

Gambaran darah ikan mas setelah divaksinasi dengan vaksin DNA dan diuji tantang dengan koi herpesvirus

Hematology of common carp following DNA vaccination and koi herpesvirus challenge test

S. Nuryati¹, N. A. Maswan¹, Alimuddin¹, Sukenda¹, K. Sumantadinata¹,
F. H. Pasaribu², R. D. Soejoedono², A. Santika³

¹Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,
Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga Bogor, 16680

²Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan,
Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor, 16680

³Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Tawar, Sukabumi

ABSTRACT

The study was aimed to determine the effectiveness of DNA vaccine doses on hematological aspect which represent immune response and its influence on common carp survival rate. DNA vaccines encoding the viral glycoprotein of koi herpesvirus (KHV) have been proved to highly protect the fish under laboratory condition. A dose of 12.5 µg/100 µl vaccine had resulted in a survival rate of 96.67 % during 30 days after challenge test with a lethal dose of KHV. Fish vaccinated using lower doses, i.e. 2.5 and 7.5 µg/100µl showed 100% mortality after 15 and 19 days challenge test respectively, whereas non vaccinated fish as a control showed 100% mortality after 17 days challenge test. Total leucocytes of the vaccinated fish were higher than control until 42 days post vaccination, but declined afterward. Phagocytic index of the vaccinated fish using 12.5 µg/100 µl was declined after 49 days post vaccination or 7 days post challenge test.

Key words: DNA vaccine, Koi herpesvirus (KHV), leucocyte, phagocytic index, *Cyprinus carpio*

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menguji pengaruh vaksinasi menggunakan vaksin DNA dengan dosis berbeda terhadap gambaran darah ikan sebagai representasi tanggap kebal ikan mas serta pengaruhnya terhadap tingkat kelangsungan hidup ikan mas. Vaksin DNA penyandi glikoprotein koi herpesvirus (KHV) dapat memberikan proteksi yang tinggi pada percobaan skala laboratorium. Vaksinasi dengan dosis 12,5 µg/100µl dapat mempertahankan kelangsungan hidup sebesar 96,67% selama satu bulan setelah uji tantang dengan virus KHV menggunakan dosis letal. Ikan yang divaksin dengan dosis yang lebih rendah yaitu 2,5 dan 7,5 µg/100µl mengalami kematian total berturut-turut setelah 15 dan 19 hari uji tantang, sedangkan ikan kontrol yang tidak divaksin mengalami kematian total setelah 17 hari uji tantang. Jumlah leukosit total ikan yang divaksinasi lebih tinggi dibanding dengan kontrol sampai hari ke-42, setelah itu mengalami penurunan. Indeks fagositosis ikan yang divaksin dengan dosis 12,5 µg/100µl mengalami penurunan setelah hari ke-49 atau 7 hari setelah uji tantang.

Kata kunci: Vaksin DNA, Koi herpesvirus (KHV), leukosit, indeks fagositosis, *Cyprinus carpio*

PENDAHULUAN

Koi herpesvirus (KHV) adalah virus yang menginfeksi ikan mas dan koi (Hedrick *et al.*, 2000). Virus ini pertama kali teridentifikasi pada tahun 1998 sebagai penyebab kematian massal ikan koi, baik stadia juvenil maupun dewasa yang dibudidayakan di Israel, Amerika Serikat dan Jerman (Hedrick *et al.*,

1999; Bretzinger *et al.*, 1999). Penyebaran virus ini sudah mencapai Eropa, Amerika Serikat, Jepang, Indonesia, Afrika Selatan, Thailand, Taiwan, Cina dan Malaysia (Haenen *et al.*, 2004; Sano *et al.*, 2004; Tu *et al.*, 2004). Virus KHV masuk ke Indonesia pada tahun 2002 melalui perdagangan ikan lintas negara (Sunarto *et al.*, 2005). Penyakit akibat virus yang sangat menular ini telah

menyebabkan kerugian finansial pada industri budidaya ikan mas dan koi (Hedrick, 1996; Haenen *et al.*, 2004).

Upaya penanggulangan yang dilakukan oleh masyarakat dengan menggunakan antibiotik maupun bahan kimia tidak membuat keadaan lebih baik. Antibiotik dapat meninggalkan residu di tubuh ikan dan mengakibatkan resistensi terhadap antibiotik bagi manusia yang mengkonsumsinya. Oleh karena itu, diperlukan suatu alternatif pencegahan yang dapat menghindari terjadinya infeksi oleh KHV yang berakibat kerugian karena terjadinya kematian massal. Salah satu cara efektif untuk pencegahan adalah dengan membuat kekebalan spesifik pada ikan melalui pemberian vaksin. Hal ini karena vaksin dapat merangsang kekebalan spesifik dan kekebalan yang timbul relatif tinggi. Vaksin DNA dapat dijadikan sebagai vaksin alternatif karena kelebihanannya yang dapat memperbaiki beberapa kelemahan vaksin tradisional (vaksin hidup dan vaksin mati) seperti resiko terjadinya infeksi (Hirono, 2006).

Penelitian ini bertujuan untuk menguji pengaruh vaksinasi menggunakan vaksin DNA dengan dosis berbeda terhadap gambaran darah ikan sebagai representasi tanggap kebal ikan mas terutama pada sistem vaskuler serta pengaruhnya terhadap tingkat kelangsungan hidup ikan mas.

BAHAN DAN METODE

Persiapan ikan uji

Ikan uji yang digunakan adalah ikan mas *Cyprinus carpio* strain wildan dari daerah Cianjur. Ikan yang berukuran 10-15 g tersebut diadaptasikan selama dua minggu sebelum perlakuan. Jumlah ikan yang digunakan sebanyak 60 ekor per perlakuan. Ikan dibagi menjadi dua kelompok, masing-masing kelompok sebanyak 30 ekor. Kelompok ikan pertama digunakan untuk pengamatan hematologi dan kelompok ikan kedua digunakan untuk pengamatan kelangsungan hidup ikan. Perlakuan yang diberikan adalah vaksinasi dengan dosis 2,5 µg/100µl; 7,5 µg/100µl; dan 12,5 µg/100µl serta kontrol (tanpa vaksinasi). Selama masa adaptasi maupun perlakuan ikan diberi pakan

komersial berupa pelet sebanyak 2 kali sehari, yaitu pagi dan sore.

Preparasi vaksin DNA

Penyiapan vaksin DNA KHV diawali dengan perbanyakan bakteri yang mengandung plasmid yang telah dikonstruksi dengan menyisipkan gen glikoprotein KHV (Nuryati *et al.*, 2010). Bakteri ini dikultur pada media 2xYT (triptone 1,5%, ekstrak ragi 1%, agar 1,5%) selama 16-18 jam diaduk menggunakan *shaker* dengan kecepatan 225 rpm pada suhu 37°C. Bakteri yang telah dipanen diambil plasmidnya melalui purifikasi plasmid menggunakan kit "GeneJET Plasmid Miniprep" (Fermentas Life Sciences, USA). Plasmid ini diencerkan menggunakan fosfat buffer salin (FBS) sehingga diperoleh dosis 2,5 µg/100µl; 7,5 µg/100µl; dan 12,5 µg/100µl.

Preparasi virus KHV

Sebanyak 1 g insang ikan mas yang terinfeksi KHV digerus kemudian disuspensikan dengan 9 ml larutan FBS. Suspensi insang ini disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang dihasilkan diambil dan disaring dengan kertas milipore 0,45 µm. Supernatan ini diencerkan sehingga didapatkan dosis atau konsentrasi virus sebanyak 10⁻³.

Uji tantang

Ikan yang telah divaksin dan telah dipelihara selama 6 minggu (42 hari) kemudian diuji tantang untuk melihat respons kekebalannya. Uji tantang dilakukan dengan menginjeksi virus aktif dosis 10⁻⁵, sebanyak 0,1 ml secara intramuskular (otot punggung) ke semua ikan uji.

Pengambilan darah

Pengambilan darah dilakukan setiap seminggu sekali selama pemeliharaan setelah vaksinasi dan uji tantang. Sebelum pengambilan darah, ikan terlebih dahulu dibius dengan minyak cengkeh House Brand (PD. Eltra Raya Perkasa, Tangerang) dosis 0,04 ppt. Pada saat pengambilan darah, ikan diletakkan dengan kepala di sebelah kiri. Jarum suntik (*syringe*) yang sebelumnya sudah dibilas dengan natrium sitrat 3% (sebagai antikoagulan) diarahkan ke bagian

vena kaudalis. Darah dihisap sampai batas yang diinginkan. Alat suntik dicabut, kemudian darah ditempatkan ke dalam eppendorf yang telah dibilas dengan natrium sitrat.

Penghitungan total leukosit

Penghitungan total leukosit dilakukan menurut metode Svobodova & Vyukusova (1991). Darah dihisap dengan pipet yang berisi bulir pengaduk warna putih sampai skala 0,5. Lalu ditambahkan larutan Turk's (berfungsi untuk mematikan sel-sel darah merah) sampai skala 11, pengadukan darah di dalam pipet dilakukan dengan mengayunkan tangan yang memegang pipet seperti membentuk angka delapan selama 3–5 menit sampai darah tercampur rata. Tetesan pertama larutan darah dalam pipet dibuang, selanjutnya larutan diteteskan pada haemocytometer tipe Neubauer kemudian ditutup dengan gelas penutup. Jumlah sel darah putih dihitung dengan bantuan mikroskop dengan perbesaran 400 x. Jumlah leukosit total dihitung sebanyak 5 kotak besar dan jumlahnya dihitung dengan rumus: Total leukosit = jumlah sel terhitung x 50 sel/mm³.

Indeks fagositosis

Penghitungan nilai indeks fagositosis dilakukan menurut Anderson & Siwicki (1993). Sebanyak 50 µl darah dimasukkan ke dalam mikrotiter *plate*, ditambahkan 50 µl suspensi *Staphylococcus aureus* dalam FBS (10⁸ sel/ml). Campuran darah dan bakteri dihomogenkan dan diinkubasi dalam suhu ruang selama 20 menit. Sebanyak 5 µl campuran darah dan bakteri diambil untuk dibuat sediaan ulas darah.

Pembuatan preparat ulas darah dilakukan menurut Svobodova & Vyukusova (1991). Gelas objek yang akan digunakan, direndam dalam metanol untuk menghilangkan lemak yang menempel. Pembuatan preparat ulas darah dilakukan dengan menempatkan setetes darah pada gelas objek, gelas obyek kedua diletakkan dengan sudut 45° terhadap gelas obyek pertama, kemudian digeser ke belakang sehingga menyentuh darah. Selanjutnya gelas obyek kedua digeser berlawanan arah sehingga membentuk lapisan tipis darah. Preparat dikering-

udarkan dan selanjutnya difiksasi dengan metanol selama 5 menit. Preparat dibilas dengan akuades dan dikeringudarkan kembali sebelum diwarnai dengan pewarna Giemsa 10% selama 15 menit. Preparat dicuci kembali dengan akuades untuk mengurangi kelebihan warna dan dikeringkan dengan tisu.

Preparat ulas darah yang telah dibuat selanjutnya diamati dengan menggunakan mikroskop perbesaran 1000x. Aktivitas fagositosis dihitung berdasarkan persentase sel yang menunjukkan proses fagositosis dari 100 sel fagosit yang teramati.

Kelangsungan hidup Ikan

Kelangsungan hidup ikan dihitung dengan menggunakan rumus:

$$SR = \frac{N_t}{N_o} \times 100\%$$

Keterangan:

SR = kelangsungan hidup (kelangsungan hidup)

N_t = jumlah ikan yang hidup pada akhir pengamatan (ekor)

N_o = jumlah ikan yang hidup pada awal ujiantang (ekor)

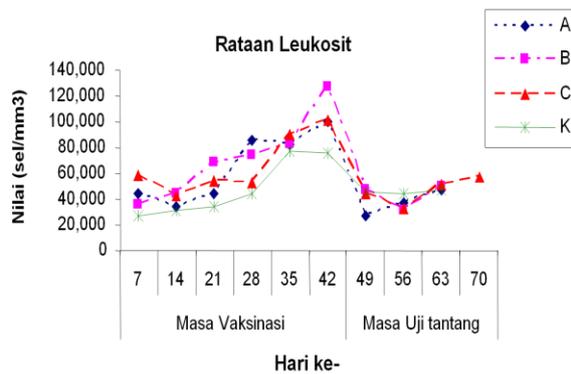
Analisis data

Penelitian yang dilakukan dirancang dengan menggunakan rancangan acak lengkap. Data yang diperoleh meliputi jumlah leukosit total, indeks fagositosis dan kelangsungan hidup ikan ditampilkan dalam bentuk grafik dan dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Leukosit total

Jumlah total rata-rata leukosit dalam darah ikan mas pada penelitian ini disajikan pada Gambar 1. Pengamatan terhadap jumlah total rata-rata leukosit dalam darah ikan mas pada perlakuan yang berbeda, menunjukkan bahwa nilai tertinggi terdapat pada perlakuan B yaitu 127.000 sel/mm³ pada hari ke-42 setelah ikan divaksinasi. Nilai terendah terdapat pada perlakuan A yaitu 27.200 sel/mm³, pada hari ke-49 (seminggu setelah uji tantang). Secara umum jumlah leukosit total mengalami peningkatan setelah vaksinasi, tidak terkecuali kontrol.



Gambar 1. Jumlah leukosit total ikan mas pada masing-masing perlakuan vaksinasi dosis 2,5 µg/100µl (A); dosis 7,5 µg/100µl (B); dosis 12,5 µg/100µl (C) dan tanpa vaksinasi (K).

Jumlah leukosit dalam darah ikan adalah 3.390-14.200 sel/mm³ (Salasia *et al.*, 2001). Jumlah leukosit terendah terdapat pada perlakuan A dan tertinggi pada perlakuan B berada di atas nilai normal. Kondisi ini menunjukkan bahwa ikan sedang merespons sesuatu, dalam hal ini diduga adalah glikoprotein KHV. Hal ini dapat dilihat dari kecenderungan jumlah leukosit pasca vaksinasi yang meningkat sampai menjelang ujiantang. Sekalipun demikian ikan percobaan tidak menunjukkan gejala klinis yang mengindikasikan bahwa ikan tersebut sakit. Jumlah leukosit ikan kontrol yang lebih rendah dibanding ikan perlakuan menunjukkan bahwa ikan kontrol maupun perlakuan berada dalam kondisi yang sama. Jumlah leukosit total pasca vaksinasi cenderung meningkat dan puncaknya pada hari ke-42 menjelang ujiantang. Dari grafik total leukosit tersebut dapat dilihat terdapatnya gap antara ikan kontrol dan ikan perlakuan. Gap ini kemungkinan disebabkan oleh ekspresi gen penyandi glikoprotein dari virus KHV yang tersisip dalam vaksin DNA yang diinjeksikan ke tubuh ikan perlakuan.

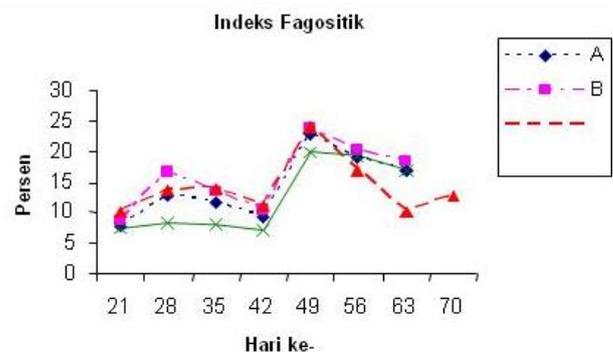
Pembentukan glikoprotein diawali dengan proses transkripsi yang dikendalikan oleh promoter yang berada pada posisi sebelah kiri (*up stream*) dari sekuens gen glikoprotein. Glikoprotein dengan jumlah yang semakin meningkat ini mendorong tubuh ikan untuk mengenali glikoprotein sebagai antigen. Tubuh ikan merespons dengan meningkatnya produksi sel-sel darah putih atau leukosit untuk menghadapi infeksi glikoprotein sebagai representasi virus KHV.

Dalam penelitian yang lain dapat dibuktikan bahwa gen glikoprotein yang tersisip dalam vaksin DNA terekspresi pada hari ke-14 setelah vaksinasi (Nuryati *et al.*, 2010). Transkripsi gen yang berulang mengakibatkan banyaknya glikoprotein yang dihasilkan.

Secara umum penurunan jumlah leukosit pada ikan perlakuan maupun ikan kontrol setelah ujiantang menunjukkan bahwa leukosit tersebut diduga aktif dan keluar dari pembuluh darah menuju jaringan yang terinfeksi. Penelitian ini hanya menghitung jumlah leukosit dalam saluran darah. Peningkatan jumlah leukosit seharusnya terjadi segera setelah infeksi. Peningkatan jumlah leukosit yang berfungsi dalam kekebalan seluler ini terjadi segera setelah sampai beberapa hari setelah infeksi, dan seminggu kemudian akan menurun. Peran kekebalan selanjutnya diambil alih oleh kekebalan humoral yaitu oleh antibodi.

Indeks fagositosis

Pengamatan terhadap nilai indeks fagositosis dalam darah ikan mas pada perlakuan yang berbeda, menunjukkan nilai yang berfluktuasi (Gambar 2). Secara umum indeks fagositosis ikan kontrol lebih rendah dibanding dengan ikan yang divaksinasi, baik sebelum maupun setelah ujiantang. Apabila dibandingkan kedua perlakuan yang lain, maka perlakuan C yaitu vaksinasi dengan dosis 12,5 µg/100 µl memiliki tren penurunan indeks fagositosis yang lebih tajam setelah hari ke-49 dibanding dengan perlakuan yang lain.



Gambar 2. Indeks fagositosis pada perlakuan vaksinasi dengan dosis 2,5 µg/100 µl (perlakuan A); 7,5 µg/100 µl (perlakuan B); 12,5 µg/100 µl (perlakuan C); dan tanpa vaksinasi (perlakuan K).

Namun demikian, penurunan indeks fagositosis ini berbanding terbalik dengan kelangsungan hidup ikan. Kelangsungan hidup ikan pada perlakuan C adalah 96,67% selama satu bulan setelah ujiantang.

Kondisi paradoks pada indeks fagositosis ini kemungkinan disebabkan karena ada kekebalan seluler lain yang aktif selain aktivitas fagositosis maupun kekebalan humoral yaitu antibodi. Hal ini menunjukkan bahwa dosis vaksinasi terbesar yaitu 12,5 µg/100 µl berpengaruh terhadap aktivitas kekebalan seluler yang ada pada sistem sirkulasi. Kemungkinan besar aktivitas fagositosis berlangsung di tempat terjadinya infeksi sehingga sel-sel leukosit yang ditemukan di pembuluh darah dan melakukan aktivitas fagositosis lebih rendah dibanding perlakuan A, B maupun kontrol. Hal ini juga sejalan dengan aktivitas kekebalan humoral yang diperankan oleh limfosit B.

Kresno (2001) menjelaskan bahwa limfosit yang teraktivasi akan berdiferensiasi dari sel kognitif yang mengenal antigen menjadi sel efektor yang berfungsi menyingkirkan antigen. Sel T-sitolitik yang berdiferensiasi mempunyai granula sitoplasmik lebih banyak yang mengandung protein yang berfungsi melisis sel sasaran. Limfosit B berdiferensiasi menjadi sel plasma yang memproduksi antibodi.

Sel plasma umumnya tidak terdapat dalam sirkulasi tetapi hanya terdapat dalam organ limfoid dan pada tempat-tempat terjadinya respons imun. Oleh karena itu perlakuan C yaitu vaksinasi dengan dosis 12,5 µg/100µl dapat meningkatkan peranan kekebalan seluler di jaringan yang terinfeksi. Hal ini didukung oleh data kelangsungan hidup ikan pada perlakuan C yang mencapai 96,67% sampai satu bulan setelah ujiantang dibandingkan dengan perlakuan A dan B dengan dosis vaksinasi 2,5 dan 7,5 µg/100 µl yang mengalami kematian total 2-3 minggu setelah ujiantang.

Fagosit adalah bagian paling kuat dan paling penting dari sistem pertahanan tubuh yang dapat beroperasi segera (tanpa penundaan) dalam melawan invasi mikroorganisme setelah melintasi permukaan tubuh dan masuk ke dalam tubuh (Mims, 2001). Indeks fagositosis ini mengalami

peningkatan setelah vaksinasi dengan vaksin DNA dan mengalami penurunan menjelang ujiantang dengan virus KHV. Tren peningkatan ini menunjukkan adanya korelasi antara vaksinasi dan ujiantang dengan aktivitas fagositosis. Pola peningkatan persentase indeks fagositik ini mencerminkan fungsi peningkatan total leukosit maupun persentase sel-sel leukosit masing-masing pada limfosit, monosit dan neutrofil. Proses fagositosis terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* menunjukkan terjadinya tahapan dari proses fagositosis. Pada proses tersebut meliputi tahap kemotaksis, tahap pelekatan, tahap penelanan dan tahap pencernaan (Tizard, 1988).

Penelitian ini tidak membedakan aktivitas masing-masing sel fagosit dalam memfagositosis benda asing termasuk mikroorganisme. Sebagai bahan perbandingan, Overlanda *et al.* (2009) membuktikan adanya aktivitas fagositosis yang berbeda antara sel B (limfosit) dan neutrofil. Sel B memiliki kemampuan fagositosis (*phago-cytosis activity*) yang lebih tinggi dibanding neutrofil pada ikan salmon dengan sampel yang diambil dari ginjal depan (*head kidney*), sedangkan kapasitas fagositosis (*phago-cytosis capacity*) sel B lebih rendah dibanding neutrofil. Kemampuan fagositosis sel B lebih rendah dibanding dengan neutrofil pada ikan cod dengan sampel yang diambil dari ginjal depan dan pembuluh darah tepi, sedangkan kapasitas fagositosis sel B lebih besar dibanding dengan sel neutrofil.

Kelangsungan hidup

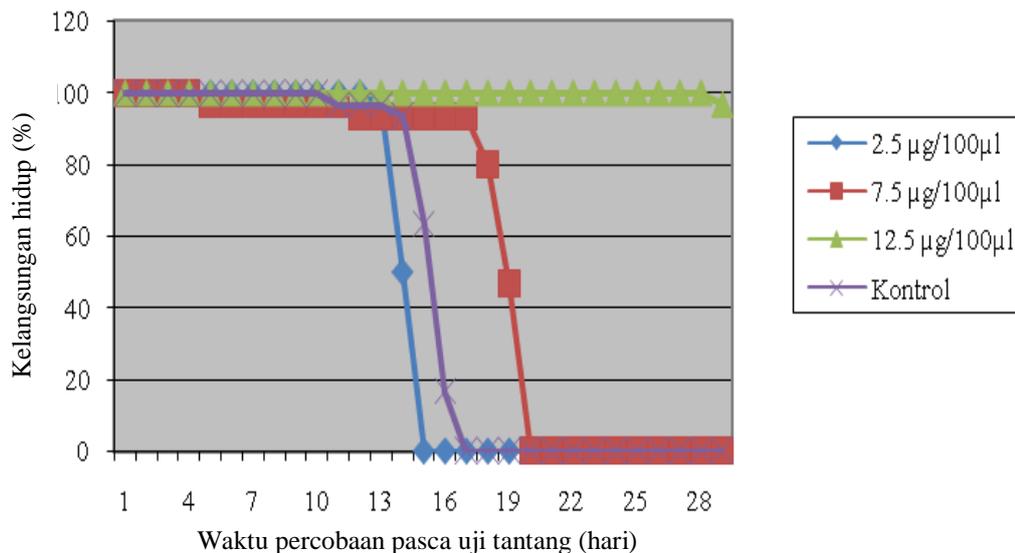
Kelangsungan hidup ikan perlakuan setelah ujiantang ditampilkan dalam grafik pada Gambar 3. Grafik tersebut menunjukkan bahwa ikan mengalami kematian setelah ujiantang dengan virus KHV. Terjadinya kematian ini menandakan bahwa virus KHV yang diinfeksi ke ikan mulai aktif. Hal ini turut pula didukung dari hasil pengukuran suhu harian diperoleh kisaran suhu harian 23,5-25°C. Kisaran suhu tersebut berada pada kisaran optimum bagi kehidupan (replikasi) KHV yaitu 18-25°C (Ronen *et al.*, 2003).

Vaksin DNA yang mengandung sisipan gen glikoprotein dan promoter β -aktin mampu meningkatkan kelangsungan hidup ikan yang divaksinasi. Vaksinasi menggunakan dosis 12,5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ (0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) memberikan kelangsungan hidup paling tinggi yaitu sebanyak 96,67% sampai 30 hari setelah uji tantang (sampai hari ke-70). Ikan perlakuan yang lain mengalami kematian total pada hari ke-15 (perlakuan A), hari ke-17 (ikan kontrol) dan hari ke-19 (perlakuan). Pola kematian ikan yang divaksinasi dengan dosis 2,5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ mendahului kematian ikan kontrol. Selisih waktu kematian selama dua hari ini kemungkinan disebabkan karena vaksinasi dilakukan melalui injeksi, sedangkan ikan kontrol tidak diberi perlakuan injeksi. Metode injeksi memungkinkan ikan untuk mengalami cekaman

sehingga daya tahannya terhadap virus KHV menjadi lebih rendah dibanding kontrol.

KESIMPULAN

Vaksin DNA yang mengandung gen penyandi glikoprotein dengan dosis 12,5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ (perlakuan C) dapat mempertahankan kelangsungan hidup ikan sebesar 96,67% selama 30 hari setelah uji tantang. Ikan yang divaksinasi dengan vaksin DNA 12,5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ memiliki kandungan leukosit total yang lebih tinggi dibanding dengan ikan kontrol dan menurun setelah uji tantang. Ikan yang divaksinasi dengan dosis tersebut memiliki aktivitas fagositosis yang lebih rendah dibanding dengan perlakuan A, B maupun kontrol.



Gambar 3. Kelangsungan hidup ikan mas *Cyprinus carpio* yang telah diberi perlakuan vaksinasi dengan dosis 2,5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ (perlakuan A); 7,5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ (perlakuan B); 12,5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ (perlakuan C); dan tanpa vaksinasi (perlakuan K) setelah uji tantang dengan virus KHV.

DAFTAR PUSTAKA

- Bretzinger, A., Fischer-Scherl, T., Oumouna, M., Hoffmann, R., Truyen, U., 1999. Mass mortalities in koi carp, *Cyprinus carpio*, associated with gill and skin disease. Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol. 19, 182-185.
- Haenen, O.L.M., Way, K., Bergmann, S.M., Ariel, E., 2004. The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 24, 293–307.
- Hedrick, R.P., Gilad, O., Yun, S., Spangenberg, J., Marty, R., Nordhausen, M., Kebus, M., Bercovier, H., Eldar, A., 2000. A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. J. Aquat. Anim. Health. 12, 44–55.
- Hedrick, R.P., Marty, G.D., Nordhausen, R. W., Kebus, M., Bercovier, H., Eldar, A.,

1999. An herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi *Cyprinus carpio*. *Fish Health Newsl. Am. Fish. Soc.* 27, 7.
- Hedrick, R.P., 1996. Movement of pathogens with the international trade of live fish: problems and solutions. *Rev. Sci. Technol.* 15, 523–531.
- Hirono, I., 2005. Biotechnology for prevention of infectious diseases of fish. www.soi.wide.ad.jp
- Kresno, S.B., 2001. *Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*, Edisi Keempat. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 341 hal.
- Lu, R., Pitha, P.M., 2001. Monocyte differentiation to macrophage requires interferon regulatory factor 7. *Journal of Biological Chemistry* 276, 45491-45496.
- Mims, C.A., Nash, A., Stephen, J., 2001. *Pathogenesis of Infectious Disease: 15th Edition*. Academic Press. London. 474 p.
- Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C., Studdert, M.J., 1999. *Veterinary Virology: 3rd Edition*. Academic Press. California-USA. 629 p.
- Nuryati, S., Alimuddin, Sukenda, Soejoedono, R.A., Santika, A., Pasaribu, F.H., Sumantadinata, K., 2010. Construction of a DNA vaccine using glycoprotein gene and its expression towards increasing survival rate of KHV-infected common carp (*Cyprinus carpio*). *Jurnal Natur Riau* 13 (1), 47–52.
- Overlanda, H.S., Petttersena, E.F., Ronnesetha, A., Wergeland, H.I., 2009. Phagocytosis by B-cells and neutrophils in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). Abstract online, doi:10.1016/j.fsi.2009.10.021.
- Ronen, A., Pereberg, A., Abramowitz, J., Hutoran, M., Tinman, S., Bejerano, L., Steinitz, M., Kotler, M., 2003. Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in culture *Cyprinus carpio*. *Vaccine Journal* 21, 4677-4684.
- Salasia, S.I.O., Sulanjari, D., Ratnawati, A., 2001. Studi hematologi ikan air tawar. *Biologi* 2(12).
- Sano, M., Ito, T., Kurita, J., Yanai, T., Watanabe, N., Satoshi, M., Iida, T., 2004. First detection of koi herpesvirus in cultured common carp (*Cyprinus carpio*) in Japan. *Fish Pathol.* 39, 165-168.
- Sunarto, A., Rukyani, A., Itami, I., 2005. Indonesian experience on the outbreak of koi herpesvirus in koi and carp (*Cyprinus carpio*). *Bulletin of Fisheries Research Agency, Yokohama, Japan.* 86:15-21.
- Svobodova, Z., Vyukusova, B., 1991. *Diagnostic, Prevention and Therapy of Fish Disease and Intoxication*. Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology Vodnany Czechoslovakia. [22 April 2009]. <http://www.fao.org/fi/web-site/firetriveaction.do?dom=topic&fid=16064&lang=en> [22 April 2009]
- Tizard, I., 1988. *An Introduction to Veterinary Immunology*. Second Ed. Wb. Sanders Company. Philadelphia.
- Tu, C., Weng, M. C., Shiau, J.-R., Lin, S.-Y., 2004. Detection of koi herpesvirus in koi *Cyprinus carpio* in Taiwan. *Fish Pathol.* 39, 109-110.
- www.biocarta.com/.../h_TCYTOTOXICPAT HWAY. 29 Desember 2009.