

DETEKSI KOI HERPESVIRUS (KHV) PADA IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*) YANG DIINFEKSI SECARA BUATAN

DETECTION OF KOI HERPESVIRUS (KHV) in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) WERE INFECTED BY ARTIFICIALLY INFECTION

Muhammad Sungging Pradana¹, Suwarno² dan Hari Suprpto³

¹Sekolah Pascasarjana Universitas Airlangga
Kampus B Jl. Airlangga 4-6 - Surabaya, 60286 Telp. 031-5041566

²Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
Kampus C Mulyorejo – Surabaya, 60115

³Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga
Kampus C Mulyorejo – Surabaya, 60115 Telp. 031-5033710

Abstract

Koi Herpesvirus (KHV) was formerly known as Cyprinid herpesvirus-3 (CyHV-3) and carp nephritis interstitial and necrosis gill virus (CNGV) is a virus that infects common carp and koi (*Cyprinus carpio* and *C. carpio koi*) in farmed and wild population. KHV cause disease at a temperature of 18-25 °C with mortality rate of 80-90 % in fry and adult fish. Currently KHV also detected in tilapia from the results of monitoring in the field. The presence of KHV in tilapia can occur as a result of maintenance in cages adjacent to the infected carp.

KHV diagnostic method currently based on case definition and PCR (Polymerase Chain Reaction) detection. The basic concept of PCR is one DNA molecule is used to produce two copies, then four, then eight and so forth through multiplication by polymerase. PCR results sometimes indicated the presence of a faint band caused a low amount of virus, so it is necessary to investigate the presence of KHV DNA in tilapia using different doses of infection.

This study aimed to determine the KHV infectivity in nile tilapia were infected by artificially infection and determine dose KHV infection that can infect nile tilapia. The study design used true experimental with with the presentation of descriptive data. Dose of viral infection are 1 ID₅₀, 10 ID₅₀, 100 ID₅₀ and 1000 ID₅₀.

The results showed that no clinical symptoms of KHV infected in nile tilapia. The results of electrophoresis of PCR products showed that the mucus of nile tilapia were infected with a 1000 ID₅₀ immersion dose showed thin bands. The same results are also shown in the gill of nile tilapia infected by gill spray at 1000 ID₅₀ dose. Fish were infected by injection, KHV was not detected in mucus, gill, kidney and liver. The results above show nile tilapia cannot be infected by KHV on various treatment.

Keywords : KHV, nile tilapia, PCR

Pendahuluan

Koi Herpesvirus (KHV) yang juga dikenal sebagai *Cyprinid herpesvirus-3* (CyHV-3) atau *carp nefritis interstitial and necrosis gill virus* (CNGV) (Minamoto *et al.*, 2011) merupakan virus yang menjadi salah satu ancaman yang paling penting untuk ikan mas dan ikan koi yang dibudidayakan (Bergmann *et al.*, 2010). KHV merupakan patogen ikan yang dominan menginfeksi ikan mas dan ikan koi (*Cyprinus carpio* dan *C. carpio koi*) dan telah menyebabkan penyakit dan kematian massal populasi spesies ini baik dalam budidaya maupun alam liar (Garver *et al.*, 2010). KHV menyebabkan penyakit setiap musim semi dan musim gugur, pada saat suhu air mencapai 18-25°C (Lio-Po, 2011) dengan angka kematian di

kolam yang terinfeksi yaitu 80-90% pada benih serta ikan dewasa (Perelberg *et al.*, 2003). Maka sejak tahun 2007 KHV masuk untuk daftar penyakit yang dilaporkan Organisasi Kesehatan Hewan Dunia atau *Office International des Epizooties* (OIE) (Lio-Po, 2011).

Data hasil pemantauan hama dan penyakit ikan karantina (HPIK) yang dilakukan Unit Pelaksana Teknis (UPT) karantina di Indonesia selama 3 tahun terakhir menunjukkan KHV juga terdeteksi pada ikan nila (Rianto, 2014). Di Indonesia, ikan nila dipelihara dalam keramba yang berdekatan dengan keramba ikan mas yang terinfeksi alami dengan KHV (Lio-Po, 2011). Pemeliharaan semacam itu dapat menyebabkan virus menyerang ikan nila dan

terdeteksi pada saat pengujian di dalam laboratorium.

Metode diagnosis KHV saat ini didasarkan pada definisi kasus dan deteksi PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Konsep dasar PCR yaitu satu molekul DNA digunakan memproduksi dua kopi DNA, kemudian empat, delapan dan seterusnya melalui penggandaan yang dilakukan enzim polimerase. Hasil PCR terkadang ditunjukkan adanya *band* yang samar yang diakibatkan jumlah virus yang rendah, sehingga perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui adanya DNA KHV pada ikan nila menggunakan dosis infeksi yang berbeda.

Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui infeksi KHV pada ikan nila yang diinfeksi secara buatan dan mengetahui dosis infeksi KHV yang dapat menginfeksi ikan nila.

Materi dan Metode

Sampel

Dalam penelitian ini terdapat 3 perlakuan inokulasi dengan masing-masing 5 perlakuan dosis yaitu 1 kontrol dan 4 perlakuan infeksi virus pada ikan. Jumlah ikan setiap perlakuan dosis 5 ekor, sehingga jumlah total ikan 65 ekor. Teknik pengambilan sampel menggunakan *simple random sampling* yaitu teknik pengambilan sampel yang memberikan kesempatan yang sama kepada setiap anggota yang ada dalam suatu populasi untuk dijadikan sampel (Siregar, 2011).

Pengambilan Filtrat Virus

Isolasi virus dilakukan dengan mengambil organ dari ikan yang terinfeksi yang sebelumnya dilakukan pengujian menggunakan PCR dengan membaca pita DNA yang positif pada 290 bp. Isolasi virus dilakukan dengan mengambil bagian insang, ginjal, limpa dan hati yang kemudian ditimbang dan ditumbuk menjadi pasta halus dalam mortar steril dingin, dihomogenisasi sebanyak 9 kali dari berat sampel dengan *phosphate-buffered saline* (PBS) tanpa magnesium dan kalsium. Setelah itu organ dihomogenkan dengan mixer. Organ yang telah dihomogenkan kemudian disentrifugasi pada 2500 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C, dan supernatan disaring melalui membran filter 0,45 µm (Lio-Po *et. al.*, 2009). Hasil penyaringan kemudian diencerkan dengan kelipatan 10 hingga 10⁻⁶.

Penyuntikan pada Ikan Koi

Hasil pengenceran selanjutnya disuntikkan ke ikan sebanyak 200 µl secara intraperitoneal (Sunarto *et. al.*, 2005^b). 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 pakan komersial sebanyak 1% berat badan setiap hari (El-Matbouli *and* Soliman, 2011).

Penentuan Titer Virus

Ikan yang telah disuntik selanjutnya dihitung mortalitasnya dan dimasukkan ke dalam rumus Reed-Muench (Lennette, 1969) :

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

Keterangan:

PD: Proportionate Distance atau selang proporsi
Kemudian dilakukan penghitungan untuk mengetahui nilai ID₅₀ yaitu konsentrasi dimana ikan terinfeksi sebanyak 50% dari populasi pada batas waktu tertentu. Selanjutnya menentukan dosis dari titer virus dengan cara pengenceran:

1 ID₅₀ : stok virus diencerkan 5000x

10 ID₅₀ : stok virus diencerkan 500x

100 ID₅₀ : stok virus diencerkan 50x

1000 ID₅₀ : stok virus diencerkan 5x

Inokulasi KHV pada Ikan Nila

Inokulasi virus pada ikan nila dilakukan melalui perendaman, penyuntikan dan semprot insang menggunakan dosis dari ID₅₀ yang berbeda sebanyak 1 ID₅₀, 10 ID₅₀, 100 ID₅₀ dan 1000 ID₅₀/ml serta penyuntikan menggunakan PBS tanpa virus sebagai kontrol. Perendaman dilakukan dengan merendam ikan dalam 2 liter air yang telah diberi isolat virus selama 2 jam. Suhu selama perendaman dipertahankan pada 22-24°C. Setelah itu ikan dipindah ke dalam akuarium pemeliharaan dan dipelihara selama 8 hari. Penyuntikan dilakukan dengan menyuntik isolate virus ke ikan secara intraperitoneal sebanyak 0,2 ml/ ikan. Semprot insang dilakukan dengan menyemprot insang ikan dengan isolat virus sebanyak 0,1 ml/ ikan. Selanjutnya dilakukan pengujian menggunakan metode PCR pada organ insang, ginjal, hati dan lendir pada tiap perlakuan ikan nila untuk mengetahui adanya DNA KHV pada ikan nila.

Pengujian menggunakan Metode PCR

Prosedur pelaksanaan PCR untuk KHV dilakukan menurut SNI: 2009 diawali ekstraksi DNA yaitu mengambil organ sebanyak 25 mg-50 mg dan ditambahkan 1000 µl larutan DNAzol, kemudian hancurkan menggunakan *pellet pestle* dan sentrifugasi 11.000 rpm (r=7 cm) selama 10 menit. Supernatan sebanyak 500

μl – 700 μl dipindahkan ke dalam mikrotube baru dan ditambahkan 100% alkohol 500 μl dan dicampurkan dengan cara dibolak-balik. Supernatan disimpan pada suhu 25-30°C selama 1-3 menit kemudian disentrifugasi 7.000 rpm ($r=7\text{ cm}$) selama 1-2 menit.

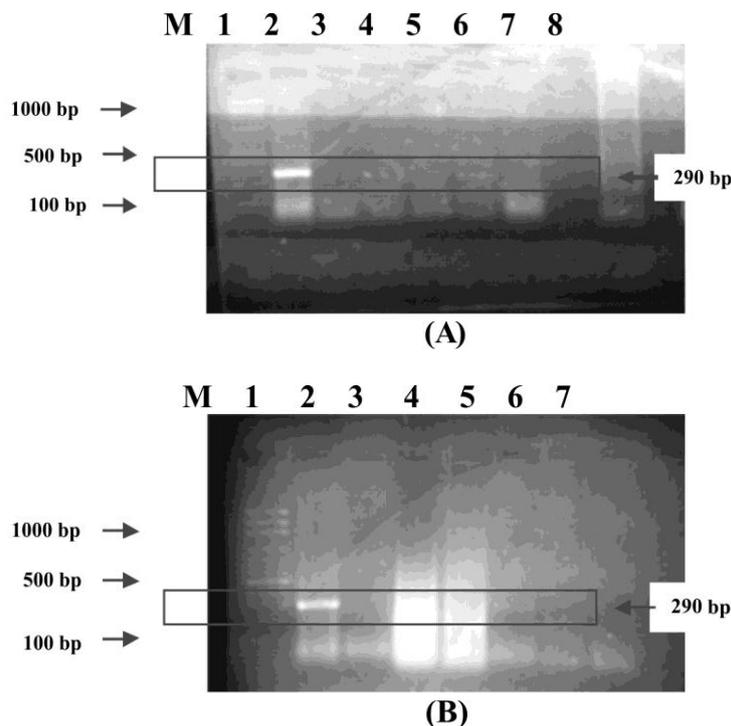
Supernatan selanjutnya dibuang, kemudian *pellet* dicuci sebanyak 2 kali dengan menambahkan 800-1000 μl alkohol 75%, dicampur dengan cara membolak-balikkan sebanyak 6 kali dan dидiamkan beberapa saat hingga DNA terkumpul di dasar mikrotube. Setelah itu alkohol dibuang dengan menggunakan pipet (atau dengan mensentrifugasi pada 7.000 rpm ($r=7\text{ cm}$) selama 1-2 menit kemudian buang alkohol) kemudian dikeringkan selama 5-15 detik. DNA dilarutkan segera setelah supernatan dibuang dengan menambahkan 200-300 μl campuran 8 mM NaOH (untuk 50 μl 8 mM NaOH ditambahkan 1,6 μl 0,1-1 mM HEPES) atau ddH₂O.

Tahap amplifikasi dimulai dengan menentukan komposisi pereaksi hingga 25 μl yaitu HotStarTaq_ Master Mix (QIAGEN) sebanyak 12,5 μl , Primer F290 (20 μM) sebanyak 0,5 μl , Primer R290 (20 μM)

sebanyak 0,5 μl , *template* DNA sebanyak 2 μl , dan DNase-free water sebanyak 9,5 μl . Setelah itu dilakukan pengaturan suhu dan siklus *thermocycler*, yaitu tahap *pre-denaturation* (94°C) selama 30 detik sebanyak 1 siklus, tahap *denaturation* (94°C) selama 30 detik sebanyak 40 siklus, tahap *annealing* (63°C) selama 30 detik sebanyak 40 siklus, tahap *extension* (72°C) selama 30 detik sebanyak 40 siklus, dan tahap *final elongation* (72°C) selama 10 menit sebanyak 1 siklus. Produk hasil amplifikasi selanjutnya dianalisis dengan elektroforesis pada gel agarosa 1% setelah sebelumnya diberi pewarnaan dengan 0,05% *ethidium bromide*.

Hasil dan Pembahasan

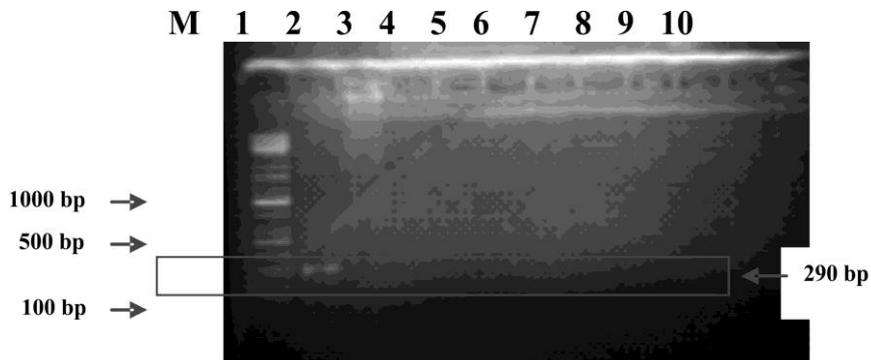
Ikan nila tidak menunjukkan gejala klinis pada perlakuan perendaman, penyuntikan maupun semprot insang dengan dosis 1 ID₅₀, 10 ID₅₀, 100 ID₅₀ dan 1000 ID₅₀. Ikan nila dari tiap perlakuan dosis selanjutnya dilakukan pemeriksaan menggunakan PCR untuk mengetahui adanya DNA KHV. Hasil elektroforesis produk PCR dapat dilihat pada Gambar 1, 2, 3 dan 4.



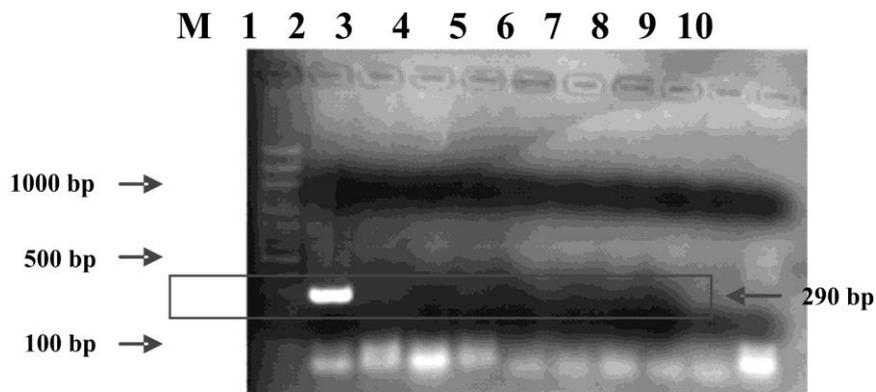
Gambar 1. Hasil elektroforesis sampel insang dan lendir ikan nila pada perlakuan perendaman. Keterangan: (A) M- marker 100 bp, 1- kontrol positif, 2- kontrol negatif, 3- lendir ikan kontrol, 4- insang ikan kontrol, 5- lendir ikan dosis 1000 ID₅₀, 6- lendir ikan dosis 100 ID₅₀, 7- lendir ikan dosis 10 ID₅₀, 8- lendir ikan dosis 1 ID₅₀. (B) M- marker 100 bp, 1- kontrol positif, 2- kontrol negatif, 3- insang ikan dosis 1000 ID₅₀, 4- insang ikan dosis 100 ID₅₀, 5- lendir ikan dosis 1000 ID₅₀, 6- insang ikan dosis 10 ID₅₀, 7- insang ikan dosis 1 ID₅₀.



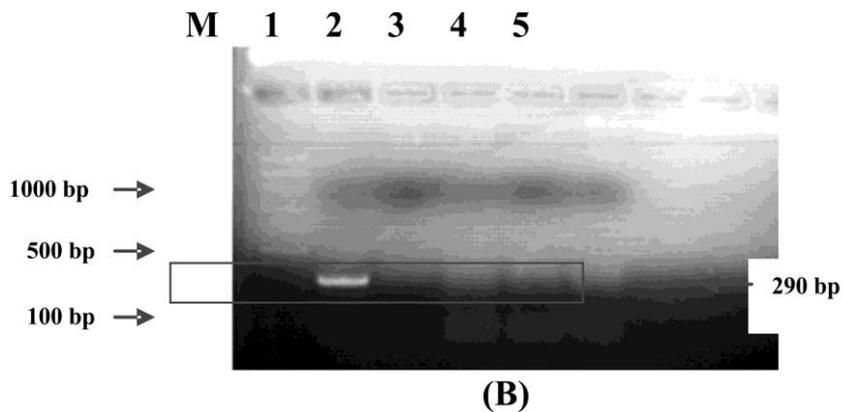
Gambar 2. Hasil elektroforesis sampel insang dan lendir ikan nila pada perlakuan semprot insang. Keterangan: M- marker 100 bp, 1- kontrol positif, 2- kontrol negatif, 3- insang ikan dosis 1 ID₅₀, 4- insang ikan dosis 10 ID₅₀, 5- insang ikan dosis 100 ID₅₀, 6- insang ikan dosis 1000 ID₅₀, 7- lendir ikan dosis 1 ID₅₀, 8- lendir ikan dosis 10 ID₅₀, 9- lendir ikan dosis 100 ID₅₀, 10- lendir ikan dosis 1000 ID₅₀, 11- kontrol positif.



Gambar 3. Hasil elektroforesis sampel insang dan lendir ikan nila pada perlakuan penyuntikan. Keterangan: M- marker 100 bp, 1- kontrol positif, 2- kontrol negatif, 3- insang ikan dosis 1 ID₅₀, 4- insang ikan dosis 10 ID₅₀, 5- insang ikan dosis 100 ID₅₀, 6- insang ikan dosis 1000 ID₅₀, 7- lendir ikan dosis 1 ID₅₀, 8- lendir ikan dosis 10 ID₅₀, 9- lendir ikan dosis 100 ID₅₀, 10- lendir ikan dosis 1000 ID₅₀.



(A)



Gambar 4. Hasil elektroforesis sampel ginjal dan hati ikan nila. Keterangan: (A) M- marker 100 bp, 1- kontrol positif, 2- kontrol negatif, 3- ginjal ikan kontrol, 4- hati ikan kontrol, 5- ginjal ikan dosis 1000 ID₅₀, 6- ginjal ikan dosis 100 ID₅₀, 7- ginjal ikan dosis 10 ID₅₀, 8- ginjal ikan dosis 1 ID₅₀, 9- kontrol negatif, 10- hati ikan dosis 1000 ID₅₀. (B) M- marker, 1- kontrol positif, 2- kontrol negatif, 3- hati ikan dosis 100 ID₅₀, 4- hati ikan dosis 10 ID₅₀, 5- hati ikan dosis 1 ID₅₀.

KHV tidak hanya menyerang ikan mas dan ikan koi, tetapi juga ikan air tawar lain seperti ikan nila. Akan tetapi gejala klinis ikan yang terserang tidak nampak seperti ikan mas dan ikan koi. Hal itu bisa dilihat dari hasil penelitian ini yang menggunakan berbagai dosis yang berbeda. Tidak adanya gejala klinis pada ikan nila disebabkan virus ini memiliki kisaran inang yang sangat sempit (Perelberg *et al.*, 2003). Walaupun ikan nila tidak menunjukkan gejala klinis, akan tetapi hasil PCR pada sampel lendir yang diberi dosis perendaman 1000 ID₅₀ dan sampel insang yang diberi dosis semprot insang 1000 ID₅₀ menunjukkan adanya pita/*band* yang samar/ tipis yang terletak sejajar dengan kontrol positif. Hasil ini sama dengan pemantauan KHV pada ikan nila di Tuban dimana secara eksternal ikan nila yang terserang KHV tidak menunjukkan gejala klinis, akan tetapi pada pemeriksaan laboratorium terdapat pita/*band* yang sejajar dengan kontrol positif (Suprpto dan Yulia, 2012).

Hasil PCR tipis/ samar juga menunjukkan adanya infeksi laten dari virus. Salah satu karakteristik unik dari semua virus herpes adalah kemampuan untuk membentuk infeksi laten, yang dapat diaktifkan dalam berbagai kondisi stress (Xu *et al.*, 2013). Latensi virus disebabkan banyak virus herpes menyandikan gen yang dapat memodulasi respon imun inang dan menghindari pertahanan kekebalan inang. Dua gen supresor kekebalan tubuh ikan, TNFR dan IL-10, dapat dikodekan oleh genom KHV. Hal ini menunjukkan bahwa gen modulasi kekebalan disimpan dan dapat memainkan peran penting dalam kemampuan

virus untuk menghindari sistem kekebalan tubuh inang (Xu *et al.*, 2013).

Hasil PCR pada sampel insang, ginjal dan hati pada berbagai dosis perlakuan perendaman tidak menunjukkan adanya KHV. Hal ini menunjukkan bahwa virus tidak menginfeksi ikan nila walaupun pada ikan koi dan ikan mas KHV dapat masuk melalui kulit ikan. Seperti pendapat Costes *et al.* (2009) bahwa di samping virus masuk, kulit bisa menjadi jaringan target untuk virus. Hasil penelitian Adamek *et al.* (2013) bersama-sama dengan hasil sebelumnya Costes *et al.* (2009), menunjukkan bahwa replikasi KHV pada kulit akan memudahkan infeksi ke individu lain melalui rute “kulit ke air ke kulit” atau “kulit ke kulit”. KHV menginfeksi pada kulit ikan dengan mengurangi gen yang mengkode beberapa komponen mukosa penghalang dari lapisan lendir seperti mucin 5B, AMP, beta defensin 1 dan 2, dan protein- claudin 23 dan 30 (Adamek *et al.*, 2013).

Ikan nila yang diberi perlakuan semprot pada insang dengan berbagai dosis menunjukkan hasil yang sama yaitu tidak terdeteksinya KHV pada lendir, ginjal dan hati. KHV yang menyerang ikan koi dan ikan mas umumnya menginfeksi bagian insang. Kemungkinan bahwa virus bereplikasi pada insang yang sakit dan kemudian masuk ke dalam air adalah sesuai dengan penyebaran cepat dan efisien penyakit menular ini. Hal ini analog dengan virus pernapasan pada mamalia yang menginfeksi epitel pernapasan, bereplikasi di sana, dan menyebar melalui tetesan udara dan aerosol. Hal ini mungkin juga menjadi cara

yang paling umum penyebaran virus akuatik (Pikarsky *et al.*, 2004).

Ikan nila yang diberi perlakuan penyuntikan intraperitoneal, DNA KHV tidak terdeteksi pada lendir, insang, ginjal dan hati pada berbagai dosis penyuntikan (1 ID₅₀- 1000 ID₅₀). Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Rahmawati (2010) pada pemeriksaan ikan nila menggunakan metode PCR yang diberi perlakuan penyuntikan dengan KHV juga menunjukkan hasil yang negatif.

Pada penelitian ini dimana menggunakan ikan nila sebagai subjek penelitian menunjukkan ikan tidak terinfeksi KHV dan tidak menunjukkan gejala klinis. Hal ini disebabkan ikan nila merupakan spesies yang mampu untuk mentolerir berbagai kondisi lingkungan (Grammer *et al.*, 2012). Ikan tetap dapat hidup pada suhu permisif KHV (18-25°C) dimana virus dapat menginfeksi ikan mas dan ikan koi dikarenakan batas bawah suhu mematikan bagi ikan nila yaitu 11-12°C (FAO, 2012).

Kesimpulan

Kesimpulan yang didapat dari penelitian ini yaitu ikan nila (*Oreochromis niloticus*) tidak dapat terinfeksi oleh KHV. Hal ini ditunjukkan dengan tidak terdeteksinya KHV pada lendir, insang, ginjal dan hati melalui metode PCR dengan panjang amplicon 290 bp pada berbagai perlakuan. Ikan nila juga tidak menunjukkan gejala klinis terinfeksi KHV. Pada perlakuan perendaman, KHV tidak terdeteksi pada lendir, insang, ginjal dan hati ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dengan dosis 1000 ID₅₀, 100 ID₅₀, 10 ID₅₀ dan 1 ID₅₀. Begitu pula dengan perlakuan semprot insang dan penyuntikan intraperitoneal. Hasil penelitian menggunakan PCR konvensional menunjukkan KHV tidak terdeteksi pada lendir, insang, ginjal dan hati pada berbagai dosis perlakuan. Sebagai tambahan, dapat dicoba dengan jenis PCR lain seperti nested PCR maupun Real-Time PCR, atau dapat menggunakan metode lain untuk lebih memberikan hasil yang lebih optimal.

Daftar Pustaka

Adamek, M., H. Syakuri, S. Harris, K. L. Rakus, G. Brogden, M. Matras, I. Irnazarow, D. Steinhagen. 2013. Cyprinid herpesvirus 3 Infection Disrupts The Skin Barrier of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Veterinary Microbiology* 162: 456-470.

Bergmann, S. M., M. Riechardt, D. Fichtner, P. Lee and J. Kempter. 2010. Investigation on the diagnostic

sensitivity of molecular tools used for detection of koi herpesvirus. *Journal of Virology Methods* 163: 229-233.

Costes, B., V. S. Raj, B. Michel, G. Fournier, M. Thirion, L. Gillet, J. Mast, F. Lieffrig, M. Bremont and A. Vanderplasschen. 2009. The Major Portal Entry of Koi Herpesvirus in *Cyprinus carpio* Is the Skin. *Journal of Virology*: 2819-2830.

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.

FAO. 2012. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Oreochromis niloticus*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Rakocy, J. E. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. 12 pp.

Garver, K. A., L. Al-Hussinee, L. M. Hawley, T. Schroeder, S. Edes, V. LePage, E. Contador, S. Russel, S. Lord, R. M. W. Stevenson, B. Souter, E. Wright and J. S. Lumsden. 2010. Mass Mortality Associated with Koi Herpesvirus in Wild Common Carp in Canada. *Journal of Wildlife Disease* 46(4): 1242-1251.

Grammer, G. L., W. T. Slack, M. S. Peterson, and M. A. Dugo. 2012. Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) Establishment in Temperate Mississippi, USA: Multi-Year Survival Confirmed by Otolith Ages. *Aquatic Invasions* Vol. 7: 367-376.

Lennette, E. H. 1969. General Principles Underlying Laboratory Diagnosis of Viral and Rickettsial Infections. Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Infections. Fourth Edition. American Public Health Association, Inc. New York. pp 47-49.

Lio-Po, G. D., *et. al.* 2009. Surveillance of Emerging Fish Viral Pathogens in Some Southeast Asian Countries. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 61(3): 208-214.

Lio-Po, G. D. 2011. Recent development in the study and surveillance of koi herpesvirus (KHV) in Asia. *Diseases in Asian Aquaculture* VII: 13-28.

Minamoto, T., M. N. Honjo, H. Yamanaka, N. Tanaka, T. Itayama and Z. Kawabata. 2011. Detection of cyprinid herpesvirus-3 DNA in lake plankton.

- Research in Veterinary Science 90: 530-532.
- Perelberg, A., M. Smirnov, M. Hutoran, A. Diamant, Y. Bejerano and M. Kotler. 2003. Epidemiological Description of A New Viral Disease Afflicting Cultured *Cyprinus carpio* in Israel. The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh 55(1): 5-12.
- Pikarsky, E., Ronen, A., Abramowitz, J., Levavi-Sinan, B., Hutoran, M., Shapira, Y., Steinetz, M., Perelberg, A., Soffer, D., and Koller, M. 2004. Pathogenesis of Acute Viral Disease Induced in Fish by Carp Interstitial Nephritis and Gill Necrosis Virus. Journal of Virology, 78: 9554-9551.
- Rahmawati W., T. 2010. Pencarian Inang KHV (*Koi herpesvirus*) dari Beberapa Jenis Ikan: Koi (*Cyprinus carpio*), Koki (*Carassius auratus*), Komet (*Carassius auratus auratus*), Nila (*Oreochromis niloticus*) dan Lele (*Clarias batrachus*). Fakultas Perikanan dan Kelautan. Universitas Airlangga. 41 hal.
- Rianto W., B. 2014. Analisis Filogenetik Gen *Thymidin Kinase Koi Herpesvirus* (KHV) Beberapa Ikan Air Tawar di Sentra Budidaya Provinsi Jawa Timur. Tesis Program Pascasarjana. Universitas Airlangga. Surabaya. 61 pp.
- Siregar, S. 2011. Statistika Deskriptif untuk Penelitian. Dilengkapi Perhitungan Normal & Aplikasi SPSS versi 17. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta. 324 hal.
- Sunarto, A., Taukhid, A. Rukyani, I. Koesharyani, H. Supriyadi and L. Gardenia. 2005. Field Investigations on a Serious Disease Outbreak among Koi and Common Carp (*Cyprinus carpio*) in Indonesia. Diseases in Asian Aquaculture V. hal. 125-135.
- Suprpto, H. dan Yulia K. 2012. Pemantauan Virus dengan Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) di Pantai Utara Jawa Timur. Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan Vol. 4 (1): 65-71.
- Xu, J. R., J. Bently, L. Beck, A. Reed, T. Miller-Morgan, J. R. Heidi, M. L. Kent, D. D. Rockey and L. Jin. 2013. Analysis of koi herpesvirus latency in wild common carp and ornamental koi in Oregon, USA. Journal of Virological Methods 187: 372-379.