafik hasil analisa Real Time Quantitatif Polymerase Chain Reaction, (a) kurva amplifikasi dan (b) kurva standar.

Identifikasi Koi Herpes Virus dengan 2 metode, yaitu deteksi menggunakan konvensional PCR dan menggunakan real time qPCR diperoleh hasil tidak terdeteksi adanya infeksi KHV atau hasil yang diperoleh negatif KHV. Data yang didapat ini sesuai dengan data dari hasil pemantauan Hama dan Penyakit Ikan/Hama dan Penyakit Ikan Karantina (HPI/HPIK) yang dilakukan oleh Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Manado pada Tahun 2017 Pemantauan yang dilakukan menunjukkan bahwa di 10 kabupaten/kota di Provinsi Sulawesi Utara negatif terinfeksi KHV.

Pada umumnya kejadian infeksi penyakit terjadi pada saat peralihan musim panas ke musim penghujan, suhu air menurun dan terjadi peningkatan konsentrasi bahan organik dalam wadah pemeliharaan (kolam maupun danau). Kondisi ini menyebabkan stress yang berakibat menurunnya pertahanan tubuh terhadap penyakit pada beberapa ikan, antara lain, yaitu ikan mas dan ikan koi. Kedua jenis ikan ini sangat rentan terserang penyakit virus KHV.

Cuaca yang tidak menentu yang disebabkan oleh perubahan iklim sebagai akibat dari pemanasan global

menyebabkan musim penyebaran penyakit tidak menentu sepanjang tahun. Kondisi cuaca yang kadang-kadang hujan deras kemudian beralih menjadi sangat panas menyebabkan ikan mengalami stress. Tingkat kematian ikan yang terkena KHV dapat mencapai 100% (Gray *et al.*, 2002). Hasil dari pengujian KHV secara PCR dan qPCR menunjukkan hasil negatif ini dapat dikarenakan waktu pengambilan sampel tidak dalam peralihan musim sehingga tingkat stress pada ikan kurang sehingga pertahanan tubuh terhadap infeksi KHV tinggi.

KESIMPULAN

Hasil pengujian menggunakan metode single step PCR dan qPCR terhadap sampel ikan mas (*C. carpio*) di beberapa sentral budidaya di Sulawesi Utara menunjukkan hasil negatif terinfeksi KHV. Hasil identifikasi dengan metode Real time PCR diperoleh nilai rata-rata Ct (*Quantification cycle*) 14,69-18,80 lebih besar dari LOD (8,71) dengan tingkat kepercayaan (*confident level*) 95% standar terkecil $1,0 \times 10^2$ copies, dan nilai Ct NTC (*Non Template Control*) kontrol negatif adalah 17,52.

DAFTAR PUSTAKA

Bercovier H., Fishman Y., Nahary R., Sinai S., Zlotkin A., Eyngor M., Gilad O., Eldar A., & Hedrick, R.P. 2008. Cloning of the koi herpes virus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. *BMC Microbiology*, 5, 13.

Bergmann, S.M., Schütze, H., Fischer, U., Fichtner, D., Riechardt, M., Meyer, K., Schrudde, D., & Kempter, J. 2009. Detection of koi herpes virus (KHV) genome in apparently healthy fish. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 29(5), 145-152.

BioRad. 2012. *Protocols: Nucleic Acid Electrophoresis*. Buletin 6230 Rev A. Bio-Rad Laboratories, Inc. 2 hal.

Gatot. 2008. *Studi Epidemiologi Koi Herpes Virus yang Menyerang Ikan Mas (Cyprinus carpio) Di pulau Jawa*. Universitas Terbuka: Jakarta. 83 hal.

Gray, W.L., Mullis, L., LaPatra, S.E., & Groff, J.M. 2002. Goodwin A: Detection of koi herpes virus DNA in tissues of infected fish. *J Fish Dis.* 2002, 25, 171-178. 10.1046/j.13652761.2002.00355.x.

Hedrick, R.P., Gilad, O., Yun, S., Spangenberg, J.V., Marty, G.D., Nordhausen R.W., Kebus, M. J., Bercovier, H., & Eldar A. 2008. A Herpesvirus Associated with Mass Mortality of Juvenile and

- Adult Koi, a Strain of Common carp. J. Aquat. Anim. Health. Vol. 12 (1), 44-57.
- Hedrick, R.P., Gilad, O., Yun, S.C., McDowell, T.S., Waltzek, T.B., Kelley, G.E., & Adkison, M.A. 2008. Initial isolation and characterization of a herpes-like virus (KHV) from koi and common carp. Bulletin Fisheries Research Agency 2: 1-7.
- Ilouze, M., Dishon, A., & Kotler, M. 2009. Characterization Of A Novel Virus Causing A Lethal Disease In Carp And Koi. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 70 (1), 147-156.
- Novita, Hessy dan Isti Koesharyani. 2009. Diagnosa Koi Herpes Virus (KHV) Dengan Teknik Polymerase Chain Reaction Pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Dengan Nested Timidine Kinase. Jurnal Riset Akuakultur, 4 (2), 233-240.
- Nuryati, S., N. A. Maswan., Alimudin., Sukenda., K. Sumantadinata., F. H. Pasaribu., R. D. Soejoedono., & A. Santika. 2010. Gambaran darah ikan mas setelah divaksinasi dengan vaksin DNA dan diuji tantang dengan koi herpes virus. Jurnal Akuakultur Indonesia. 9 (1), 9-15.
- Manumpil S., Tumbol, R.A., & Lasut, M.T. 2015. Fish disease mapping in North Sulawesi Province. Pemetaan penyakit ikan di Provinsi Sulawesi Utara. Aquatic Science & Management, 3(2), 38-44.
- Meyer, K., Bergmann, S.M., Marel, M.V.D., & Steinhagen, D. 2012. Detection of koi herpes virus: impact of extraction method, primer set, and DNA polymerase on the sensitivity of polymerase chain reaction examinations. Aquaculture Research, 43, 835-842.
- Pusat Karantina Ikan. 2010. Peta daerah sebar hama dan penyakit ikan karantina (HPIK). Pusat Karantina Ikan, Kementerian Kelautan dan Perikanan, Jakarta. 8 hal.
- Puspitaningtyas. 2008. Potensi Ekstrak Bawang Putih *Allium Sativum* Untuk Menginaktifasi Koi Herpesvirus (KHV) Pada Ikan Mas (*Cyprinus Carpio*). IPB: Bogor. 54 hal.
- Saselah, J. 2012. Deteksi Koi Herpes Virus (KHV) pada ikan mas (*Cyprinus carpio* L) di Beberapa Sentral Budidaya di Kabupaten Minahasa Utara dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR). Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan.
- Sunarto, A., Tauhid., Rukyani, A., Koesharyani, I., Supriyadi, H., Gardenia, L., Huminto, H., Agungpriyono, D.R., Pasaribu, F.H., Herdikiawan, D., Rukmono, D., & Prayitno, B. 2008. Field investigations on a serious disease outbreak among Koi and common carp (*Cyprinus carpio*) In Indonesia in P. Walker, R. Lester and M.G. Bondad-Reantaso (eds). Diseases in Asian Aquaculture V, pp. 125-135. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.
- Sunarto, A., Rukyani, A., & Toshiaki, I. 2009. Indonesian Experience on the Outbreak of Koi and Carp (*Cyprinus carpio*) Bull. Fish. Res. Agen. No. 2, 15-21.
- Tauhid., 2010. Induksi kekebalan spesifik pada ikan mas, *Cyprinus Carpio* Linn. Terhadap Infeksi Koi Herpes Virus (KHV) Melalui Teknik Kohabitasi Terkontrol. Universitas Padjajaran: Bandung.