

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Luas daratan Indonesia menyimpan perairan umum termasuk di dalamnya perairan tawar yang cukup luas. Selain dimanfaatkan untuk konsumsi, sumber daya alam yang berasal dari perairan tawar itu juga dimanfaatkan untuk memenuhi selera atau hobi dalam memelihara ikan terutama ikan hias. Salah satu ikan yang banyak diminati dan dibudidayakan secara luas adalah ikan koi. Menurut Bachtiar (2002), hal ini disebabkan koi memiliki warna yang indah dan eksotis serta bentuk dan gerakan yang menarik. Selain itu, harga ikan koi yang cukup menggiurkan, sehingga ajar kalau pangsa pasar koi pun makin ramai. Anggapan sebagian masyarakat kepada ikan koi adalah merupakan dewa karena mampu memberikan hoki dan keberuntungan, serta dianggap mampu memberikan ketenangan dan kedamaian.

Sebagai ikan hias, ikan koi juga rentan terserang hama dan penyakit, bahkan dapat menjadi agen atau *carrier* terhadap penyakit tertentu. Kejadian di Subang, Jawa Barat pada bulan Mei 2002, ikan mas mati karena dilaporkan terserang penyakit "melepuh". Berkaitan dengan hal tersebut, ikan koi adalah sebagai jenis ikan yang sama, koi juga mengalami serangan serupa yang diduga penyakit tersebut berasal dari pemasukan (impor) ikan koi dari luar negeri yang sudah terserang di Negara asalnya (Amri dan Khairuman , 2002).

Gejala-gejala yang tampak dari penyakit tersebut menunjukkan bahwa penyakit tersebut menunjukkan bahwa penyakit tersebut disebabkan oleh virus herpes yang menyerang dan menghilangkan kekebalan tubuh. Sistem kekebalan tubuh atau imun ikan dapat ditingkatkan dengan memberikan vitamin C atau vitamin B melalui pakan atau disuntikkan ke tubuh ikan atau dengan memberikan obat kekebalan *immunostimulan*. Akan tetapi di Negara Indonesia sampai saat ini belum ada obat yang

sudah teruji untuk digunakan menangkal serangan penyakit akibat *koi herpes virus* (KHV), oleh karena itu perlu adanya identifikasi virus herpes yang menyerang ikan koi sejak dini. Dengan demikian ikan yang bersifat carrier tersebut dapat dilakukan tindakan pencegahan sejak dini pula, yaitu dengan cara mengisolasi ikan yang teridentifikasi terinfeksi KHV dari ikan lainnya. Salah satu metode yang sudah sering digunakan untuk mengidentifikasi virus herpes ini adalah dengan uji imunositokimia. Metode pemeriksaan penunjang alternatif lain yang ingin diterapkan yaitu uji Imunositokimia menurut metode *Streptavidin Biotin* (SB).

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah apakah uji Imunositokimia dengan metode Streptavidin Biotin (SB) merupakan salah satu uji diagnostik alternatif yang handal serta lebih sederhana dan praktis untuk identifikasi Koi Herpes Virus dan bagaimanakah manajemen budidaya pada kolam budidaya Kelompok Tani Sumber Harapan, Kabupaten Blitar, Provinsi Jawa Timur?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui validitas uji imunositokimia dengan teknik Streptavidin Biotin (SB) yang telah dikembangkan sebagai sarana penunjang laboratorium untuk pemeriksaan *koi herpes virus* serta hasilnya diharapkan sepadan dengan teknik pemeriksaan lainnya. Tujuan lainnya adalah untuk mengetahui manajemen pada kolam budidaya ikan koi di Kelompok Tani Sumber Harapan, Kabupaten Blitar, Provinsi Jawa Timur terkait dengan adanya virus KHV.

1.4 Kegunaan

Diharapkan dari penelitian ini dapat memberikan informasi mengenai metode imunositokimia dengan teknik Streptavidin Biotin dalam mendeteksi sedini mungkin penyakit KHV yaitu melalui metode imunositokimia sehingga ikan yang teridentifikasi terinfeksi KHV segera dapat diisolasi dari ikan lainnya untuk menghindari kematian massal pada budidaya ikan koi tersebut.

1.5 Hipotesa

- H_0 = diduga bahwa metode imunositokimia tidak mampu mendeteksi penyakit KHV pada ikan koi dengan biaya yang lebih murah, dalam waktu yang lebih singkat namun dapat memberikan hasil yang tepat dan akurat.
- H_1 = diduga bahwa metode imunositokimia mampu mendeteksi penyakit KHV pada ikan koi dengan biaya yang lebih murah, dalam waktu yang lebih singkat namun dapat memberikan hasil yang tepat dan akurat.

1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan pada kolam budidaya air tawar Kelompok Tani Sumber Harapan Desa Kemloko, Kecamatan Nglegok, Kabupaten Blitar, Jawa Timur dan akuarium percobaan di Laboratorium Ilmu-Ilmu Perairan dan Bioteknologi FPIK Universitas Brawijaya Malang. Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Mei 2011 – Juli 2011.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Koi (*Cyprinus carpio koi*)

2.1.1 Klasifikasi Ikan Koi (*Cyprinus carpio koi*)



Gambar 1. Ikan Koi (*Cyprinus carpio koi*)

Menurut Devito dan Skomal (2001), klasifikasi ikan koi adalah sebagai berikut:

Phylum	: Vertebrata
Subfilum	: Gnastomata
Kelas	: Osteichthyes
Subkelas	: Actinopterygii
Ordo	: Cypriniformes
Sub ordo	: Cyprinioidei
Family	: Cyprinidae
Genus	: Cyprinus
Spesies	: <i>Cyprinus carpio</i>

2.1.2 Kebiasaan Hidup dan Syarat Hidup

Ikan koi (*C. carpio koi*) termasuk salah satu jenis ikan yang bisa beradaptasi dengan baik di lingkungan tempat hidupnya. Ikan ini bisa hidup di perairan di daerah dataran tinggi atau pegunungan sampai perairan di daerah dataran rendah. Sebagai ikan hias yang memiliki tubuh berukuran besar, ikan koi dipelihara di tempat yang luas,

seperti kolam. Air yang digunakan untuk budidaya ikan koi di kolam atau media lainnya berasal dari berbagai sumber, yang terpenting air yang terbaik untuk kehidupan ikan koi biasanya bebas dari polutan atau tidak tercemar. Air yang mengandung klorin biasanya akan dapat menyebabkan iritasi sisik dan insang, bahkan dapat mengakibatkan turunnya nafsu makan ikan koi (Amri dan Khairuman, 2002).

Menurut Perwira (2008), secara fisikal bentuk badan ikan koi bisa dilihat pada saat ikan koi tersebut berenang, karena bentuk badan yang sempurna akan berpengaruh langsung pada gaya berenangnya, walaupun seekor koi mempunyai corak warna yang sangat indah dan montok, tapi jika siripnya tidak lengkap, koi tersebut dinilai jelek. Hal ini alaupun tidak mutlak, sebaiknya kedua sisi badannya simetris. Harus diingat, seekor induk betina yang sedang “mengandung” kondisi perutnya lebih buncit. Ini tidak boleh sampai disalah artikan bahwa ikan koi tersebut perutnya tidak normal. Ada dua bentuk tubuh yang abnormal yaitu cacat dan kurang makan. jika seekor koi tidak bersirip atau matanya hilang sebelah, jelas koi tersebut cacat dan sekali-sekali tidak boleh dipilih walaupun dijual murah. Namun jika ada koi berperut buncit di salah satu sisi badannya, atau ada sebuah rongga kecil pada kepalanya, kalau kita berminat koi seperti itu boleh diambil, dengan harga yang lebih murah.

Dalam memelihara ikan koi yang baik, hal yang perlu diperhatikan antara lain tingkat keasaman (pH) air harus dipertahankan antara 7 – 7,2. Bahkan, menurut para ahli, ikan masih bisa hidup di air dengan pH hingga mencapai 8,5. Oksigen terlarut juga sangat diperlukan ikan koi antara 2 – 2,5 mg/L. sementara itu, di daerah tropis seperti Indonesia, ikan koi dapat hidup pada kisaran suhu 24 – 28 °C (Amri dan Khairuman, 2002).

2.2 Penyakit Viral

Menurut Irianto (2005), ukuran virus sangat kecil, sehingga sulit untuk dideteksi.

Ada sejumlah teknik yang digunakan untuk identifikasi awal virus, yaitu:

1. Menggunakan mikroskop elektron yang untuk memvisualisasi virus di dalam sel jaringan.
2. Menumbuhkan virus di laboratorium menggunakan *cell-lines*, yaitu melakukan kultur sel jaringan ikan di laboratorium (*in vitro*) pada media tertentu dan digunakan untuk menumbuhkan virus. Karena sifat virus yang memiliki inang dan organ atau jaringan target spesifik, maka untuk virus harus ditumbuhkan pada kultur sel dari jaringan dan spesies ikan yang sesuai.
3. Identifikasi virus menggunakan teknik serologi, menggunakan serum dari hewan inang yang mengandung antibody spesifik terhadap virus tertentu. Dengan demikian manakala virus (sebagai antigen) kontak dengan serum akan terjadi aglutinasi sebagai respon antibody terhadap antigen.
4. Menggunakan PCR dan *sequencing* DNA.
5. Secara imunokimia/imunositokimia.

Penggunaan teknik serologi untuk pengenalan infeksi virus menghadapi kendala karena antibody baru dapat tersedia manakala virus dapat diisolasi dan dikembangkan melalui *cell lines*. Dengan demikian pengenalan bahwasabah berasal dari infeksi virus umumnya dikenali melalui pengamatan dengan electron mikroskop sekaligus pengamatan karakter atau gejala-gejala penyakit yang ditunjukkan oleh hewan. Bentuk pengamatan lain yang dilakukan yaitu penggunaan teknik PCR serta imunohistokimia (Sunarto, 2004).

Menurut Smail dan Munro (1989) dalam Irianto (2005), akibat infeksi virus terhadap sel dapat beragam, yaitu:

1. Perubahan yang dapat pulih kembali, yaitu munculnya pembengkakan dan kekeruhan pada sel yang dapat dilihat melalui pengamatan histologis.
2. Perubahan yang tidak dapat pulih kembali, biasanya menyebabkan kematian, peristiwa semacam ini disebut efek sitofatik (*cytophatic effect*, CPE).
3. Perubahan yang tidak mungkin pulih kembali biasanya mengarah ke kerusakan atau hilangnya fungsi-fungsi tertentu, misalnya sekresi endokrin.
4. Transformasi menjadi suatu keadaan neoplastik, misalnya OMV (*Oncorhynchus masou virus*).
5. Infeksi tetap, asam nukleat virus mungkin terintegrasi ke dalam genom dengan secara sporadic menginfeksi sel-sel lain yang sehat, bereplikasi dan melepaskan virion-virion baru, misalnya pada CCV, atau secara berkelanjutan melakukan replikasi dan melepaskan virion-virion baru, misalnya pada IPNV.

Infeksi virus dapat muncul dalam beberapa bentuk yaitu:

1. Inang tidak menunjukkan gejala klinis dan virus tereliminasi
2. Tidak ada gejala klinis tetapi infeksi tetap berlangsung.
3. Inang sakit dan mati.
4. Inang secara klinis sakit, sembuh dan virus berhasil dieliminasi.
5. Inang dapat sembuh dari sakit tetapi infeksi tetap berlangsung tanpa menunjukkan gejala klinis.

Beragam virus yang diketahui menginfeksi ikan air tawar dan air laut di daerah tropik atau beriklim sedang dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Virus ikan dan hewan inangnya

Virus	Nama Virus	Inang
Iridovirus	<i>Lymphositic virus</i>	142 spesies teleostei air laut dan tawar
	<i>Goldfish iridovirus</i> <i>Carp gill necrosis iridovirus</i> <i>Cichlid iridovirus</i> <i>Erythrocytic necrosis virus (ENV)</i>	Ikan mas hias (<i>Carassius auratus</i>) Ikan mas (<i>Cyprius carpio</i>) <i>Ramirez dwarf cichlid</i> (<i>Apistograma ramirezi</i>) 21 spesies teleostei air laut
Herpes Virus	<i>Channel Catfish Virus (CCV)</i> <i>Herpes Virus Cyprinid</i> <i>Herpes Virus Salmonis (HPV)</i> <i>Onchorhyncus Masou Virus (OMV)</i> <i>Pacific Cod Herpesvirus</i> <i>Koi Herpes Virus (KHV)</i>	<i>Ictalurus punctatus</i> <i>C. carpio</i> Trout Pelangi <i>O. masou</i> Cod Pasifik (<i>Gadus macrocephalus</i>) <i>C. carpio, C. carpio ssp. Koi</i>
	Birnavirus	<i>Infectious Pancreatic Necrosis (IPNV)</i>
Adenovirus	<i>Cod Adenovirus</i> <i>Dab adenovirus</i>	Cod Atlantik (<i>G. morhua</i>) Dab (<i>Limanda limando</i>)
Rhabdovirus	<i>Rhabdovirus anguila</i> <i>Rhabdovirus samonis</i> <i>Spring viraemia of carp virus (SVCV)</i> <i>Infectious haematopoiteic necrosis virus</i> <i>Viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV)</i>	<i>A. Rostrata, A. japonica, A. Anguilla</i> Trout Pelangi <i>C. carpio</i> <i>Sockeye salmon (O. nerka)</i> Trout Pelangi
	Reovirus	<i>Golden shiner virus</i> <i>Catfish reovirus</i> <i>Grass-carp reovirus</i>
Retrovirus	<i>Bluegill lymphocystis retrovirus</i> <i>Gilthead sea bream virus</i>	<i>Bluegill (Lepomis macrochirus)</i> <i>Gilthead seabream (Sparus aurata)</i>
Virus yang tidak jelas tipenya	<i>Carp coronavirus</i> <i>Brown bullhead papilloma</i>	<i>C. carpio</i> <i>Brown bullhead (Ictalurus nebulosus)</i>
	<i>Kuchijiro-sho virus</i>	<i>Tiger puffer (Tahifugu rubripes)</i>

Sumber: Irianto (2005)

2.3 Koi Herpes Virus (KHV)

Sejak 1998, infeksi KHV telah terjadi di Israel, Amerika Serikat, dan Negara-negara Eropa bagian barat. Di Indonesia, infeksi KHV menyebar sejak 2002, awal infeksi teramati di bagian timur pulau Jawa, kemudian di bagian barat Jawa dan akhirnya di Sumatera pada awal 2002, menyebabkan kematian massal pada masing-masing daerah. Infeksi ini ditandai oleh 3 hal, kematian yang tinggi, mencapai 100% dalam waktu singkat, kisaran inang terbatas yaitu pada ikan mas dan koi dan tidak terdapat tanda klinis yang spesifik. Penyebabnya berupa infeksi sistemik oleh virus koi herpes, inang berasal dari ikan mas dan ikan koi, dari benih sampai induk dengan tanda klinisnya berupa insang geripis, erosi atau borok pada kulit (Wakita dan Yuasa, 2005).

Penyakit KHV telah didiagnosa pada ikan koi dan ikan mas konsumsi. Namun demikian, spesies golongan cyprinid lainnya seperti common goldfish (*Carassius auratus*) dan grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) menunjukkan bahwa tidak terserang KHV. Seperti halnya infeksi virus herpes lainnya, KHV diyakini berada dalam tubuh ikan mas terinfeksi untuk kelangsungan hidupnya sehingga ikan mas tersebut berpotensi sebagai carrier virus. Serangan KHV dapat menyebar dengan beberapa cara seperti halnya herpes virus lainnya. Penyebarannya dapat terjadi karena kontak langsung dengan ikan yang terinfeksi, air dari ikan terinfeksi dan atau melalui air atau tanah tempat ikan terinfeksi dipelihara.(Sucipto, 2011).

Virus ini bisa hidup bebas di air tawar selama kurang lebih 20 jam, bahkan di dalam lumpur kolam virus ini bisa bertahan hidup lebih dari 24 jam. Oleh karena itu virus ini mudah sekali menular dari ikan hidup maupun mati yang terinfeksi oleh KHV. Demikian juga dengan kolam ikan bekas inveksi KHV akan sangat berbahaya dan mudah menularkan ke kolam lainnya, baik melalui air buangan kolam, lumpur dasar sisa kolam, maupun air dalam kolam itu sendiri (Windri, 2011).

Menurut Tauhid *et al* (2004) bahwa serangan KHV menunjukkan gejala-gejala yaitu:

1. Produksi lendir (mucus) berlebih sebagai respon fisiologis terhadap kehadiran patogen, selanjutnya produksi lendir menurun drastis sehingga tubuh ikan terasa kasat,
2. Insang berwarna pucat dan terdapat bercak putih atau coklat (akibat kematian sel-sel insang atau nekrosis insang), selanjutnya menjadi rusak, geripis pada ujung tapis insang dan akhirnya membusuk. Secara mikroskopis menunjukkan adanya kerusakan jaringan yang serius serta kematian sel yang berat,
3. Pendarahan (hemoragi) di sekitar pangkal dan ujung sirip serta permukaan tubuh lainnya,
4. Adanya kulit melepuh,
5. Hati berwarna pucat selanjutnya menjadi rusak,
6. Ginjal (anterior dan posterior) berwarna pucat.

Gambar ikan koi yang mengalami gejala klinis KHV dapat dilihat pada Gambar 2.



a) Insang ikan Koi yang membusuk b) Insang ikan Koi yang mengalami hemoragik

Gambar 2. Gejala Klinis yang Ditunjukkan pada Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) yang terinfeksi KHV

Pencegahan menyebarnya penyakit KHV harus dilakukan sedini mungkin, karena sampai saat ini masih belum ada obat yang tepat untuk menanggulangi

penyakit ini. Salah satu upaya pencegahannya yaitu dengan cara menghindari penyebaran penyakit KHV, yaitu dengan mengisolasi lokasi wabah, menjaga kualitas dan kuantitas air media pemeliharaan ikan koi serta meningkatkan daya tahan tubuh ikan dengan pemberian vitamin B atau vitamin C atau dengan cara memberikan obat kekebalan *imunostimulan*. Ikan yang selamat dari serangan penyakit berarti di dalam tubuhnya sudah terbentuk antibodi terhadap serangan virus herpes. Ikan ini kemudian dapat dijadikan induk, tapi sebaiknya tidak dipindahkan ke tempat lain dan dijaga agar jangan sampai stress (Amri dan Khairuman, 2002).

2.4 Sel Darah yang Diserang KHV

Darah adalah cairan yang terdapat pada semua makhluk hidup (kecuali tumbuhan) tingkat tinggi yang berfungsi mengirimkan zat-zat dan oksigen yang dibutuhkan oleh jaringan tubuh, mengangkut bahan-bahan kimia dan juga sebagai pertahanan tubuh terhadap virus atau bakteri. Istilah medis yang berkaitan dengan darah diawali dengan kata *hemo-* atau *hemato-* yang berasal dari bahasa Yunani *haima* yang berarti darah (Athiyatillah, 2009).

Sel darah merah atau eritrosit adalah sejenis sel darah yang paling banyak dan berfungsi membawa oksigen ke jaringan-jaringan tubuh lewat darah dalam hewan bertulang belakang. Bagian dalam eritrosit terdiri dari hemoglobin, sebuah biomolekul yang dapat mengikat oksigen. Pada sel darah merah inilah banyak terjangkit KHV (Gilad *et al*, 2003).

2.5 Cara Penyebaran Infeksi KHV

Penyakit yang diakibatkan virus biasanya bersifat khusus pada family yang memiliki kekerabatan dekat atau bahkan hanya pada jenis tertentu. Umumnya, penyakit yang diakibatkan virus dapat menimbulkan penyakit yang akut dan kematian. Pada family cyprinid, beberapa virus yang pernah dilaporkan menyebabkan penyakit akut,

antara lain: *rhabdovirus*, *corona-like virus*, *iridovirus* dan *herpesvirus* (Hutoran *et al*, 2005). Herpesvirus pada ikan secara umum diidentifikasi sebagai penyebab penyakit mulai dari infeksi sisik hingga infeksi sistemik yang fatal. Keganasan serangan virus KHV dipengaruhi oleh suhu air, jika suhu air hangat maka KHV jarang menyerang tetapi jika suhu air rendah maka kemungkinan serangan KHV akan muncul (Gilad *et al*, 2003).

Satu virus baru yang dapat menyebabkan kematian secara drastis telah menyerang ikan mas (*Cyprinus carpio*) dan koi (*Cyprinus carpio koi*) dilaporkan mulai terjadi pada awal tahun 1996 di Inggris, musim semi Tahun 1998 di Israel dan Korea menyebar ke Amerika Utara, Eropa dan Asia Tenggara termasuk Indonesia. Di Jepang, wabah ini terjadi pada Oktober 2003 di Danau Kasumigara yang merupakan tempat utama produksi budidaya ikan mas, sedangkan di Amerika, isolat virus sudah didapatkan mulai tahun 1998 dan wabah penyakit ini sudah menyebabkan kematian pada ikan mas liar di Sungai Chadakon pada tahun 2004. Penyakit ini dapat menyerang berbagai ukuran ikan mulai larva hingga induk, biasanya terjadi pada kisaran suhu 18-28 °C dan dapat menyebabkan kematian 80-100% (Grimmet *et al*, 2006).

Serangan virus ini telah menyebabkan kerugian yang sangat besar pada industri akuakultur mengingat dua jenis ikan yang diserang merupakan komoditas utama ikan konsumsi dan ikan hias. Di Indonesia, penyebaran penyakit ini telah melintasi hampir semua daerah budidaya ikan koi. kegiatan budidaya yang intensif, pameran ikan koi dan perdagangan aktif domestik dan internasional yang hampir tidak ada pembatasan dan pemeriksaan atau penerapan program karantina merupakan penyebab penyebaran yang sangat cepat penyakit ini secara global (Pikarsky *et al*, 2004).

2.6 Diagnosis Infeksi KHV

Pemeriksaan virus khususnya KHV seringkali menggunakan uji PCR sebagai *Golden Standard Uji*. Akan tetapi untuk saat ini juga diperlukan pula uji pendamping lainnya yang memiliki tingkat sensitifitas dan spesifitas yang tinggi pula.

Ada 5 negara terdiri dari 7 institusi yang melakukan penelitian pengembangan virus KHV yaitu Israel, Amerika Serikat, Inggris, Jepang, dan Kanada. Dari kelima negara ternyata Israel yang unggul lebih dulu. Universitas Hebrew bekerjasama dengan Kovax telah berhasil mengembangkan vaksin KHV dengan cara melemahkan virus KHV. Kovax saat ini sudah mendapat ijin dari pemerintah Israel untuk menjual vaksin tersebut di luar Israel. Hanya saja vaksin yang berasal dari virus yang dilemahkan mempunyai 2 kendala, yaitu efektivitasnya kadang kurang tinggi sehingga ikan yang disuntik tidak cukup memproduksi antigen untuk melawan virus yang aktif. Selain itu ada kemungkinan virus yang dilemahkan dan dijadikan vaksin bisa menjadi aktif sehingga menimbulkan penyakit bagi yang divaksin. Mie University dari Jepang juga diberitakan sudah mampu membuat vaksin untuk KHV. Bahkan vaksin yang dikembangkan diberikan melalui mulut (dicampur dengan pakan) sehingga penerapannya lebih mudah dan lebih cepat. Hasil percobaan mereka menunjukkan bahwa ikan koi yang diberi vaksin ini mampu memproduksi antibodi 25 kali lebih banyak dibanding ikan normal (Windri, 2011).

2.6.1 Immunologi

Imunologi merupakan suatu ilmu yang mempelajari tentang sistem imun. Imunitas sifatnya sangat spesifik yaitu antibodi dibentuk hanya dengan antigen tertentu. Pengaturan sistem imun diatur oleh sel darah putih melalui mekanisme yang terintegrasi antara berbagai komponen sel darah putih. Sistem tersebut mengatur

respon imun memeriksa seluruh bagian tubuh untuk mengidentifikasi adanya bahan yang asing bagi tubuh (Malole, 2006).

Menurut Kresno, 2001, imunologi adalah suatu ilmu yang mempelajari tentang sistem iimun dan merupakan suatu ilmu yang experimental, dimana penjelasan tentang fenomena imunologi didasarkan atas observasi experimental dan kesimpulan yang dihasilkannya. Dengan perkembangan yang pesat dalam imunokimia, membuka jalan bagi suatu klinik untuk secara luas menerapkan pemeriksaan laboratorium imunologi untuk menunjang diagnosis suatu penyakit.

Pada sel atau jaringan yang mengalami infeksi didalam sel tersebut dapat ditemukan antigen/virus yang menyebabkan infeksi. Adanya virus yang merupakan antigen dapat dideteksi dengan mereaksikannya menggunakan antibodi yang spesifik. Teknik mempelajari antigen dalam sel atau jaringan yaitu teknik sitokimia dan histokimia (Murtini, 2006).

2.6.1.1 Imunositokimia dan Streptavidin Biotin

Imunositokimia adalah perpaduan antara teknik imunologis dan sitologis. Pada metode ini dilakukan pewarnaan substansi / bahan aktif atau agen penyakit di dalam sel dengan menggunakan prinsip-prinsip dasar reaksi imunologi / pengikatan antigen-antibodi. Hasil reaksi pengikatan tersebut pada spesimen dapat diidentifikasi karena antibodi yang digunakan telah dilabel / diberi penanda yang dapat divisualisasikan. Dengan demikian keberadaan suatu bahan aktif atau antigen dalam jaringan tersebut dapat diketahui (Malole, 2006).

Immunocytochemistry (imunositokimia) merupakan suatu gambaran dari reaksi antibodi-antigen spesifik, dengan hasil akhir reaksi dalam penggabungan atau pengikatan dari marker yang jelas dari Ag yang dapat divisualisasikan dengan marker

Fluorescent dye, Colloidal metal, Hapten, Radioactive marker atau umumnya menggunakan light microscope dengan enzim (Boenich, 2001).

Pemeriksaan antigen dengan teknik *Imunocytochemistry* (imunositokimia) itu sendiri merupakan salah satu jenis pemeriksaan imunologis, menggunakan metode imuno histo (sito) kimia enzim yang sifatnya spesifik dan bertujuan membantu diagnosis atau mendeteksi adanya antigen atau lokasi antigen, dalam jaringan biopsi, sediaan sitologi atau dapat digunakan untuk mendeteksi antigen dalam cairan spesimen yang terinfeksi oleh patogen. Aplikasi imuno (sito) kimia di bidang kesehatan hewan antara lain untuk menegakkan diagnosis penyakit infeksi yang mengenai saluran pernafasan (Priyambodo, 2001).

Berbagai macam tehnik imunositokimia telah dikembangkan dewasa ini, antara lain: *peroxidase anti peroxidase (PAP), alkaline phosphatase anti alkaline phosphatase (APAAP), avidin-biotin complex (ABC)* dan *streptavidin-biotin (SB)* (Boenich,2001). Namun menurut Priyambodo (2001) bahwa diantara ke empat metode pemeriksaan tersebut, streptavidin-biotin (SB) merupakan metode pemeriksaan yang dipilih, karena mempunyai beberapa keunggulan dibandingkan dengan tehnik pemeriksaan imunositokimia yang lain.

Strenberger (1979) menjelaskan bahwa hasil pemeriksaan imunositokimia lebih sensitif dibandingkan dengan pemeriksaan imunofluoresensi dan lebih praktis dalam pelaksanaannya serta tidak mahal harganya, selain itu metode streptavidin-biotin (SB) lebih menguntungkan dibandingkan dengan metode yang lain karena digunakan reagensia labeling tunggal umum (*conjugated streptavidin enzyme*), juga metode ini lebih peka karena menggunakan streptavidin yang merupakan jenis protein yang berasal dari mikroorganisme *streptomyces avidinii*, yang mampu mengikat lebih kuat biotin sehingga terlihat lebih jelas pada pengamatannya menggunakan mikroskop cahaya.

Prinsip dasar metode streptavidin biotin adalah adanya antigen target yang diinkubasi dengan antibodi primer selanjutnya ditambah antibodi sekunder-biotin, penghubung antibodi primer dan streptavidin enzim. Pemberian streptavidin akan mengikat residu biotin pada antibodi penghubung dan adanya enzim terlihat dengan penambahan substrat chromogen. Enzim akan mengkatalisis substrat dan mengubah chromogen menjadi endapan berwarna kemerahan (Priyambodo,2001).

Strenberger (1979) mengungkapkan baha dengan menggunakan metode streptavidin-biotin (SB) lebih menguntungkan dibandingkan dengan metode yang lain karena digunakan reagensia labeling tunggal umum (*conjugated streptavidin enzyme*), juga metode ini lebih peka karena menggunakan streptavidin yang merupakan jenis protein yang berasal dari mikroorganisme *streptomyces avbidinii*, yang mampu mengikat lebih kuat biotin sehingga terlihat lebih jelas pada pengamatannya menggunakan mikroskop cahaya.

Prinsip dasar metodes treptavidin biotin adalah adanya target yang diinkubasi dengan antibody primer selanjutnya ditambah antibody sekunder-biotin, penghubung antibody primer dan streptavidin enzim akan mengikat substrat residu biotin pada antibody penghubung dan adanya enzim terlihat degan penambahan substrat chromogen. Enzim akan mengkatalis sustrat dan mengubah chromogen menjadi endapan berarna kemerahan (Priyambodo, 2001).

2.7 Kualitas Air Ikan Koi (*C. carpio*)

2.7.1 Suhu

Suhu adalah besaran yang menyatakan derajat panas dingin suatu benda dan alat yang digunakan untuk mengukur suhu adalah thermometer (Aljabar, 2008). Tim peneliti Udana (2009), parameter-parameter ekologis yang cocok untuk pertumbuhan ikan koi adalah temperature antara 24 – 28 °C.

Menurut Mahasri (1999) temperatur perairan akan berpengaruh pada organisme perairan, dimana semakin tinggi temperature maka metabolisme organisme juga tinggi, sehingga konsumsi O_2 akan naik dan antara *demand supply* tidak seimbang. Hal ini akan mengakibatkan ikan-ikan yang hidup di perairan itu menjadi stress. Dan apabila temperature tinggi, maka kelarutan oksigen akan menurun (kecil) sehingga ikan akan menjadi stress, karena kekurangan oksigen.

Suhu tinggi tidak selalu berakibat mematikan tetapi dapat menyebabkan gangguan status kesehatan untuk jangka panjang, misalnya stress yang ditandai dengan tubuh melemah, kurus, dan tingkah laku abnormal. Pada suhu rendah, akibat yang ditimbulkan antara lain ikan menjadi lebih rentan terhadap infeksi fungi dan bakteri patogen akibat melemahnya sistem imun. Pada dasarnya suhu rendah memungkinkan air mengandung oksigen lebih tinggi, tetapi suhu rendah menyebabkan stress pada pernafasan ikan berupa menurunnya laju pernafasan dan denyut jantung sehingga dapat berlanjut dengan pingsannya ikan-ikan akibat kekurangan oksigen (Irianto, 2005).

2.7.2 pH

pH merupakan istilah yang digunakan untuk menyatakan intensitas keadaan asam atau basa sesuatu larutan. pH merupakan salah satu cara untuk menyatakan konsentrasi H^+ . yang sangat penting untuk diketahui yakni bahwa konsentrasi OH^- suatu larutan tak akan dapat diturunkan sampai nol, bagaimanapun asamnya larutan, dan bahwa konsentrasi H^+ tak akan dapat diturunkan sampai nol, bagaimanapun basanya larutan (Sutrisno dan Eny, 1991). Menurut Tim Peneliti Udana (2009), parameter-parameter ekologis yang cocok untuk pertumbuhan ikan koi yaitu pH antara 7 – 7,2.

2.7.3 Oksigen Terlarut

Oksigen merupakan salah satu gas yang terlarut dalam peairan. Kadar oksigen terlarut di peairan alami bervariasi, tergantung suhu, salinitas, turbulensi air, dan tekanan atmosfer. Semakin besar suhu dan ketinggian serta semakin kecil tekanan atmosfer, kadar oksigen terlarut semakin kecil (Effendi, 2003).

Kelarutan oksigen dalam air pada suhu 0 °C yaitu sebesar 14,6mg/L.konsentras ini akan menurun sejalan dengan meningkatnya suhu air. Pengaruh oksigen terlarut terhadap fisiologis organism air terutama adalah dalam proses respirasi (pernafasan) (Barus, 2004).

2.7.4 Karbondioksida (CO₂)

Karbondioksida merupakan gas yang sangat diperlukan dalam proses fotosintesis (proses penggabungan CO₂ dan H₂O secara biokimia dengan bantuan sinar matahari sebagai energi oleh tumbuh-tumbuhan berklorofil untuk membentuk hidrat arang, di udara sangat sedikit jumlahnya kurang lebih 0,333% dan di dalam air melimpah mencapai 12 mg/L. Sumber CO₂ dalam air adalah difusi dari udara, proses dekomposisi bahan organik, air hujan dan air bah tanah maupun hasil respirasi organisme (Arfiati, 2001).

3. MATERI DAN METODE

3.1 Materi Penelitian

Materi penelitian ini adalah ikan koi (*Cyprinus carpio koi*), Koi Herpes Virus (KHV), dan metode imunositokimia teknik Streptavidin Biotin.

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen atau percobaan. Menurut Hasan (2002), metode eksperimen merupakan metode penelitian yang memungkinkan peneliti memanipulas variabel dan meneliti akibat-akibatnya. Pada metode ini, variabel-variabel dikontrol sedemikian rupa sehingga variabel luar yang mungkin mempengaruhi dapat dihilangkan. Metode eksperimen atau lebih variabel pada satu (atau lebih) kelompok eksperimen, dan membandingkan hasilnya dengan kelompok kontrol yang tidak mengalami manipulasi. Manipulasi berarti mengubah secara sistematis sifat-sifat (nilai-nilai) variabel bebas. Metode eksperimen memiliki tiga ciri, yaitu sebagai berikut; 1). Manipulasi, yaitu mengubah secara sistematis keadaan tertentu; 2). Observasi, yaitu mengamati dan mengukur hasil manipulasi; 3). Kontrol, yaitu mengendalikan kondisi-kondisi penelitian ketika berlangsungnya manipulasi.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Sampel Ikan

Sampel ikan Koi (*C. carpio koi*) berukuran 10-20 cm berjumlah 20 ekor dengan menunjukkan beberapa gejala klinis terinfeksi KHV antara lain berupa insang geripis, erosi atau borok pada kulit, gerakan tak terkontrol, kulit melepuh, atau kadang disertai pendarahan pada sirip diperoleh dari 2 kolam yang berbeda di kolam pembenihan ikan koi di Blitar, Jawa Timur. Berikut beberapa sampel ikan koi yang diambil dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Sampel Ikan Koi yang diambil dari kolam bidudaya

3.3.2 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah, Objek glass, Coverglass, Timbangan analitik, Mikroskop cahaya, Peralatan Dot Blot, Micropipet P10, P50, P200, P1000; Sarung Tangan, Pellet Pastel, Thermal Cycler, Pellet Pastle, Microcentrifuge tubes, Pippettors, Table Top Centrifuge/ Refrigerated microcentrifuge, Ultrahigh microcentrifuge, Vortex Mixer, lemari es, dan inkubator.

3.3.3 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah aseton, larutan *buffer saline*, 10% *hydrogen peroxide Block*, *norma goat serum*, anti-Koi herpesvirus (KHV) monoclonal *antibody goat anti-mouse IgG* biotin Conjugate, streptavidin-horseradish peroxidase, sustrat-chromogen solution, counter stain (mayer's hematoxylin), serta Entellan neu untuk proses *mounting*.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pemeriksaan visual

Perubahan atau kelainan patologis ikan koi yang harus diperiksa secara visual adalah gejala eksternal yang menunjukkan adanya infeksi KHV. Gejala akibat virus KHV antara lain berupa insang geripis, erosi atau borok pada kulit, gerakan tak terkontrol, kulit melepuh, atau kadang disertai pendarahan pada sirip.

3.4.2 Uji In-vitro Pemeriksaan Sel Darah yang Terinfeksi KHV

Uji in-vitro dengan menggunakan sampel darah untuk apusa dengan langkah-langkah kerja sebagai berikut:

1. Darah diambil menggunakan spuit
2. Diletakkan di atas objek glass dan diulas tipis
3. Diinkubasi ke dalam larutan aseton selama 10 menit
4. Sampel ditetesi dengan normal goat serum dan diinkubas pada suhu kamar selama 30 menit
5. Sampel ditetesi dengan antibody primer yang berupa *anti-KHV monoclonal Antibodi* lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 20 menit
6. Sediaan dicuci dengan larutan PBS selama 10 menit, lalu tiriskan di ataskertas tissue.
7. Sampel ditetesi dengan antibody sekunder dan ditambah dengan cairan *biotinylated secondary antibody* selama 10 menit.
8. Sampel dicuci dengan PBS selama 10 menit, lalu tiriskan di atas kertas tissue.
9. Sediaan kemudian diinkubasi dengan streptavidin-horseradish peroxidase conjugate selama 5 menit
10. Sediaan dicuci lagi dengan PBS selama 10 menit, lalu tiriskan di atas kertas tissue.
11. Selanjutnya sediaan diinkubas dengan substrat-chromogen pada suhu kamar selama 15 menit.
12. Dicuci dengan aquades selama 10 menit.
13. Dilakukan dengan counterstain hematoxyin selama 3 menit.
14. Dicuci dengan aquades dan mounting dengan entelan neu untuk pengamatan di baah mikroskop.

15. Hasil positif apabila dalam sediaan yang telah dilakukan pearnan menggunakan streptavidin-biotin akan terlihat arna coklat keemasan.

Proses pengambilan darah pada ikan dan pengamatan secara mikroskopik dapat dilihat pada Gambar 4.



a. Pengambilan darah ikan



b. Pemeriksaan Mikroskopik

Gambar 4. Pemeriksaan Sampel Ikan secara Laboratoris

3.4.3 Pengamatan dan Analisa

Pengamatan pada metode imunositokimia dilakukan dengan cara mengamati hasil pewarnaan sel darah. Data yang akan didapatkan dianalisa dengan menggunakan metode deskriptif kualitatif yaitu dengan menggambarkan atau memaparkan dengan kata-kata secara jelas dan terperinci tentang sebuah kegiatan yang dilakukan dan dibandingkan dengan literatur.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pemeriksaan Kesehatan Ikan Koi

Sampel ikan yang menunjukkan gejala klinis terserang KHV sebanyak 20 ekor (dari 2 kolam masing-masing 10 ekor ikan) diambil dari petani ikan di daerah Blitar. Sampel dikumpulkan pada bak fiber berukuran 1,5 x 2 x 1 meter dan diadaptasikan selama 1-3 hari dengan tujuan agar ikan sakit yang didapat tidak akan cepat mengalami stress dan akhirnya mati, selain itu juga untuk menularkan virus dalam air. Pikarsky (2004) mengungkapkan bahwa virus yang berada dalam air akan tetap efektif dapat menular selama 4 jam. Hal ini menjelaskan bahwa air merupakan salah satu media yang baik dalam penyebaran virus pada ikan. Pintu masuk penyebaran virus pada ikan terutama terjadi melalui insang. Hal ini mirip dengan virus-virus yang menyerang pernafasan pada mamalia yang menginfeksi jaringan epitel pernafasan dan berkembang biak di dalamnya.

Sampel ikan yang diambil dari Blitar sebanyak 20 ekor, setelah diadaptasikan selama 3 hari diperoleh ikan koi yang hidup sebanyak 13 ekor dan yang mati sebanyak 7 ekor. Pada saat proses adaptasi menunjukkan tujuh ikan koi mati dalam semalam. Beberapa di antaranya menunjukkan tanda-tanda klinis berupa perilaku abnormalitas dan disorientasi sebelum kematian. Sedangkan patologis anatomis yang paling terlihat dari ketujuh ikan yang mati tersebut menunjukkan adanya hemoragik dan kongesti pada operculum, sirip ekor, sirip punggung dan operculum serta nodule putih pada insang. Luka yang terjadi pada umumnya hanya superficial (luka yang tidak dalam) berwarna putih susu atau putih keabu-abuan yang terdapat pada 1-2 mm diatas kulit. Luka tersebut akan bertambah dalam sesuai dengan lama infeksi. Karena penyakit ini jarang terjadi pada ikan yang muda oleh karena itu pencarian sampel diprioritaskan pada ikan yang sudah dewasa.

4.2 Imunopatogenesis Infeksi KHV

Herpesvirus pada ikan secara umum diidentifikasi sebagai penyebab penyakit mulai dari infeksi lokal hingga infeksi sistemik yang fatal (Gilad *et al*, 2003). Hal ini juga terlihat pada ikan koi yang akan dilakukan pemeriksaan/identifikasi juga mengalami gejala yang sama dengan penyakit herpesvirus yang menyerang family cyprinid.

Penyakit herpesvirus dapat menyerang berbagai ukuran ikan mulai dari larva hingga induk, biasanya terjadi pada kisaran suhu 18-28 °C, dapat menyebabkan kematian 80-100% dan biasanya terjadi pada saat musim bediding. Akan tetapi ikan yang masih muda jarang ditemukan adanya penyakit herpesvirus, hal ini disebabkan ikan muda tersebut memiliki *defend imunitas* yang baik sehingga mampu mempertahankan kondisi tubuhnya dari serangan virus herpes.

Secara khas penyakit ini sangat menular namun serangan yang dapat menyebabkan sakit atau kematian hanya terbatas pada ikan mas dan koi. Hal ini terbukti setelah ikan koi yang diperoleh dari Blitar, setelah 3 hari pemeliharaan terdapat 7 ikan koi yang teridentifikasi herpes virus.

Nomenklatur virus ini belum ditentukan oleh *Internationa Commite on Virus Taxonomy* (Iilouze *et al*, 2006). nomenklatur virus dapat berdasarkan manifestas morfologi, efek pathogenesis atau manifestasi klinis, jenis hewan yang digunakan sebagai inang, sifat antigenic, karakteristik pertumbuhan, jenis pengaruh cytophatik pada sel kultur ataupun berdasarkan homologinya dengan virus lain yang sudah diketahui (Waltzek *et al*, 2005).

4.3 Pemeriksaan KHV Menggunakan Metode Imunositokimia (Streptavidin Biotin) pada Sel Darah

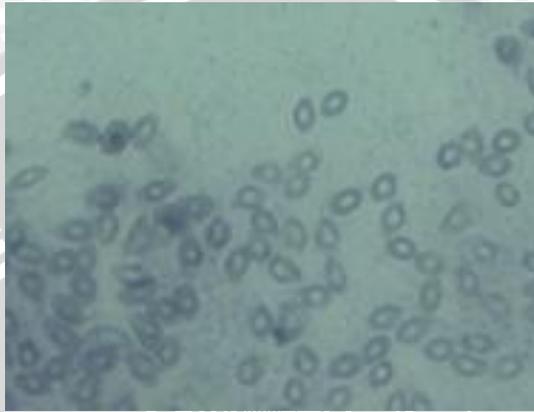
Malole (2005) mengatakan bahwa Imunositokimia adalah perpaduan antara teknik imunologis dan sitologis. Sedangkan pemeriksaan *Imunocytochemistry* (imunositokimia) itu sendiri merupakan salah satu jenis pemeriksaan imunologis, menggunakan metode imuno kimia enzim yang sifatnya spesifik dan bertujuan membantu diagnosis atau mendeteksi adanya antigen atau lokasi antigen, dalam jaringan biopsi, sediaan sitologi atau dapat digunakan untuk mendeteksi antigen dalam cairan spesimen yang terinfeksi oleh kuman patogen. Aplikasi imuno (sito) kimia di bidang kesehatan hewan antara lain untuk menegakkan diagnosis penyakit infeksi yang mengenai saluran pernafasan (Priyambodo, 2001).

Sampel positif yang digunakan dalam pemeriksaan Imunositokimia teknik SB adalah darah dari ikan koi yang diulas tipis dengan teknik *pull film*. Dengan hasil ulasan yang tipis diperoleh hasil smear darah yang bisa terbaca setelah proses akhir *staining*. Secara lengkap hasil pemeriksaan dengan menggunakan Imunositokimia teknik SB dapat dilihat pada Tabel 2, yang mana menunjukkan reaksi 100% positif ICC pada apusan darah, yang ditandai warna coklat keemasan.

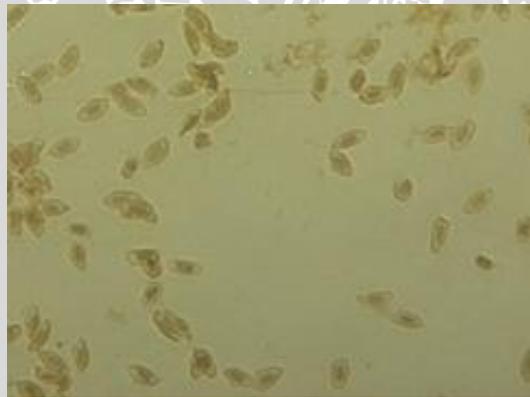
Tabel 2. Hasil uji KHV pada Ikan Koi dengan Metode Imunositokimia

Jenis Sampel	Organ Target	Ulangan		
		1	2	3
Sampel 1	Darah	Positif	Positif	Positif
Sampel 2	Darah	Positif	Positif	Positif
Sampel 3	Darah	Positif	Positif	Positif
Sampel 4	Darah	Positif	Positif	Positif
Sampel 5	Darah	Positif	Positif	Positif
Sampel 6	Darah	Positif	Positif	Positif
Sampel 7	Darah	Positif	Positif	Positif

Kontrol negatif uji KHV dengan metode Imunositokimia dengan hasil warna biru keunguan dapat dilihat pada Gambar 5, dan untuk kontrol positif uji KHV dengan metode Imunositokimia dengan hasil warna coklat keemasan dapat dilihat pada Gambar 6.

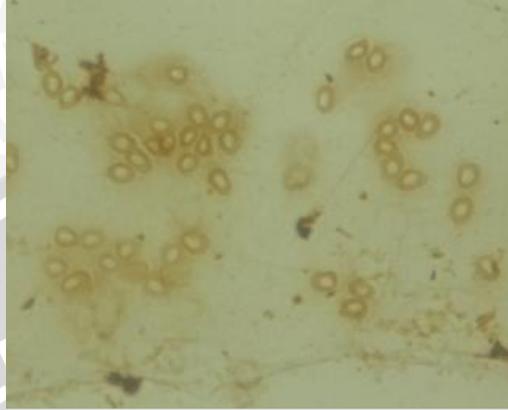


GAMBAR 5. Profil apusan darah ikan koi yang terinfeksi KHV dengan Pewarnaan ICC teknik Streptavidin Biotin: kontrol negatif

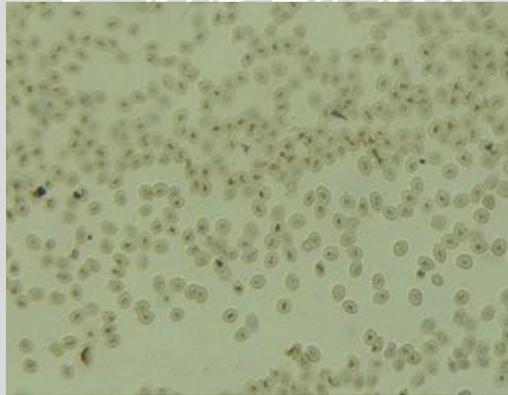


GAMBAR 6. Profil apusan darah ikan koi yang terinfeksi KHV dengan Pewarnaan ICC teknik Streptavidin Biotin: kontrol positif.

Hasil pengujian KHV dengan metode Imunositokimia pada ikan koi dapat dilihat pada Gambar 7 dan 8.



Gambar 7. Profil apusan darah ikan koi yang terinfeksi KHV dengan Pewarnaan ICC teknik Streptavidin Biotin: sampel positif berat, warna coklat keemasan



Gambar 8. Profil apusan darah ikan koi yang terinfeksi KHV dengan pewarnaan ICC teknik Streptavidin Biotin: sampel positif ringan, warna coklat kebiruan

Pada Gambar 7, dapat dilihat apusan darah tidak menunjukkan warna coklat keemasan, atau hasil ICC pada kontrol negatif. Sedangkan pada Gambar 8 apusan darah menunjukkan warna coklat keemasan, atau hasil ICC positif pada kontrol positif.

Berdasarkan hasil pemeriksaan menggunakan metode Imunositokimia dengan pemakaian kit Lab Vision dengan langkah awal yaitu specimen darah dicampur dengan EDTA untuk pemeriksaan IgG anti-KHV. Setelah itu dibuat preparat apus tipis di atas object glass difiksasi dengan aseton dikeringkan dalam udara terbuka. Setelah kering

kemudian dicat dengan imunositokimia dengan streptavidin – biotin dan setelah ditambah Meyer's hematoxylin diamati di bawah mikroskop cahaya diperoleh hasil *staining* coklat keemasan setelah ditetesi dengan substrat chromogen 3,3' diaminobenzidine (DAB) sebagai bentuk hasil ekspresi KHV positif.

Secara umum pewarnaan imunositokimia merupakan ikatan antara antigen-antibodi yang diikatkan baik secara langsung ataupun tidak langsung dengan substans penanda, dan reaksi positif akan tervisualisasi karena adanya kromogen yang berikatan penanda tersebut pada tingkat seluler. Kromogen adalah suatu zat yang dapat memvisualisasikan substansi penanda pada ikatan immunokompleks pada pewarnaan imunositokimia.

DAB menghasilkan produk akhir yang sangat tidak larut dalam alkohol dan pelarut lainnya. Oksidasi DAB juga menyebabkan polimerasi. DAB memiliki kemampuan untuk bereaksi dengan osmium tetroxide, dan dengan demikian sangat berguna dalam elektromikroskopi serta bagian imunositokimia.

4.4 Analisa Kualitas Air

4.4.1 Suhu

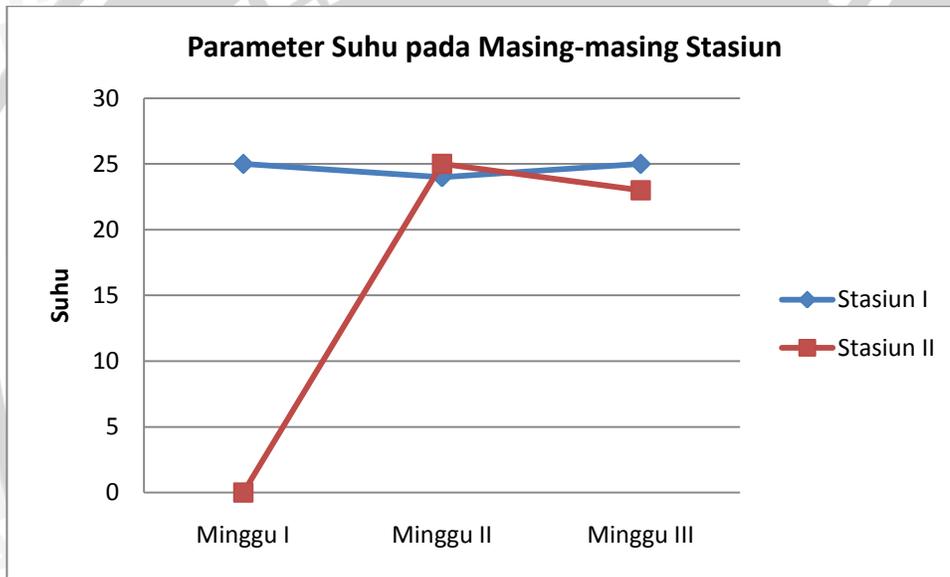
Menurut Boyd (1981), suhu merupakan salah satu faktor yang penting terutama dalam proses kimia dan biologi, setiap peningkatan suhu sebesar 10 °C dalam kisaran toleransinya akan meningkatkan kecepatan reaksi kimia dan biologi sebesar 2 kali lipat. Hal ini berarti organisme akan menggunakan O₂ terlarut 2 kali lebih banyak pada kenaikan suhu tersebut.

Suhu mempengaruhi aktivitas metabolisme ikan, apabila suhu terlalu tinggi maka jumlah oksigen akan menurun sehingga nafsu makan ikan berkurang, kemudian ikan akan mengalami stress dan mudah terserang penyakit karena sistem imun yang ada di dalam tubuh menurun. Secara umum metabolisme dari ikan akan optimum pada

suhu di atas 15 °C (Putra, 2008). Hasil pengamatan suhu pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Pengamatan Suhu pada Masing-masing Stasiun (°C)

	Stasiun I	Stasiun II
Minggu I	25	24,5
Minggu II	24	25
Minggu III	25	23



Grafik 1. Parameter Suhu selama Penelitian

Pada grafik 1, parameter suhu menunjukkan suhu yang stabil dari minggu 1 sampai minggu 3. Hal ini dikarenakan waktu pengambilan suhu minggu 1 sampai dengan minggu 3 cuaca sedang normal jadi suhunya tidak telalu tinggi dan tidak terlalu rendah. Suhu yang diukur dari kedua stasiun tidak menunjukkan adanya perubahan suhu yang mencolok, yaitu hanya berkisar 24-25 °C.

Melihat hasil pengukuran suhu selama penelitian, dapat dikatakan kisaran suhu ini sesuai dengan batas toleransi ikan koi,. Menurut Mahasri (1999) bahwa parameter ekologis yang cocok untuk pertumbuhan ikan koi adalah temperature antara 24 – 28 °C.

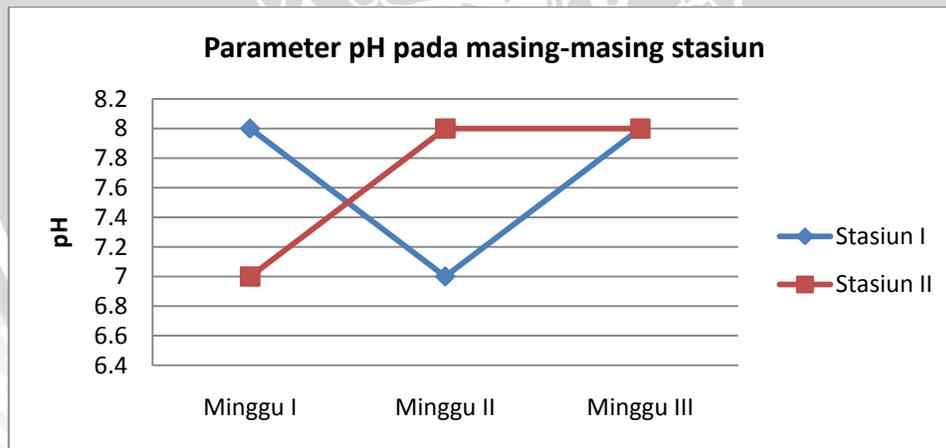
4.4.2 Derajat Keasaman (pH)

Menurut Novotny dan Olem (1994) dalam Effendi (2003), sebagian besar biota akuatik sensitive terhadap perubahan pH dan menyukai pH sekitar 7 – 8,5. Nilai pH sangat mempengaruhi proses biokimia perairan, misalnya proses nitrifikasi akan berakhir jika pH rendah. Toksisitas logam memperlihatkan peningkatan pada pH rendah.

Hasil pengamatan pH pada penelitian ini menunjukkan bahwa pH masing-masing stasiun berkisar antara 7 – 8. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil pengamatan pH pada Masing-masing Stasiun

	Stasiun I	Stasiun II
Minggu I	8	7
Minggu II	7	8
Minggu III	8	8



Grafik 2. Grafik Parameter pH selama Penelitian

Pada grafik 2, grafik dari pH perairan selama penelitian berkisar antara 7 – 8. Perbedaan pH antar stasiun satu dengan yang lainnya pada umumnya tidak terlalu mencolok, sehingga parameter tidak menimbulkan masalah mengingat pH berada pada

kisaran yang baik untuk pertumbuhan ikan koi sebab menurut Boyd (1982) pH yang baik untuk kehidupan organisme berkisar antara 6,5 – 9. Sebagian besar ikan dapat beradaptasi dengan baik pada lingkungan perairan yang memiliki nilai pH berkisar 5 – 9.

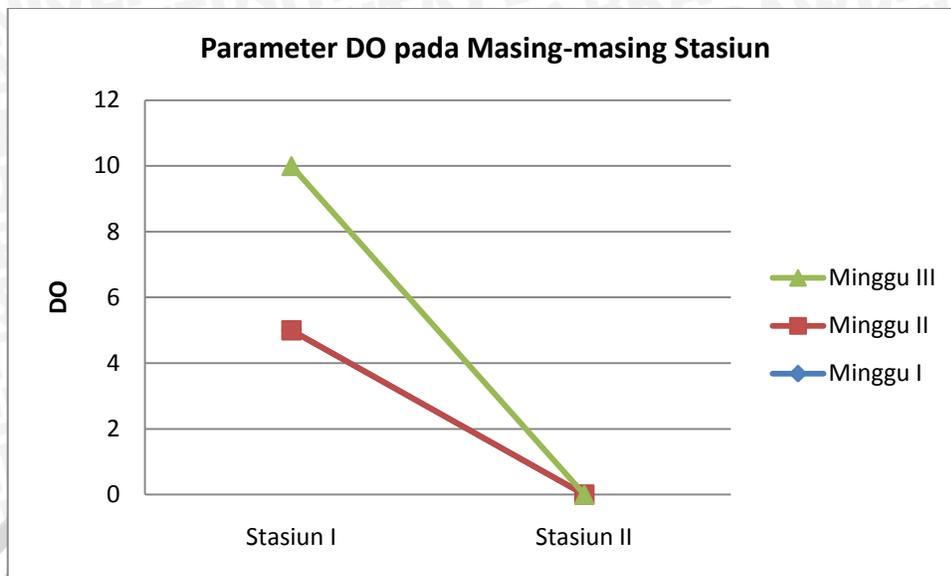
4.4.3 Oksigen Terlarut

Oksigen terlarut dalam air berasal dari fotosintesis, difusi dari udara, dan turbulensi atau pergolakan air. Oksigen terlarut dalam air diperlukan organisme untuk pernafasan dan metabolisme, sehingga oksigen terlarut menjadi sangat penting bagi kelangsungan hidup organisme perairan. Oksigen terlarut juga dibutuhkan dalam proses penguraian untuk menetralkan beban masukan yang berupa bahan organik. Dengan demikian oksigen terlarut dalam perairan tidak boleh kurang dari batas minimum untuk kelangsungan hidup organisme perairan (Subarijanti, 1990).

Berikut dapat dilihat hasil pengamatan oksigen terlarut pada masing-masing stasiun, seperti tercantum pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Pengamatan DO pada Masing-masing Stasiun (mg/L)

	Stasiun I	Stasiun II
Minggu I	5	5,5
Minggu II	4,7	4,9
Minggu III	5	4,5



Grafik 3. Grafik Parameter DO selama Penelitian

Dari grafik 3, dapat dilihat bahwa seperti yang dipaparkan oleh Effendi (2003), bahwa keadaan perairan dengan kadar oksigen rendah berbahaya bagi akuatik. Perairan yang diperuntukkan bagi kepentingan perikanan sebaiknya memiliki kadar oksigen terlarut tidak kurang dari 5mg/L. menurut Swingle (1969) dalam Effendi (2003), pada kadar oksigen terlarut antara 1,0 -5,0 ikan dapat bertahan hidup, tetapi pertumbuhannya terganggu.

4.4.4 Karbondioksida

Sumber karbon utama di bumi adalah atmosfer dan perairan, terutama lautan. Sedangkan sumber CO₂ dalam air adalah difusi dari udara, proses dekomposisi bahan organik, air hujan dan air tanah maupun hasil respirasi (Effendi, 2003).

Dari hasil yang diperoleh pada pengukuran karbondioksida di kolam-kolam budidaya ikan koi yang digunakan sebagai tempat penelitian, nilai karbondioksida berkisar antara 3,63 mg/L dimana nilai tertinggi terdapat pada stasiun 2 minggu I, yaitu 15,98mg/L, sedangkan nilai karbondioksida terendah terdapat pada stasiun 1 minggu III sebesar 3,63 mg/L. Secara lengkap hasil pengamatan dapat dilihat pada Tabel 6 berikut.

Tabel 6. Hasil Pengamatan CO₂ pada Masing-masing Stasiun (mg/L)

	Stasiun I	Stasiun II
Minggu I	10,05	15,98
Minggull	6,86	12,33
Minggu III	3,63	5, 27

4.5 Manajemen Kolam Budidaya Ikan Koi

4.5.1 Persiapan Kolam Pembudidayaan Ikan Koi

Kolam yang digunakan dalam usaha budidaya ikan koi terbagi menjadi tiga, yaitu kolam pemeliharaan induk, pemijahan induk (yang juga berfungsi sebagai kolam inkubasi telur dan pemeliharaan larva), serta kolam pendederan dan pembesaran (kolam ini dimiliki oleh petani yang melakukan kegiatan pendederan dan pembesaran ikan koi). Berdasarkan konstruksi, kolam yang digunakan untuk budidaya ikan koi oleh Bapak Sutadi terbagi dua jenis, yaitu kolam tanah dan kolam beton (yang dilapisi atau terbuat dari semen). Kolam beton digunakan untuk kegiatan pemijahan induk, inkubasi telur, pemeliharaan larva, pemberokan, persiapan *packing*, karantina ikan, dan *display*. Kolam beton tersebut terletak di pekarangan rumah Bapak Sutadi (*layout* tata letak kolam pembenihan ikan koi milik Bapak Sutadi dapat dilihat pada Lampiran 2).

Kolam pemeliharaan induk ditempatkan di area persawahan yang lahannya terbuka. Kolam induk terbagi menjadi beberapa petakan, ada yang memiliki dasar tanah dan ada yang dasar beton (semen). Kolam tanah berjumlah 2 unit, di sebelah utara dan sebelah selatan, dapat diisi dengan 15-25 ekor induk karena ukurannya yang lebih besar (Tabel 1). Kolam tanah utara memiliki dasar kolam yang melandai dari utara (*inlet*) ke selatan (*outlet*) dengan kedalaman air 0-50 cm, jenis tanah lempung berpasir, dan digunakan untuk pemeliharaan induk maupun calon induk ikan koi betina. Kolam tanah selatan posisinya terpisah sekitar 50 m dari kolam tanah utara. Memiliki dasar

tanah pasir berlempung, dan digunakan untuk pemeliharaan induk maupun calon induk ikan koi jantan.

Tabel 7. Fasilitas Kolam Budidaya Ikan Koi Milik Bapak Sutadi

No.	Jenis Kolam	Dimensi (m3)	Jumlah (unit)	Keterangan
1.	Pemeliharaan Induk a. kolam utara - kolam tanah - kolam beton b. kolam selatan	10 x 20 x 1 8 x 5 x 1 15 x 8 x 0,5	1 4 1	lokasi di area persawahan kolam tanah
2.	Pemijahan Induk	1,5 x 6 x 1	5	berfungsi juga sebagai kolam inkubasi telur dan pemeliharaan larva
3.	Kolam multifungsi	1,5 x 4,5 x 1 1,5 x 6 x 1	1 1	untuk pemberokan, persiapan <i>packing</i> , dan persiapan karantina
4.	Kolam <i>display</i>	1,5 x 6 x 1,5	1	

Kolam beton berjumlah 4 petak yang disusun seri dan terletak bersebelahan dengan kolam tanah utara (Gambar 9a). Masing-masing kolam beton ditebar 10-15 ekor induk dan dibagi berdasarkan jenis kelamin induk, 2 petak untuk induk betina dan 2 petak untuk induk jantan. Posisi petakan kolam induk betina terletak di sebelah utara dan kolam induk jantan di sebelah selatan (Gambar 9b), dengan aliran air dari utara ke selatan.



a. Kolam utara



b. kolam selatan

Gambar 9 . Kolam Pemeliharaan Induk Ikan Koi

Area persawahan menjadi lokasi pemeliharaan induk maupun pemeliharaan benih ikan koi hingga mencapai ukuran pasar, sedangkan pembenihan sendiri dilakukan pada kolam yang terletak di pekarangan rumah Bapak Sutadi. Kolam di pekarangan rumah tersebut merupakan kolam beton yang memiliki dasar melandai ke arah *outlet*. Contohnya kolam pemijahan, inkubasi dan pemeliharaan larva (Gambar10). Namun, kolam *display* memiliki dasar kolam berbeda, yakni memiliki dasar yang miring sekitar 45° ke arah tengah kolam. Pada dasar kolam tersebut terdapat empat lubang *outlet*. Selain *outlet* dasar, terdapat satu buah *outlet* di permukaan kolam yang mengalirkan air ke dalam bak *filter* (Gambar 10d).



a. Kolam pemijahan



b. kolam inkubasi telur



c. Kolam pemeliharaan larva

d. kolam *display*

Gambar 10. Kolam Pendederan atau Pembesaran Ikan Koi Milik Kelompok Tani Sumber Harapan

4.5.2 Sistem Suplai Air

Suplai air untuk kolam di pekarangan rumah bersumber dari air tanah (sumur) yang dipompa dengan pompa air kemudian ditampung di sebuah menara dengan tandon yang terbuat dari semen, berukuran $2,5 \times 1 \times 1,5$ m³ dan terletak di belakang

rumah. Air dialirkan ke dalam kolam melalui kran air di pekarangan. Air tandon juga digunakan untuk kebutuhan rumah tangga seperti mandi, mencuci, dan memasak. Sedangkan suplai air untuk kolam pendederan, kolam pembesaran dan kolam induk di sawah adalah air dari saluran irigasi. Air irigasi juga digunakan oleh para petani untuk pengairan sawah dan ladang. Penggunaan air tanah maupun irigasi tersebut tidak melalui proses *treatment* terlebih dahulu, begitu pula dengan pembuangan. Pemasukan atau pembuangan air dalam jumlah besar biasanya menggunakan pompa air mesin HONDA (WB20XT, diameter *inlet* & *outlet*: 2 Inch & 3 Inch, kapasitas pompa: 800 L/menit).

4.5.3 Pemeliharaan Larva dan Benih

Larva yang baru menetas langsung dipelihara di kolam penetasan (inkubasi) telur, tidak dipindahkan ke kolam lain. Pemeliharaan larva dilakukan hingga mencapai ukuran benih 1,5 cm selama + 25 hari. Setelah pemeliharaan, benih tersebut akan ditebar ke dalam kolam pendederan pertama.

4.5.3.1 Pemberian Pakan

Larva tidak diberi pakan dari luar hingga kuning telur habis (+ umur 5 hari). Saat umur 5 hari dilakukan penjarangan larva untuk mencegah kematian masal karena jumlah yang terlalu padat. Penjarangan dilakukan dengan membagi larva yang ada ke dalam dua kolam pemeliharaan larva. Pada umur 5-8 hari larva tersebut sudah definitif dan dapat dikatakan sebagai benih. Selama 4 hari ini, benih sudah diberi pakan berupa kuning telur bebek (Gambar 11a) setiap 2 hari sekali. Pemberian pakan ini dilakukan dengan mencampur 2 butir kuning telur yang sudah direbus dengan 4 liter air, kuning telur dihancurkan sampai halus dan membentuk campuran. Kemudian campuran air dengan kuning telur tersebut disebarkan ke dalam kolam pemeliharaan benih secara

merata. Dan pada umur 8-25 hari benih (hingga panen) diberi pakan berupa cacing sutera (Gambar 11b). Penambahan cacing sutera dilakukan 2 hari sekali.



a. Kuning telur bebek

b. cacing sutera

Gambar 11. Pakan Larva Ikan Koi Hingga Menjadi Benih

4.5.3.2 Pengelolaan Kualitas Air

Wadah pemeliharaan larva adalah wadah yang sama dengan kolam pemijahan dan inkubasi telur. Jadi, sejak pemijahan hingga pemeliharaan larva tidak dilakukan pergantian air, hanya dilakukan penambahan air hingga ketinggian 60 cm untuk memelihara larva. Penambahan air dilakukan 2 kali dalam selama 1 siklus karena terjadi penyusutan, contohnya akibat evaporasi. Pada saat penelitian berlangsung, aerasi dihidupkan untuk menjaga suplai oksigen.

4.5.3.4 Kontrol Hama dan Penyakit Pada Pemeliharaan Larva dan Benih

Hama yang menjadi pengganggu pada pemeliharaan telur hingga larva antar lain ikan kecil, larva capung, keong, dan kodok bangkok. Ikan-ikan kecil yang menjadi hama selama pemeliharaan larva berasal dari sisa benih siklus sebelumnya yang tertinggal setelah proses pembersihan wadah atau masuk bersama enceng gondok. Ukurannya lebih besar daripada larva-larva yang ada. Ikan-ikan kecil ini dapat memakan larva dalam jumlah besar. Penanggulangannya adalah dengan mengeluarkan ikan-ikan kecil tersebut menggunakan serok.

Menurut Dart dan Iwan (2006), ukuran larva capung atau *dragon-fly larvae* (*Odonata* sp.) dapat mencapai 2 cm. Biasanya larva ini masuk kolam bersama dengan tanaman air karena tempat persembunyiannya di akar tanaman atau terbenam dalam kotoran kolam. Makanannya berupa larva ikan sehingga sangat merugikan. Dalam sehari saja bisa kehilangan banyak larva ikan. Pemberantasan hama ini dengan diserok karena mudah dilihat, lalu dimusnahkan. Bila jumlahnya terlalu banyak, pemberantasannya dengan pemberian insektisida Sumithion 0,01 ml/l air. Selain itu, pemberantasan dengan pengurasan kolam hingga bersih. Setelah dikeringkan, kolam dapat diairi untuk digunakan kembali.

Keberadaan kodok bangkok dalam kolam pun dapat merugikan. Berudu kodok ini memakan pakan ikan sehingga ikan menjadi kurang makan. Bahkan, kehadirannya bisa mengotori atau mencemari air. Telur kodok bangkok pun dapat meracuni ikan karena mengandung lendir (Dart dan Iwan, 2006). Hal inilah yang dapat mengakibatkan masuknya virus KHV ke dalam perairan dan menginfeksi ikan-ikan koi yang ada. Kodok bangkok yang berada disekitar kolam inkubasi telur maupun pemeliharaan larva dikontrol setiap pagi atau sore hari. Jika ditemukan kodok bangkok disekitar kolam, maka kodok tersebut akan dipindahkan/dibuang menggunakan serok agar jauh dari kolam.

4.6 Faktor Penghambat Manajemen Budidaya Ikan Koi

1. Jumlah air sangat terbatas pada musim kemarau sehingga perlu ada penjadwalan pemasukan air ke dalam kolam pembenihan maupun kolam induk dari sumbernya (air sumur maupun air irigasi), serta mencari alternatif lain sumber air seperti sumur artesis atau sumber lainnya.
2. Produksi belum optimal dengan sarana, metode, indukan, dan faktor lain yang dimiliki terutama pasca serangan KHV (tahun 2002).

3. Kualitas koi semakin menurun karena indukan yang dimiliki berkurang kualitasnya sehingga masih ada indukan yang terjangkit virus KHV dan menularkan pada ikan lainnya.
4. Pemulihan keadaan memerlukan modal yang cukup besar sehingga memberatkan pembudidaya

4.7 Analisis Pengembangan Budidaya

Dari beberapa hambatan-hambatan tersebut di atas, dapat dilakukan analisa pengembangan budidaya untuk mengurangi terjangkitnya KHV dan untuk lebih mengembangkan usaha di pembenihan ikan koi di Kelompok Tani Sumber Harapan, Kabupaten Blitar, Provinsi Jawa Timur, yaitu:

1. Perlu ada penjadwalan pemasukan air ke dalam kolam pembenihan maupun kolam induk dari sumbernya (air sumur maupun air irigasi), serta mencari alternatif lain sumber air seperti sumur artesis atau sumber lainnya.
2. Menjaga kualitas air agar tidak menurun sehingga KHV tidak dapat bertahan dan menjangkit ikan koi.
3. Seleksi terhadap ikan koi yang terjangkit virus KHV dengan ikan yang sehat perlu dilakukan lebih selektif lagi agar tidak mengurangi kualitas indukan lainnya.
4. Perlu teknologi pembuatan pakan sehingga dapat menekan biaya produksi yang relatif besar, mengingat kurangnya pakan akibat adanya kodok bangkok.

4.8 Penanganan Virus KHV

Munculnya penyakit pada ikan umumnya merupakan hasil interaksi yang kompleks antara 3 (tiga) komponen dalam ekosistem perairan yaitu :

1. Ikan yang lemah
2. Kualitas lingkungan yang buruk

3. Patogen yang ganas

Setelah dilakukan identifikasi KHV menggunakan metode imunositokimia dengan teknik Streptavidin Biotin, maka strategi mangemen kesehatan ikan harus difokuskan pada upaya pembenahan ke komponen tersebut antara lain :

4.8.1 Isolasi Wabah Penyakit

1. Tidak menggunakan atau memindahkan ikan dari lokasi terjadinya wabah.
2. Ikan yang sakit dan mati, segera dimusnahkan dengan menguburkannya di dalam tanah. Ikan yang masih bisa dikonsumsi dapat dimakan setelah dimasak dengan baik.
3. Tidak memakai air yang berasal dari aliran sungai atau irigasi yang telah terinfeksi. Gunakan air yang belum terkontaminasi.
4. Tidak menggunakan dan memindahkan peralatan atau sarana lain yang berasal tempat terinfeksi kecuali setelah didesinfeksi dengan PK (Kalium Permanganat) 1000 ppm.
5. Hindarkan perpindahan pekerjaan (orang) dari tempat terjadinya wabah ke tempat yang belum terinfeksi kecuali setelah didesinfeksi dengan alkohol 70%.

4.8.2 Mengurangi Penyebab Stress

1. Mengurangi fluktuasi/perubahan suhu air (KHV: (22-27) °C).
2. Hindarkan penanganan yang mengakibatkan stress seperti memindahkan ikan pada waktu awal terjadi wabah, memindahkan ikan yang masih terlihat sehat.
3. Tidak mengurangi volume atau menurunkan permukaan air secara mendadak.
4. Kurangi kepadatan ikan dalam bak/kolam.
5. Gunakan aerasi atau penambahan oksigen.
6. Berikan pakan yang berkualitas baik.

4.8.3 Meningkatkan Daya Tahan Ikan Terhadap Serangan Penyakit

1. Tambahkan vitamin C sebanyak 300 mg/kg ikan atau vitamin B kompleks melalui pakan atau suntikan.
2. Berikan imunostimulan melalui pakan
3. Gunakan ikan sisa yang selamat akibat serangan penyakit sebagai induk/calon induk dan hindarkan kondisi yang menyebabkan ikan tersebut stress. Tidak memindahkan calon induk tersebut dan benih yang dihasilkannya ke daerah lain terutama daerah bebas KHV.

4.8.4 Pengelolaan Wadah Budidaya

1. Kolam yang terinfeksi didesinfeksi dengan cara pengolahan kolam yang baik seperti pengapuran, pengeringan, dan lain-lain.
2. Sebaiknya air bekas budidaya, terutama dari kolam yang terserang wabah didesinfeksi dulu sebelum dibuang ke perairan umum.
3. Benih yang baru ditebar harus diamati selama 10 hari dan saat terjadi kematian ikan, dapat menggunakan antibiotik untuk mengurangi tingkat kematian.
4. Pemindahan ikan ke dalam sawah akan lebih efektif untuk mencegah dan mengurangi kematian karena peningkatan suhu air (29-30) °C.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan dan dari hasil yang telah diperoleh, dapat disimpulkan bahwa uji Imunositokimia dengan teknik Streptavidin Biotin (SB) merupakan salah satu uji diagnostik alternatif yang handal serta lebih sederhana dan praktis untuk identifikasi Koi Herpes Virus (KHV) dengan hasil yang lebih akurat.

Kesimpulan lain yang dapat diambil adalah bahwa manajemen pembudidayaan ikan koi di Kelompok Tani Sumber Harapan, Kabupaten Blitar, Provinsi Jawa Timur masih kurang memadai sehingga memungkinkan terjangkitnya KHV pada ikan budidaya.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan sehubungan dengan uji imunositokimia terutama pada metode Streptavidin Biotin (SB) untuk mengidentifikasi adanya Koi Herpes Virus (KHV) pada ikan koi (*Cyprinus carpio koi*) serta tindakan manajemen yang lebih baik untuk mencegah adanya KHV pada pembudidayaan.

DAFTAR PUSTAKA

- Amri, K., Khairuman. 2002. **Menanggulangi Penyakit pada Ikan Mas dan Koi**. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Anjarudin. 2007. **Dasar-Dasar Aquakultur Hama dan Penyakit Pada Pembudidayaan Ikan**. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Hasanudin. Makasar.
- Arfiati, D. 2001. **Limnologi Sub Bahasan Kimia Air**. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Malang.
- Athiyatillah. 2009. **Isolasi dan Identifikasi Bakteri**. <http://athiyatillah.blogspot.com>
- Bachtiar. 2002. **Mencemerlangkan Warna Koi**. Agro Media Pustaka. Jakarta.
- Baratawidjaya Karnen Gerna. 1996. **Imunologi Dasar**. Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia. Jakarta
- Barus, T. A. 2002. **Pengantar Limnologi Studi tentang Ekosistem Air Daratan**. Program Studi Biologi USU FMIPA. Medan.
- Boenich, T., A.J Farmilo, R. Stead, M. Key, R. elcher, R. Harvey, K. Atood. 2001. **Hand Book Immunochemical Staining Method Edisi-3**. Dako Dytomation. Carpentry. California.
- Dart, S. L. dan Iwan, D. 2006. **Penyakit Ikan Hias: Hama Ikan**. <http://hobiikan.blogspot.com/2009-01/penyakit-ikan-hias-hama-ikan.html>. diakses pada 22 Juni 2011.
- De Vito dan Skomal. 2001. **The Gold Fish**. Wiley Publishing, Inc.
- Effendi, H. 2003. **Telaah Kualitas Air bagi Proses Pengelolaan Sumberdaya dan Lingkungan dan Perairan**. Kanisius. Yogyakarta.
- Gilad, O.S, Y. Adkinson, K. ay, N.H. illits, H. Bercovier, and R.P Hendrick. 2003. **Moleculer Comparison of Isolates of an Emeging Fish Pathogen, Koi Herpes Virus, and The Effect of water Tempeature on Mortality of Experimentally Infected Koi**. Journal of Genera Virology. hal 661-684.
- Grimment, S., Janet V. warg, Rodman G Getchell, D. Johnson, and P.R. Bowser. 2006. **An Unusual Koi Herpesvirus Associated with a Mortality Event of Common Carp *Cyprinus carpio* in New York State, USA**. Journal of Event of wildlife Diseases.
- Hasan. 2002. **Metode Penelitian Masyarakat**. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.

- Ilouze, M., Davidson, Kahan, and Kotler. 2006. **Cyprinid Herpes Virus-3 (CyHV-3) Bears genes Distant Large DNA Viruses**. FEEBS Letters.
- Irianto, A. 2005. Patologi Ikan Teleostei. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Kresno. 2001. Immunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Malole. 2005. **Bahan Teori dan Praktikum Apresiasi Teknik Virologi dan PCR Penyakit Hean Akuatik**. Balai Besar Karantina Ikan Soekarno-Hatta. Jakarta.
- Perwira. 2008. **Budidaya Ikan Mas**. http://www.perwira_octopus39/ diakses tgl 13 Mei 2011 pukul 16.45 WIB.
- Pikarsky, E, A. Ronien, J. Abramoitz, B. Levavi, M. Hutoran, Y. Shapira, M. Steinitz, A. Perelberg, D. Soffer, and M. Kotler. 2004. **Pathogenesis of Acute Viral Disease Include in Fish by Carp Intertitial Nephritis and Gill Necrosis Virus**. Journal of Virology 78 (17): 9544-9551.
- Priyambodo. 2001. **Deteksi Bakteri Berselubung Antibodi dalam Sedimen Air Kemih dengan Uji Streptavidin Biotin**. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Sternberge, IA., 1979. **The Antibody Percxidase Antiperoxidase (PAP) Method In: Immunocytochemistri 2nd ed**. Jon iley and Sons. New York.
- Subarijanti, H.U. 1990. **Diktat Kuliah Limnologi**. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Sucipto, A. 2011**. Mengenal Biosecurity dalam Budidaya Ikan Mas. <http://www>.
- Taukhid. A, Sunarto, Koeshariyani, Supriyadi, Gardenia,. 2005. **Strategi Pengendaian Penyakit Koi Herpes Virus (KHVB) pada Ikan Mas dan Koi**. Makalah pada orkshop Pengendalian Penyakit Koi Herpes Virus (KHV) pada Budidaya Ikan Air Tawar. Bogor 28 September 2004.
- TIM UDANA. 2006. **Analisis Komoditas Unggulan dan Peluang Usaha (Budidaya Ikan Kerapu)**. Universitas Nusa Cendana Kupang. Kupang. diakses tanggal 18 Desember 2009.
- Waltzek dan Yuasa. 2005. **Collected Cses of Fish Disease**. Fresh Water Aquaquulture Development Centre Jambi and Japan International Cooperation.
- Windri, R. 2011. Penanganan Virus KHV. <http://www.trobos.com>. diakses tanggal 11 Agustus 2011 pukul 16.35 WIB.