

Full Paper

PENGEMBANGAN METODE *LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION OF DNA* DAN APLIKASINYA UNTUK DETEKSI KOI HERPES VIRUS PADA BEBERAPA JENIS IKAN

DEVELOPMENT OF *LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION OF DNA* METHOD AND ITS APPLICATION TO DETECT KOI HERPES VIRUS IN FISHES

Murwantoko*, Triyanto dan Dimas A. Pamungkas

Jurusan Perikanan Fakultas Pertanian UGM
Jl. Flora Bulaksumur Yogyakarta 55281

*Penulis untuk korespondensi, E-mail: murwantoko@yahoo.com

Abstract

The purposes of this experiment were to establish loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP) method and its application to observe the presence and duration of koi herpes virus (KHV) in freshwater fishes after infection. The infection was carried out using 4-6 cm length of java barb (*Barbodes gonionotus*), grass carp (*Ctenopomus idella*), gold fish (komet) (*Carassius auratus*), tambaqui (*Colossoma macropomum*) and koi (*Cyprinus carpio koi*) fishes. Fishes were infected intraperitoneally with KHV inoculums and 2 fishes were sampled everyday. DNA was extracted from gill and used for diagnosis with LAMP assays. The result of this experiment showed LAMP assay can be established and gave 100 times more sensitive than conventional PCR assay. Koi was confirmed as a host of KHV. Java barb, tambaqui, gold fish and grass carp can serve as vector for KHV and the presence of KHV was detected in java barb and tambaqui for 4 days, goldfish and grass carp for 5 days after infection.

Key words: barb, grass carp, gold fish, KHV, koi, LAMP, tambaqui

Pengantar

Koi herpes virus (KHV) dikenal juga sebagai *cyprinid herpesvirus-3* (CyHV-3) atau *carp nephritis and gill necrosis virus* (CNGV) diklasifikasikan sebagai virus DNA famili herpesviridae (Hedrick *et al.*, 2000; Hartman *et al.*, 2008). Virion KHV mengandung kapsid berbentuk simetris *icosahedral* dengan diameter 100-110 nm dan virion yang sudah matang memiliki amplop yang diperoleh sewaktu *budding* melalui membran inti sel, sehingga diameter totalnya mencapai 170-230 nm (Pokorova *et al.*, 2005).

KHV ini telah mengakibatkan kematian massal (80-100%) pada budidaya ikan mas (*Cyprinus carpio carpio*) dan ikan koi (*Cyprinus carpio koi*) baik secara intensif dan non intensif dan menyebar di seluruh dunia (Way & Dixon, 2007). Gejala dari ikan yang terinfeksi KHV antara lain filamen insang rusak dan nekrotik, produksi lendir yang berlebihan, bercak-bercak putih pada kulit, mata tenggelam (*enophtalmos*), pendarahan di tutup insang, sirip, ekor dan ekor (Hedrick *et al.*, 2000; Sano *et al.*, 2005, Pokorova *et al.*, 2005; Sunarto *et al.*, 2005). Gejala internalnya meliputi nekrosis di hati, limpa dan ginjal (Crane *et al.*, 2004).

Keberadaan virus KHV pada beberapa spesies lain terutama dari famili Cyprinidae telah dibuktikan

oleh beberapa peneliti. Penyakit yang disebabkan oleh KHV pada spesies selain karper dan koi masih diperdebatkan. Ikan maskoki (*Carassius auratus*) dilaporkan resisten terhadap KHV dan tidak menunjukkan gejala penyakit meskipun terdeteksi positif KHV (Hartman *et al.*, 2004; Perelberg *et al.*, 2003) Tetapi Way & Dixon (2007) melaporkan bahwa terjadi kematian pada beberapa ikan maskoki setelah 15 hari dikohabitasi dengan karper yang terinfeksi KHV dan pada jaringan maskoki yang mati ditemukan adanya KHV. Ikan tilapia (*Oreochromis niloticus*), *silver perch* (*Bidyanus bidyanus*), *silver carp* (*Hypophthalmichthys molitrix*) dan *grass carp* (*Ctenopharyngodon idella*) resisten terhadap serangan KHV meskipun telah dikohabitasi dengan ikan sakit pada temperatur yang optimal untuk terjadinya penyakit (Perelberg *et al.*, 2003). Meskipun ikan-ikan tersebut diperdebatkan dalam hal sebagai inang KHV, tetapi para peneliti meyakini ikan-ikan tersebut dapat berperan sebagai vektor untuk menularkan pada ikan karper ataupun koi (Way & Dixon, 2007; Bergman *et al.*, 2007).

Deteksi KHV dilakukan dengan pengujian PCR dari berbagai jaringan target terutama insang, ginjal, limpa (Gray *et al.*, 2002; Gilad *et al.*, 2002). Dari dasar metode PCR, telah dikembangkan metode *loop-*

mediated isothermal amplification of DNA (LAMP), yang mengamplifikasi DNA dalam kondisi isothermal dengan spesifitas dan sensitifitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan PCR (Notomi *et al.*, 2000; Gunimaladevi *et al.*, 2004; Soliman & El-Matbouli, 2005; Murwantoko, 2006).

Dalam konteks ikan sebagai vektor penyakit KHV, perlu dikaji berapa lama waktu virus dapat bertahan di dalam tubuh. Dan untuk mendeteksi keberadaan KHV dalam jaringan ikan sebaiknya menggunakan metode yang tingkat sensitivitasnya tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan KHV pada beberapa spesies ikan air tawar secara *time series* menggunakan metode deteksi LAMP.

Bahan dan Metode

Bahan

Ikan tawes (*Barbodes gonionotus*), grass carp (*Ctenoparingodon idella*), komet (*Carassius auratus*), bawal (*Colossoma macropomum*) serta koi (*Cyprinus carpio koi*) dengan ukuran 4-6 cm diperoleh dari petani ikan di Yogyakarta. Ikan-ikan uji di sampling dan diuji PCR untuk memastikan tidak terinfeksi KHV. Insang ikan karper yang terinfeksi KHV merupakan koleksi dari Lab Hama dan Penyakit Ikan UGM

Isolasi DNA

Isolasi DNA jaringan ikan dilakukan dengan metode yang dikembangkan oleh Wasko *et al.* (2003). Insang dari ikan yang terserang KHV dihomogenisasi dalam bufer TNES selanjutnya di-*digesti* dengan proteinase-K kemudian diinkubasikan selama 12 jam. Homogenat kemudian diekstraksi dengan Fenol : Kloroform : Isoamil alkohol selama 10 menit kemudian disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Supernatan diambil dan dipindahkan dalam tabung baru dan DNANYa dipresipitasi dengan menambahkan *ethanol absolute* dingin sebanyak 2,5 kali volume dan diendapkan dengan sentrifugasi 12.000 rpm selama 2 menit. Pelet dicuci dengan *ethanol 70%*, dan disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit. Pelet yang diperoleh diperoleh dikering anginkan dan dilarutkan dalam TE.

Reaksi Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

Primer yang digunakan dalam LAMP adalah primer yang didesain dengan menggunakan *software Primer Explorer* (Eiken Chemical co. Ltd) menggunakan template sequens ORF 2 penyandi protein membran KHV isolat Toba (Murwantoko, 2009). Primer yang

didesain yaitu KHV FIP (5'-gacagcgcgggtatgatg tagttttgacctacattgcctggacg-3'), KHV BIP (5'-tg ggcacctgctgaagctcctattttacagcgtgctggtgacg-3'), KHV F3 (5'-cttattcgggctgtgtctgct-3'), KHV B3 (5'-atacgcgctcataaccccg-3'). Reaksi LAMP dilakukan menggunakan *Bst DNA polymerase large fragment* (Biolabs) dalam buffer yang sudah disediakan dan ditambahi dengan 0,8mM betain , 1,4mM dNTP, primer FIP (1 µl), BIP (1 µl), F3 (0.5 µl), B3 (0.5 µl). Untuk optimasi reaksi dilakukan pada suhu 60, 62,5 dan 65°C. Selama 60 menit dan dilanjutkan pemanasan pada suhu 80°C selama 10 menit. Hasil reaksi yang optimum digunakan untuk pengujian selanjutnya.

Reaksi PCR

Primer yang digunakan dalam PCR adalah primer yang digunakan oleh Sari (2008) yaitu KHV ORF4-F (5'-tgtcctggatccatggcgtcaccacaaagct-3'), KHV ORF4-R (5'-ctccgagaattctcaccacatctgcccgtgta-3'). Primer ini mengamplifikasi ORF 4 Koi herpesvirus yang mengkode protein selubung utama dan menghasilkan produk berukuran 770 bp. PCR dilakukan menggunakan PCR kit GoTaq® Green Master Mix (Promega) dengan denaturasi awal pada suhu 95°C selama 5 menit, lalu memasuki siklus dengan suhu denaturasi 95°C selama 30 detik, *annealing* 55°C selama 30 detik, dan *extension* 72°C selama 1 menit sebanyak 30 siklus, *extension* tambahan 72°C selama 5 menit.

Agarose Elektroforesis

Produk LAMP selanjutnya dielektroforesis pada 2% agarose gel (Sigma) sedangkan produk PCR pada 1% agarose gel masing-masing selama 30 menit dalam buffer 10mM TAE pada 100 volt (V). Agarose direndam dalam ethidium bromide dan diamati di atas UV transiluminator.

Uji Infeksi KHV pada Karper

Insang dari karper dan koi yang positif terinfeksi KHV dihomogenasikan dengan pestle dalam PBS dengan pengenceran 20 kali (berat/volume). Selanjutnya homogenat disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Supernatan diambil lalu disaring dengan membran filter ukuran pori 0,2 µm (milipore). Infeksi muscular dan intraperitoneal dilakukan dengan menyuntikkan inokulum sebanyak 0,1 ml/ikan. Infeksi oral dilakukan dengan cara memasukkan ke dalam mulut (mencekok) ikan dengan inokulum sebanyak 0,1 ml/ikan. Infeksi rendaman dilakukan dengan cara merendam ikan dalam emulsi inokulum dengan konsentrasi 10 ml inokulum/1 liter air selama 4 jam.

Setelah diinfeksi, ikan dipelihara dalam ember bervolume 10 liter dengan padat tebar 5 ekor/ember. Selanjutnya ikan ditempatkan pada dua ruangan yang berbeda kondisi suhunya, Pakan diberikan sebanyak dua kali sehari dengan pellet secara *add satiation*. Pengamatan selama pemeliharaan dilakukan setiap hari, meliputi suhu air dengan termometer maksimum-minimum dan pengamatan gejala eksternal KHV yang muncul pada ikan uji yaitu gerakan renang, warna insang, dan posisi mata.

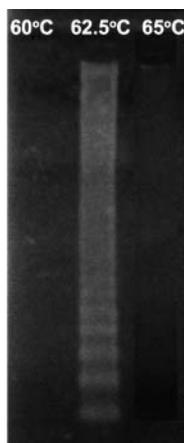
Uji Keberadaan KHV pada Ikan

Ikan tawes (*Barbodes gonionotus*), grass carp (*Ctenoparingodon idella*), komet (*Carassius auratus*), bawal (*Colossoma macropomum*) serta koi (*Cyprinus carpio koi*) diinfeksi dengan metode yang paling efektif hasil pengujian infeksi KHV pada karper. Setelah diinfeksi ikan-ikan tersebut dipelihara seperti pada pemeliharaan karper. Untuk uji keberadaan KHV dilakukan pengambilan sampel sebanyak 2 ekor ikan per masing-masing ikan uji setiap harinya. DNA diekstraksi dari jaringan insang dan dilihat keberadaan KHV dengan teknik LAMP.

Hasil

Optimasi LAMP

Optimasi LAMP bertujuan untuk mengetahui suhu yang optimal untuk terjadinya amplifikasi DNA. Amplifikasi reaksi LAMP 65°C menggunakan *template* yang merupakan isolasi DNA dari insang ikan yang positif terkena KHV dilakukan pada suhu 60, 62.5 selama 60 menit. Hasil reaksi positif dari LAMP adalah terbentuknya banyak pita yang muncul pada agarose dan terlihat adanya pita DNA dan pita *smear*. Berdasarkan pengamatan pada hasil agarose

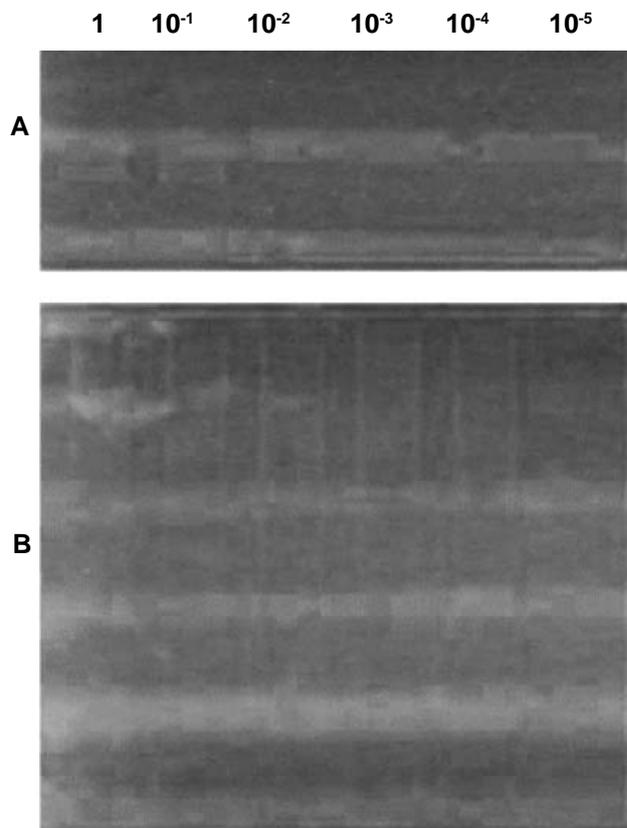


Gambar 1. Agarose elektroforesis uji optimasi suhu reaksi LAMP.

elektroforesis (Gambar 1), amplifikasi terjadi pada suhu 62.5 dan 65°C dan optimal pada suhu 62.5°C. Selanjutnya hasil optimasi ini akan digunakan dalam uji sensitivitas LAMP dan penelitian utama.

Sensitivitas LAMP

Sensitivitas uji LAMP dan PCR dilakukan menggunakan template DNA dari ikan yang positif KHV dengan beberapa seri pengenceran, yaitu 1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} dan 10^{-5} . Hasil positif PCR ditandai dengan adanya band tunggal yang muncul dan berukuran sekitar 1000 bp. Berdasarkan pengamatan hasil agarose elektroforesis, pada PCR amplifikasi terjadi sampai dengan konsentrasi pengenceran 10^{-2} (Gambar 2 A). Sedangkan pada LAMP hasil positif yang berupa pita *smear* bisa terlihat sampai pada pengenceran 10^{-4} (Gambar 2 B). Hal tersebut menunjukkan bahwa tingkat sensitivitas LAMP 100 kali lebih tinggi dibanding PCR.



Gambar 2. Hasil pengamatan agarose elektroforesis reaksi PCR (A) dan LAMP (B) dengan menggunakan seri pengenceran template DNA insang yang positif KHV.

Uji Infeksi KHV pada Koi (*Cyprinus carpio*)

Uji infeksi KHV ini bertujuan untuk mengetahui efektifitas beberapa metode infeksi pada ikan koi. Ikan

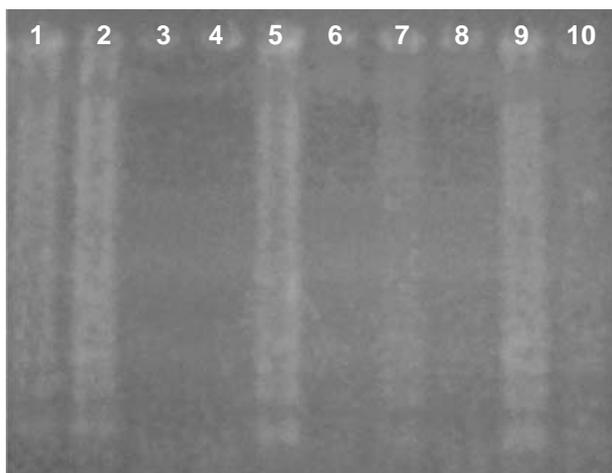
koi diinfeksi dengan inokulum KHV secara muscular, intraperitoneal, rendaman dan oral. Setelah diinfeksi, ikan diperlihara dalam ruangan dengan suhu yang berbeda. Hasil pengamatan menunjukkan gejala serangan KHV yaitu berenang di permukaan mulai terlihat pada hari ke 5 setelah infeksi, insang berwarna pucat dan mortalitas mulai terjadi pada hari ke 7 setelah infeksi. Mortalitas ikan pada masing-masing perlakuan dan kondisi suhu terlihat pada Tabel 1. Perlakuan yang memiliki efektifitas tertinggi yaitu infeksi intraperitoneal pada pemeliharaan suhu 26-27.5 atau suhu ruang dan selanjutnya akan digunakan pada uji berikutnya.

Tabel 1. Mortalitas ikan koi yang diinfeksi KHV (persen).

Perlakuan	Suhu	Suhu
	25-25,5°C	26-27,5°C
Oral	0	0
Rendam	0	20
Intraperitoneal	20	60
Intramuscular	20	20

Keberadaan KHV pada Ikan Air Tawar

Penelitian bertujuan untuk mengetahui keberadaan dan lamanya KHV pada ikan koi, tawes, komet, bawal dan *grass carp*. Ikan tersebut diinfeksi dengan inokulum KHV secara intraperitoneal dan diperlihara pada suhu ruang. Dua ekor ikan diambil dari masing-masing ikan perlakuan setiap harinya untuk diuji keberadaan KHV dengan LAMP. Hasil PCR menunjukkan bahwa ikan ikan yang digunakan sebelum perlakuan dalam uji ini bersih dari KHV.



Gambar 3. Pengamatan pada agarose elektroforesis hasil LAMP ikan uji satu hari setelah infeksi. Nomor 1-2: bawal, 3-4: grass carp, 5-6: koi, 7-8: komet dan 9-10: tawes.

Pada hari pertama setelah infeksi KHV mulai terdeteksi pada semua ikan uji, kecuali grass carp (Gambar 3). Hasil selengkapnya keberadaan KHV pada ikan-ikan uji terlihat dalam Tabel 2.

Tabel 2. Hasil pengamatan keberadaan KHV pada insang menggunakan metode LAMP pada beberapa jenis ikan yang diinfeksi KHV secara intraperitoneal.

Hari ke-	Jenis Ikan				
	koi	Bawal	grass carp	komet	tawes
	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2
0	-	-	-	-	-
1	++	++	--	++	++
2	++	-+	++	++	-+
3	-+	-+	-+	+-	-+
4	++	++	-+	++	++
5	++	--	+-	++	--
6	--	--	+-	--	--
7	-+	--	--	--	--
8	-+	--	--	--	--

Keterangan: (1): ulangan 1, (2): ulangan 2

Pembahasan

Teknik LAMP merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk deteksi DNA maupun RNA, dilakukan dalam kondisi *isothermal*. Optimasi LAMP dilakukan guna mengetahui suhu optimal terjadinya amplifikasi. Faktor yang menentukan nilai suhu optimasi reaksi LAMP adalah desain primer agar *temperature melting*-nya (T_m) berada pada kisaran yang optimum untuk aktivitas *Bst* DNA polymerase yaitu pada kisaran 60-65°C (Sambrook & Russel, 2001). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa suhu yang optimal adalah pada suhu 62,5°C. Hasil tersebut hampir sama dengan yang ditemukan Gunimaladevi *et al.* (2005) yang mendapatkan suhu optimal untuk reaksi LAMP untuk deteksi KHV pada suhu 63°C.

Pengujian perbandingan sensitivitas PCR dan LAMP dilakukan dengan seri pengenceran 1-10⁻⁵ DNA insang yang bergejala KHV sebagai template-nya. Hasilnya, LAMP mampu mendeteksi keberadaan DNA KHV sampai dengan pengenceran 10⁻⁴, sedangkan PCR hanya mampu sampai dengan pengenceran 10⁻². Artinya teknik LAMP ini 100 kali lebih sensitif dibanding PCR konvensional. Hasil-hasil penelitian sebelumnya LAMP lebih sensitif 100 kali dibandingkan PCR konvensional (El-Matbouli & Soliman, 2005), dan 10 kali dibandingkan nested PCR (Gunimaladevi *et al.*, 2005).

Dalam penelitian ini berhasil menunjukkan keberhasilan pengembangan metode LAMP untuk mendeteksi keberadaan KHV. Metode LAMP untuk KHV telah dilakukan oleh Gunimaladevi *et al.* (2005), El-Matbouli & Soliman (2005). Perbedaan utama dengan penelitian sebelumnya terletak pada primer yang digunakan. Dalam penelitian ini menggunakan template untuk dimasukkan dalam software desain primer berupa sekuen ORF2 KHV yang berasal dari isolate Toba, Sumatra Utara (Murwantoko, 2009).

Dalam penelitian ini dilakukan perlakuan infeksi secara oral, rendaman, intraperitoneal dan intramuscular. Gejala serangan KHV mulai terlihat pada hari ke 5 setelah infeksi, adapun gejala yang terlihat yaitu insang pucat dan berenang di permukaan. Hal tersebut seperti yang diungkapkan oleh Hedrick *et al.*, 2005 dan Sunarto *et al.*, 2005, bahwa ikan yang terserang KHV memiliki gejala berenang dekat permukaan air dan gerakannya tidak terkoordinasi (kehilangan keseimbangan), serta filamen insang pucat dan nekrosis.

Secara umum, temperatur pemeliharaan ikan dalam penelitian ini tidak berpengaruh nyata terhadap kematian ikan. Suhu pemeliharaan tersebut masih termasuk dalam rentang yang memungkinkan berkembangnya KHV. Infeksi intraperitoneal pemeliharaan pada suhu ruang memiliki tingkat mortalitas tertinggi yaitu 60%. Hal tersebut senada yang diungkapkan oleh Pikarsky *et al.* (2004), bahwa infeksi KHV secara intraperitoneal dapat mengakibatkan kematian hingga 85-100% pada temperatur permisif. Temperatur permisif serangan KHV berkisar antara 15-25°C (Pokorova *et al.*, 2005), 18-28°C (Pikarsky *et al.*, 2004), 18-27°C (Hartman *et al.*, 2008).

Pengamatan hasil uji LAMP pada koi menunjukkan bahwa KHV terdeteksi selama pengamatan. Hal tersebut menunjukkan bahwa karper merupakan *host* bagi KHV dan hal tersebut sesuai dengan pendapat Perelberg *et al.* (2003); Hedrick *et al.* (2005); Sunarto *et al.* (2005); dan Hartman *et al.* (2008). Hasil uji infeksi menunjukkan munculnya gejala KHV bahkan kematian pada ikan karper setelah diinfeksi dengan homogenat KHV. Menurut Siwicki *et al.* (2006), ikan menunjukkan gejala KHV setelah 3 hari pasca infeksi intraperitoneal yang dipelihara pada temperatur 22°C. Pada penelitian ini, ikan karper yang diinfeksi dan dipelihara pada suhu 26-27,5°C gejala mulai terlihat pada hari ke 5.

Berdasarkan hasil uji LAMP, keberadaan KHV dapat terdeteksi pada tawes dan bawal selama 4 hari, komet dan grasscarp selama 5 hari. Meskipun terdeteksi

positif KHV, tidak tampak munculnya gejala klinis KHV pada ikan uji yang tersebut di atas. Hal ini dimungkinkan karena ikan-ikan uji tersebut bukan merupakan *host* bagi KHV. Semua virus menunjukkan derajat spesifitas terhadap jaringan dan inang (Fenner *et al.*, 1993).

Menurut Bergman *et al.* (2007), beberapa spesies anggota famili cyprinidae, seperti maskoki, grass carp dapat menularkan KHV ke karper dan koi. Dari 5 ikan uji yang digunakan dalam penelitian ini, 4 diantaranya adalah famili cyprinidae, yaitu koi (*host*), grasscarp, komet dan tawes. Grass carp dapat dikatakan berperan sebagai *carrier* dan tidak menutup kemungkinan hal tersebut dapat terjadi pada ikan uji lainnya. Karantina perlu dilakukan sebelum melakukan penebaran jenis-jenis ikan tersebut pada kolam atau kawasan perairan yang terdapat *host* dan atau *suspect* KHV sebelum diketahui peranannya berkaitan dengan KHV untuk menghindari terjadinya penyebaran dan wabah KHV pada kawasan tersebut.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Ikan karper merupakan inang bagi KHV dan KHV bisa terdeteksi selama pengamatan.
2. Ikan tawes, bawal air tawar, grasscarp dan komet dapat berperan sebagai vector bagi KHV
3. Keberadaan KHV pada tawes dan bawal terdeteksi selama 4 hari, grasscarp dan komet selama 5 hari.

Daftar Pustaka

- Bergman, S.M., J. Kempter, M. Riechhardt & D. Fichtner. 2007. Investigation on The Host Specificity of Koi Herpesvirus (KHV) Infection: Presentation. Fredrich Loeffler Institut (FLI).
- Crane, M., M. Sano & C. Komar. 2004. Infection with Koi Herpesvirus-Disease Card. NACA, Bangkok. Thailand. 11pp.
- El-Matbouli, M. & H. Soliman. 2005. Rapid diagnosis of *Tetracapsuloides bryosalmonae*, the causative agent of proliferative kidney disease (PKD) in Salmonid Fish by a novel DNA amplification method, loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Parasitol Res. 96: 277-284.

- Gilad, O., S. Yun, K.B. Andree, M.A. Adkison, A. Zlotkin, H. Bercovier, A. Eldar & R.P. Hedrick. 2002. Initial characteristics of koi herpesvirus and development of polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio* koi. *Dis Aquat organ* 46:101-8.
- Gunimaladevi, I., T. Kono, M.N. Venugopal & M. Sakai. 2004. Detection of koi herpesvirus in Common Carp, *Cyprinus carpio* L., by Loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Fish Diseases* 27: 583-589.
- Gray W. L., L. Mullis, S.E. LaPatra, J. M. Groff & A. Goodwin. 2002. Detection of koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish. *J. Fish Dis.*, 25: 171-178.
- Hartman, K.H., R.P.E. Yanong, D.B. Puoder, B.B. Petty, R.F. Floyd & A.C. Riggs. 2008. Koi Herpesvirus (KHV) Disease. IFAS Extention. University of Florida.
- Hedrick R.P., O. Gilad, S. Yun, J.V. Spangenberg, G.D. Marty, R.W. Nordhausen, M.J. Kebus, H. Bercovier, & A. Eldar. 2000. A herpesvirus associate with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of a Common Carp. *J Aquat anim Health* 12: 44-57.
- Murwantoko. 2006. Metode loop-mediated isothermal amplification (LAMP) dan aplikasinya untuk deteksi penyakit ikan: mini review. *Jurnal Perikanan VIII* (1): 1-8.
- Murwantoko. 2009. Cloning ORF2 membrane protein of koi herpesvirus Indonesian isolate: Sequence analysis and genetic tracing. *Hayati* 16: 49-53.
- Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino & T. Hase. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*: 28-63.
- Perelberg, A., M. Smirnov, M. Hutoran, A. Diamant, Y. Bejerano & M. Kotler. 2003. Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured *cyprinus carpio* in Israel. *Isr. J. Aquac. Bamidgeh* 55: 5-12.
- Pikarsky, E., A. Ronen, J. Abramowitz, B. Levavi-Sivan, M. Hutoran, Y. Shaphira, M. Steinitz, A. Perelberg, D. Soffer & M. Kotler. 2004. Pothogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus. *J. Virol.* 78: 9544-9551.
- Pokorova, D., T. Vesely, V. Piackova, S. Reschova & J. Hulova. 2005. Current knowledge on koi herpesvirus (KHV): a review. *Vet. Med. Czech* 4:139-147.
- Sambrook, J and D.W. Russel. 2001. *Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Volume 2. 3rd Edition.* Cold Spring Harbor. New York.
- Sano, M., T. Ito, J. Kurita, S. Miwa & T. Iida. 2005. Diagnosis of koi herpesvirus (KHV) disease in Japan. *Bull. Fish. Ress. Agen. Supplement* (2): 59-64.
- Sari, D.W.K. 2006. Klonasi gen penyandi protein selubung utama virus herpes koi. Universitas Gadjah Mada. Master Thesis.
- Siwicki, A.K., A. Lepa, J. Mataczewska, B. Kazun, K. Kazun & E. Terech-Majewska. 2006. Isolation and indentification of CNVG in fingerling common carp (*C. carpio* L.). *Arch. Pol. Fish.* 14: 157-167.
- Soliman, H. & M. El-Matbouli. 2005. An inexpensive and rapid diagnostic method of koi herpesvirus (KHV) infection by loop-mediated isothermal amplification. *Virology journal* 2: 83.
- Sunarto, A., M.A. Rukyani & T. Itami. 2005. Indonesia experience on the outbreak of koi herpesvirus and carp (*Cyprinus carpio*). *Bull. Fish. Ress. Agen. Supplement* (2): 15-21.
- Wasko, A.P., C. Martins, C. Oliveira & F. Foresti. 2003. Non-destructive genetic sampling in fish, an improved method for DNA extraction from fish fin and scales.—*Herditas* 138: 161-165.
- Way, K. & P. Dixon. 2007. Koi herpesvirus- an update from the United Kingdom. *Virus Research. Aquaculture Health International* (10): 21-24.