



APLIKASI VAKSIN DNA KOI HERPES VIRUS (KHV) MELALUI METODE PERENDAMAN DENGAN DOSIS YANG BERBEDA DALAM UPAYA PENCEGAHAN PENYAKIT PADA IKAN MAS (*Cyprinus carpio*)

Application of Vaccine DNA Koi Herpes Virus (KHV) through the immersion methods with different dose in diseases prevention in carp (Cyprinus carpio)

Secar Ayu Chairunnisa¹, Slamet Budi Prayitno^{1}, Sarjito¹, Ayi Santika², Sri Nuryati³*

¹Program Studi Budidaya Perairan
Jurusan Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. Soedarto Tembalang-Semarang,

²Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Tawar (BBPBAT) Sukabumi
Jl. Selabintana No. 37 kotak pos 67 Kota Sukabumi 43114

³Program Studi Budidaya Perairan
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Instuti Pertanian Bogor
Jl. Raya darmaga kampus FPIK IPB Bogor 16680, Jawa Barat

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui gejala klinis ikan yang terinfeksi KHV dan mengetahui dosis vaksin DNA KHV melalui metode perendaman dalam upaya pencegahan koi herpes virus (KHV). Penelitian dilaksanakan di Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Tawar (BBPBAT) Sukabumi pada bulan Oktober 2012 – Februari 2013. Ikan uji yang digunakan adalah benih ikan mas bebas KHV dengan ukuran 3-5 cm sebanyak 450 ekor. Penelitian ini menggunakan 5 perlakuan dan 3 kali ulangan, yaitu tanpa pemberian vaksin, pemberian vaksin dengan dosis 10^4 , 10^5 , 10^6 , dan 10^7 CFU/ml. Teknik vaksinasi yang digunakan yaitu vaksinasi melalui metode perendaman selama 1 jam. Vaksin yang digunakan adalah vaksin DNA KHV. Pemeliharaan vaksinasi dilakukan selama 30 hari dan kemudian uji tantang dengan KHV selama 21 hari. Variabel yang diamati meliputi gejala klinis dan kelulushidupan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ikan dengan perlakuan A, B dan C menunjukkan gejala klinis terinfeksi KHV, sedangkan ikan dengan perlakuan D dan E terlihat normal. Hasil penelitian menunjukkan bahwa vaksin DNA yang digunakan dengan dosis 10^6 dan 10^7 CFU/ml dapat mencegah ikan uji dari infeksi KHV. Hasil PCR menunjukkan bahwa ikan dengan perlakuan A, B dan C positif terinfeksi KHV, sedangkan ikan dengan perlakuan D dan E negatif KHV. Nilai kelulushidupan (SR) perlakuan A (15,56%), B (50,00), C (53,33%), D (78,89%) dan E (83,33%). Dosis vaksin DNA KHV yang dapat digunakan untuk pencegahan KHV adalah 10^6 dan 10^7 CFU/ml. Hasil ini didukung oleh nilai kelulushidupan perlakuan dari D (78,89%) dan E (88,33%) yang lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan A, B, C.

Kata Kunci : Vaksin DNA, Koi Herpes Virus (KHV), Ikan Mas

ABSTRACT

The purpose of this research was to determine fish clinical signs of KHV-infected and determine effectiveness of KHV DNA vaccine with immersion method to prevent koi herpes virus (KHV) infection. This research was conducted in National Center for Freshwater Aquaculture Development (BBPBAT) Sukabumi, from October 2012 to February 2013. The fish samples used were carp seed free KHV with size 3 – 5 cm as many as 450 animals. Five (5) treatments and 3 replications were administered in this research. The treatment were, without vaccine, vaccine at dose of 10^4 , 10^5 , 10^6 , and 10^7 CFU/ml. Vaccination technique used was vaccination through immersion method. One of the vaccine that has been developed was KHV DNA vaccine. Eksperimental fishes were maintain for 30 days past vaccination, and then challenged with KHV and observed for 21 days. The variables measured were clinical signs and survival rate. The results of this research indicated that non vaccinated fish (A), vaccinated fish at 10^4 (B) and 10^5 (C). demonstred clinical signs of KHV-infected fish, while vaccinated fish at 10^6 (D) and 10^7 (D) visibly normal. This results indicated that vaccination using KHV DNA vaccines at 10^6 and 10^7 CFU/ml could prevent eksperimental fish from KHV-infection. PCR results showed that fish with treatments A, B and C positive infected KHV, while treatment D and E negative KHV. Survival rate (SR) at treatment A (15,56%), B (50,00%), C (53,33%), D (78,89%) and E (83,33%). For prevention of KHV, dose vaccine DNA KHV 10^6 and 10^7 CFU/ml could be used. This results supported by survival rate from treatment D (78,89%) and E (83,33%) higher than treatment A, B and C.

Keywords : Vaccine DNA, Koi Herpes Virus (KHV), Carp



PENDAHULUAN

Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) merupakan salah satu jenis ikan konsumsi air tawar dengan nilai ekonomis yang tinggi serta mudah dalam pemeliharaannya. Selain itu, permintaan ikan ini di pasar domestik ada kecenderungan meningkat, terutama di Jawa Barat. Hal inilah yang menjadikan usaha budidaya ikan mas memiliki prospek yang baik serta mengalami perkembangan yang pesat.

Sunarto *et al.*, (2002), menyatakan bahwa budidaya ikan mas mulai mengalami hambatan sejak bulan Maret 2002, yaitu adanya penyakit koi herpes virus (KHV). KHV menyerang semua stadia ikan mas. Penyakit ini telah menyebabkan lumpuhnya usaha budidaya ikan mas hampir seluruh wilayah sentra usaha budidaya di Indonesia dimana terdapat berbagai strain ikan mas, terserang KHV.

Infeksi KHV pertama kali terjadi di Blitar dan menyebar ke beberapa wilayah di Indonesia terutama di Jawa, Bali, dan Sumatera (Mudjiutami *et al.* 2006). Wabah penyakit ikan koi herpes virus ini sangat serius karena menimbulkan kerugian yang tidak sedikit. Taukhid *et al.*, (2004), menyatakan bahwa kerugian yang tercatat di Indonesia berdasarkan informasi yang dikumpulkan hingga awal 2004, secara kumulatif untuk wilayah pulau Jawa, Bali, Sumbawa, dan Sumatera diperkirakan mencapai lebih dari 100 milyar rupiah.

Parelberg *et al.* (2005), menyatakan bahwa upaya untuk penanggulangan penyakit KHV terus dikembangkan. Upaya yang paling efektif dilakukan adalah dengan meningkatkan sistem kekebalan tubuh ikan, baik non spesifik melalui imunostimulasi maupun kekebalan spesifik melalui vaksinasi.

Metode pemberian vaksin dapat dilakukan dengan tiga cara, yakni dengan cara menyuntikkan pada bagian *intraperitoreal* (rongga perut), perendaman dan melalui pakan. Vaksinasi melalui suntikan biasanya diberikan sebanyak 0,1 ml dan merupakan metode yang paling efektif digunakan, hal ini dikarenakan vaksin tersebut dapat dipastikan masuk kedalam tubuh ikan, namun metode penyuntikan ini hanya dapat dilakukan untuk ikan dengan ukuran bobot tubuh lebih dari 15 gram. Untuk ukuran ikan kurang dari 10 gram, metode perendaman lebih efektif digunakan. Hal ini dilakukan untuk meminimalisasi stres pada ikan. Selain itu, biaya yang digunakan untuk metode perendaman lebih rendah dibandingkan dengan metode penyuntikan dan melalui pakan. Metode pemberian vaksin melalui pakan yang dilakukan seminggu sekali atau dalam waktu lama (Ellis, 1988).

Vaksin DNA merupakan hasil rekayasa genetika dimana sekuen gen virus yang bersifat

imunogenik (glikoprotein) disisipkan ke dalam plasmid *Escherichia coli*. Penggunaan vaksin DNA KHV diharapkan dapat mencegah ikan mas dari infeksi KHV (Srinuryati dan Santika, 2009).

Vaksin DNA KHV telah dikembangkan oleh Institut Pertanian Bogor (IPB) bekerjasama dengan BBPBAT Sukabumi sejak tahun 2007. Vaksin DNA KHV diperoleh dari hasil isolasi plasmid bakteri *E. coli* yang mengandung Glikoprotein KHV (BBPBAT Sukabumi, 2009).

Penelitian ini dilaksanakan di Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Tawar (BBPBAT) Sukabumi, pada bulan Oktober 2012 sampai Februari 2013. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui gejala klinis ikan yang terinfeksi KHV dan mengetahui berapa dosis vaksin DNA KHV melalui metode perendaman yang dapat digunakan dalam upaya pencegahan koi herpes virus (KHV).

METODE PENELITIAN

Ikan uji yang digunakan yaitu benih ikan mas bebas KHV (3 – 5 cm) sebanyak 450 ekor yang didapat dari BBPBAT Sukabumi. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 5 perlakuan dengan 3 kali ulangan, yaitu tanpa pemberian vaksin, pemberian vaksin dengan dosis 10^4 , 10^5 , 10^6 , dan 10^7 CFU/ml.

Produksi vaksin dilakukan dengan kultur masal bakteri *E.coli* yang mengandung konstruksi vaksin DNA dalam media 2XYT cair yang kemudian di *shaker* dengan kecepatan 240 rpm selama 17 – 20 jam. Bakteri dipanen lalu disimpan ke dalam *tube* dan dilakukan *pelleting* menggunakan *sentrifuge* dengan kecepatan 10000rpm selama 10 menit dalam suhu 4°C. Pellet bakteri kemudian dilarutkan dengan menggunakan PBS (*Phospat Buffer Saline*) dan diinaktivasi dengan menggunakan panas selama 10 – 20 menit dalam suhu 80°C.

Teknik vaksinasi melalui metode perendaman yang digunakan mengacu pada metode vaksinasi Ellis (1988). Sebelum ikan uji direndam dengan vaksin, terlebih dahulu dilakukan *treatment* dengan menggunakan air garam selama 5 menit dengan dosis 2 g/l. Hal ini bertujuan untuk meningkatkan tingkat osmoregulasi pada tubuh ikan sehingga mampu membuka pori – pori tubuh dan vaksin masuk kedalam tubuh. Proses vaksinasi dilakukan selama 1 jam dengan masa pemeliharaan selama 30 hari (BBPBAT Sukabumi, 2009)

Wadah pemeliharaan berupa akuarium dengan ukuran sekitar 60x40x40 cm. Akuarium yang digunakan sebanyak 15 buah dengan padat penebaran masing – masing akuarium sebanyak 30 ekor. Pakan yang digunakan berupa pakan buatan (pelet). Pakan diberikan sebanyak 2 kali sehari pada pagi dan sore hari secara *at satiation*.



Pengamatan gejala klinis dan mortalitas hewan uji dilakukan setiap hari hingga akhir penelitian. Beberapa parameter kualitas air yang diukur meliputi suhu, DO, salinitas, pH, dan NH₃. Pengukuran suhu dilakukan setiap harinya, sedangkan DO, salinitas, pH, dan NH₃ dilakukan pada awal dan akhir penelitian.

Suhu merupakan parameter kualitas air yang paling berpengaruh terhadap perkembangan KHV. Gillad *et al.* (2003), menyatakan bahwa KHV dapat tumbuh pada kisaran suhu 15 – 25^oC, dengan suhu terbaik untuk replikasi KHV pada suhu 20 – 25^oC yang menimbulkan mortalitas mencapai presentase 90 – 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1. Respon pakan dan pergerakan ikan selama masa ujiantang

Hari ke-	Perlakuan														
	A			B			C			D			E		
	Ulangan ke-														
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√
1	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√
2-4	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√	√√
5-7	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√√	√√	√√	√√	√√	√√
8-10	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√√	√√	√√	√√	√√	√√
11-12	-	-	-	√	√	√	√	√	√	√√	√√	√√	√√	√√	√√
13-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	√√	√√	√√	√√	√√	√√
15-16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	√√	√√	√√	√√	√√	√√
17-18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	√√	√√	√√	√√	√√	√√
19-21	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√√	√√	√√	√√	√√	√√

Keterangan: A = Tanpa vaksin
 B = Vaksin 10⁴ CFU/ml
 C = Vaksin 10⁵ CFU/ml
 D = Vaksin 10⁶ CFU/ml
 E = Vaksin 10⁷ CFU/ml
 - = Respon terhadap pakan tidak ada, berenang tidak seimbang, megap - megap, berada dipermukaan air
 √ = Respon terhadap pakan kurang, berenang normal tetapi tidak terlalu aktif
 √√ = Respon terhadap pakan normal, berenang normal

Gejala Klinis

Gejala klinis yang ditunjukkan selama masa ujiantang oleh ikan uji pada perlakuan A, B dan C menunjukkan gejala klinis ikan tersebut terinfeksi KHV. Hal ini terlihat dari ikan yang sudah mulai stress yang ditandai dengan kurangnya respon terhadap pakan mulai hari ke-6. Pada hari ke-8, hewan uji mulai menunjukkan pergerakan renang yang tidak normal seperti berenang yang tidak seimbang. Bahkan beberapa ikan berenang dipermukaan dan tampak megap-megap. Perubahan respon terhadap pakan dan pergerakan ikan selama ujiantang dapat dilihat pada Tabel 1.

Gejala klinis lainnya yang terdeteksi yakni pengamatan pada kondisi badan ikan pada masa ujiantang yang dapat dilihat pada Tabel 2.

Gejala klinis yang terdeteksi adalah sebagian dari permukaan tubuh kesat, geripis pada bagian sirip, dan necrosis pada insang.

Tabel 2. Morfologi tubuh ikan selama masa ujiantang

Hari ke-	Perlakuan														
	A			B			C			D			E		
	Ulangan ke-														
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
1	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
2-4	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
5-7	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
8-10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
11-12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
13-14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
15-16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
17-18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
19-21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++

Keterangan: A = Tanpa vaksin
B = Vaksin 10^4 CFU/ml
C = Vaksin 10^5 CFU/ml
D = Vaksin 10^6 CFU/ml
E = Vaksin 10^7 CFU/ml
+ = Ada kerusakan pada tubuh ikan
++ = Permukaan tubuh normal

Berdasarkan hasil pengamatan gejala klinis selama 21 hari setelah ujiantang (Tabel 1 dan 2), hewan uji dengan perlakuan A, B dan C menunjukkan gejala klinis terinfeksi KHV seperti perubahan morfologi pada tubuh ikan. Gejala klinis pertama kali ditunjukkan setelah 8 hari masa ujiantang. Ikan mengalami kematian yang berlangsung sangat cepat yaitu setelah 24 jam gejala klinis pertama ditampakkan. Kejadian tersebut sesuai dengan pernyataan Tauhid *et al.* (2004), bahwa kematian ikan berlangsung sangat cepat sekitar 24 – 48 jam setelah gejala klinis pertama terlihat.

Gejala klinis yang ditunjukkan seperti penurunan nafsu makan, respon tanggap berkurang, perubahan warna tubuh, ikan megap-megap, mata cekung dan ditutupi selaput putih, bagian tubuh terasa kesat, sisik mengelupas, sirip geripis, kulit melepuh disertai luka pada permukaan tubuh, dan *necrosis* pada insang (Gambar 1).



Gambar 3. Gejala klinis ikan yang terinfeksi KHV

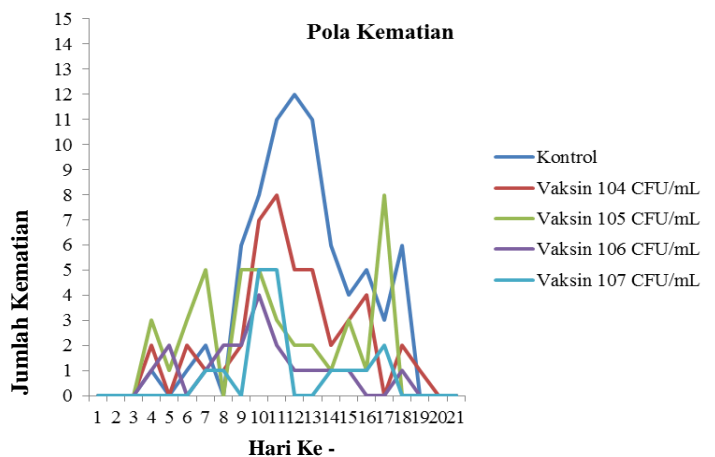
Keterangan: a = *Necrosis* pada insang
b = Kulit melepuh

Gejala klinis yang ditunjukkan selama penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian Sunarto *et al.* (2002), yang menyatakan bahwa ikan yang terinfeksi KHV terlihat lesu, kehilangan keseimbangan berenang dan megap-megap, hilangnya lendir dan kasar tampilan pada kulit atau menunjukkan melepuh seperti luka pada kulit, hemoragi pada operkulum, sirip dan terjadi *necrosis* pada insang. Menurut Tamba (2006), kerusakan insang akan mengganggu respirasi di insang. Untuk mengimbangi suplai oksigen, ikan akan meningkatkan frekuensi pergerakan operkulum. Ikan yang terus menerus kekurangan oksigen akhirnya akan mengalami

kematian.

Pola Kematian

Pada awal pengamatan belum terjadi kematian hingga hari ke-3. Pada hari ke-4, ikan uji dari setiap perlakuan mengalami kematian kecuali pada perlakuan E. Hari ke-9 sampai hari ke-13 inilah yang diduga sebagai puncak ganasnya virus KHV karena setelah hari ke-13 dan selanjutnya tidak terjadi kematian yang tinggi, kecuali pada perlakuan A (Gambar 1).

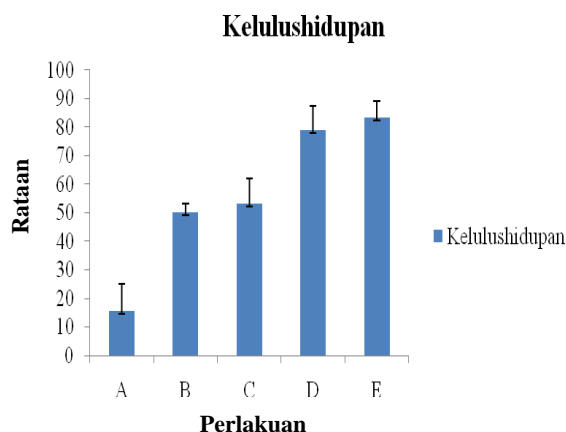


Gambar 2. Pola kematian ikan selama masa ujiantang

Ikan uji setelah hari ke-18 sampai hari ke-21 tidak menunjukkan indikasi kematian, hal ini diduga bahwa ikan tersebut telah *resistant* terhadap KHV. Hasil penelitian ini berbeda dengan hasil penelitian Tauhid *et al.* (2010), yang menyatakan bahwa ikan yang mampu mempertahankan hidup sampai hari ke-14 dapat dinyatakan bahwa ikan tersebut *resistant* terhadap KHV terlihat dari kondisi badan ikan yang kembali membaik dan nafsu makan ikan yang kembali meningkat.

Kelulushidupan

Data kelulushidupan ikan mas pasca ujiantang selama 21 hari dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Grafik tingkat kelulushidupan pasca uji tantang

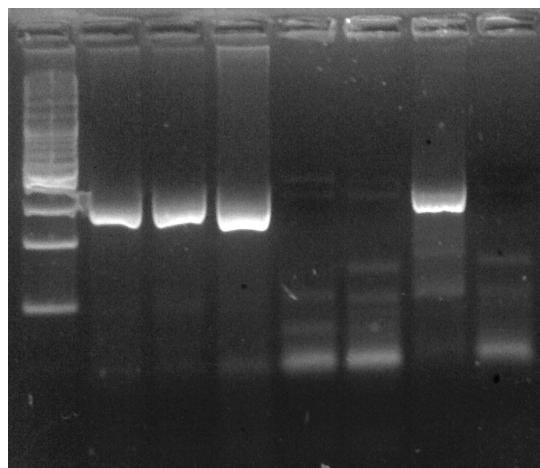
Keterangan: A = Tanpa vaksin
B = Vaksin 10^4 CFU/ml
C = Vaksin 10^5 CFU/ml
D = Vaksin 10^6 CFU/ml
E = Vaksin 10^7 CFU/ml

Berdasarkan Gambar 3, nilai kelulushidupan perlakuan A, B, C, D dan E menunjukkan bahwa adanya perbedaan pengaruh efektifitas vaksin DNA KHV yang ditunjukkan melalui perbedaan taraf kelulushidupan akibat infeksi KHV.

Hasil analisa ragam menunjukkan bahwa pemberian vaksin DNA KHV, melalui metode perendaman berpengaruh sangat nyata terhadap sintasan ikan uji (F hitung > F tabel). Sedangkan berdasarkan uji wilayah Duncan, pemberian vaksin pada perlakuan A berbeda sangat nyata terhadap perlakuan B, C, D dan E. Hal ini menunjukkan bahwa adanya perbedaan sintasan antara ikan uji yang diberi vaksin (perlakuan B, C, D dan E) dengan ikan uji yang tanpa diberi vaksin (perlakuan A).

Elektroforesis

Hasil Elektroforesis pasca uji tantang menunjukkan hasil bahwa ikan yang diberi vaksin dengan dosis 10^4 dan 10^5 CFU/ml masih positif terinfeksi KHV, sedangkan ikan yang diberi vaksin dengan dosis 10^6 dan 10^7 CFU/ml tidak terinfeksi KHV (Gambar 4).



Gambar 4. Hasil elektroforesis pasca uji tantang

Keterangan: A = Tanpa vaksin
B = Vaksin 10^4 CFU/ml
C = Vaksin 10^5 CFU/ml
D = Vaksin 10^6 CFU/ml
E = Vaksin 10^7 CFU/ml
K+ = Kontrol Positif
K- = Kontrol Negatif

Berdasarkan hasil elektroforesis di dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi dosis yang diberikan (10^6 dan 10^7 CFU/ml) maka semakin tinggi pula tingkat efektifitas vaksin DNA tersebut, sedangkan konsentrasi dosis dibawah 10^6 tidak mampu mencegah terjadinya infeksi KHV. Hal ini sesuai dengan pernyataan Lamers and De Haas (1985), bahwa semakin tinggi dosis yang digunakan maka vaksin DNA dapat memproduksi glikoprotein dalam jumlah yang tinggi pula sehingga mampu mencegah terinfeksi KHV.

KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah gejala klinis ikan yang terinfeksi KHV adalah penurunan nafsu makan, respon tanggap berkurang, perubahan warna tubuh, ikan megap - megap, mata cekung dan ditutupi selaput putih, bagian tubuh terasa kesat, sisik mengelupas, sirip geripis, kulit melepuh disertai luka pada permukaan tubuh serta *necrosis* pada insang. Dosis vaksin DNA KHV yang dapat digunakan dalam upaya pencegahan KHV yaitu dosis 10^6 dan 10^7 CFU/ml. Dosis yang lebih rendah dari 10^6 CFU/ml tidak mampu mencegah ikan agar tidak terinfeksi KHV.



SARAN

Saran yang dapat diberikan berdasarkan penelitian ini, sebaiknya dosis yang digunakan dalam upaya pencegahan KHV pada ikan mas dan koi tidak lebih rendah dari 10^6 CFU/ml. Selain itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai vaksin DNA KHV dengan menggunakan skala lapangan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan kali ini penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada kepala laboratorium kesehatan dan lingkungan ikan beserta seluruh staf teknis Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Tawar (BBPBAT) Sukabumi yang telah sangat membantu selama proses penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

BBPBAT Sukabumi. 2009. Uji Lapangan Vaksin DNA untuk Pengendalian Koi Herpes Virus (KHV) pada Ikan Mas. Sukabumi

Ellis, A.E. 1988. General Principles of Fish Vaccination. In Ellis AE, editor. Fish Vaccination. London: Academic Press.

Gillad Oren, Susan Yun, Mark A. Adkison, Keith Way, Neil H. Willits, Herve Bercovier and Ronald P. Hedrick. 2003. Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. *Journal of General Virology* (2003), 84, 2661–2668

Lamers C.H.J. dan M.H.J. De Haas. 1985. Antigen Localization in The Lymphoid Organs of carp (*Cyprinus carpio*). *Cell Tissue Res.* 242: 491-498.

Mudjiutami E, Ciptoroso, Zainun Z. 2006. Uji Toleransi berbagai Strain Ikan Mas terhadap KHV. Abstrak Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Tawar. Sukabumi

Parelberg, A., A. Ronen., M. Hutoran., Y. Smith and M. Kotler. 2005. Protection of cultured *Cyprinus carpio* disease by an attenuated virus vaccine. *J. Vaccine* 23: 3396-3403.

Srinuryati., dan Santika, A. 2009. Uji Vaksin DNA anti KHV dengan Skala Laboratorium. Laporan Perekayasa.

Tidak dipublikasi.

Sunarto, A., Taukhid, A. Rukyani, I. Koesharyani, H. Supriyadi, L. Gardenia, H. Huminto, D.R. Agungpriyono, F.H. Pasaribu, D. Herdikiawan, D. Rukmono and B. Prayitno. 2002. Field investigations on a serious disease outbreak among Koi and common carp (*Cyprinus carpio*) in Indonesia. *Paper presented in 5th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture*, 24-28 November 2002, Gold Cost, Australia.

Tamba, A. 2006. Kerentanan dan Gambaran Darah Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang Terinfeksi Koi Herpes Virus (KHV) [Tesis]. Bogor: Sekolah Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor.

Taukhid, A. Sunarto, Isti K, Hambali S dan L. Gardenia. 2004. Strategi Pengendalian Penyakit Koi herpesvirus (KHV) pada Ikan Mas dan Koi Dalam : Makalah Workshop Pengendalian Penyakit Koi herpesvirus (KHV) pada Budidaya Ikan Air Tawar. Bogor 28 September 2004.

Taukhid, A. M. Lusiatuti., W. Andiyani., Rosidah dan Sriati. 2010. Induksi Kekebalan Spesifik pada Ikan Mas *Cyprinus carpio* Linn. Terhadap Infeksi Koi Herpes Virus (KHV) Melalui Teknik Kohabitasi Terkontrol. *Jurnal Ris. Akuakultur Indonesia* 5(2) : 257-276