

UJI KERENTANAN IKAN KERAPU LUMPUR, *Epinephelus coioides* DAN KERAPU BATIK, *Epinephelus microdon* TERHADAP INFEKSI IRIDOVIRUS

Ketut Mahardika, Zafran, Des Roza, dan Fris Johnny

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui sensitivitas ikan kerapu Lumpur, *E. coioides* dan kerapu batik *E. microdon* terhadap infeksi iridovirus. Ikan kerapu lumpur dan kerapu batik yang digunakan mempunyai rata-rata bobot tubuh: 51,71 g dan 13,22 g. Masing-masing 10 ekor ikan uji diberi perlakuan dengan menyuntikkan iridovirus secara intramuskular sebanyak 1 mL/kg BB dengan pengenceran, A) 10 kali, B) 10.000 kali, dan C) kontrol (PBS). Pengamatan dilakukan selama 21 hari terhadap gejala klinis dan mortalitas akibat serangan iridovirus, deteksi iridovirus dengan teknik PCR menggunakan primer spesifik dan pengamatan kerusakan jaringan secara histopatologi. Uji patogenisitas dilakukan secara terpisah untuk masing-masing spesies menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 3 ulangan. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa gejala klinis seperti nafsu makan menurun, lemah, berdiam di dasar bak, dan seperti tidur dengan satu sisi tubuh mulai terlihat 7—8 hari setelah infeksi. Sintasan yuwana kerapu lumpur pada perlakuan A) 90,0%; perlakuan B) 43,33%; dan perlakuan C) 100,0%. Sedangkan pada kerapu batik perlakuan A) 60,0%; perlakuan B) 26,67%; dan perlakuan C) 100,0%. Hasil deteksi virus menggunakan metode PCR ternyata ikan uji yang mati dari perlakuan A maupun B positif terinfeksi iridovirus. Sedangkan pengamatan secara histopatologi menunjukkan bahwa ikan uji yang sakit pada jaringan limpa dan ginjalnya terlihat adanya sel-sel yang membesar.

ABSTRACT: *Susceptibility test of the orange spotted grouper, Epinephelus coioides and marbled grouper, Epinephelus microdon to the iridovirus infection. By: Ketut Mahardika, Zafran, Des Roza, and Fris Johnny*

The aim of the experiment is to know the susceptibility of the orange spotted grouper (Epinephelus coioides), and marbled grouper (Epinephelus microdon) to the iridovirus infection. Fish used were juveniles stage with average body weight 51.71 g for orange spotted grouper, and 13.22 g for marbled grouper. Ten fish for each species were injected 1 mL/kg intramuscularly BW with iridovirus inoculums at 10; 10,000 fold dilutions; and phosphate buffered saline (PBS) as control. The experiments were conducted separately for each species in completely randomized design with three replicates. The clinical signs and mortality were observed for 3 weeks post infection. The pathogen was also detected by PCR and histopathology. The result showed that clinical signs of diseased fish including lost of appetite, weakened, resting on the bottom were observed at 7—8 days post infection. Average survival for orange spotted grouper 90.0% treatment (A) 43.33% treatment (B) and 100.0% treatment (C) and for marbled grouper were 60.0% treatment (A) 26.67% treatment (B) and 100.0% treatment (C). The dead fish from treated groups gave positive results with PCR test. Histopathological observation revealed the enlarged cells in spleen and kidney tissues.

KEYWORDS: *iridovirus, E. coioides, E. microdon*

PENDAHULUAN

Ikan kerapu merupakan salah satu jenis ikan laut yang semakin digemari oleh masyarakat. Kebutuhan ikan kerapu ini masih mengandalkan tangkapan dari alam sehingga lambat laun memungkinkan terjadinya penangkapan yang berlebihan (*over fishing*) baik dari segi ukuran maupun jumlah. Untuk mengantisipasi kondisi tersebut maka diperlukan upaya budi daya.

Kendala utama yang dihadapi di dalam budi daya ikan kerapu adalah kematian massal yang diduga disebabkan oleh penyakit, terutama penyakit virus seperti VNN (*viral nervous necrosis*) yang sering menimbulkan kematian massal pada larva dan yuwana ikan kerapu. Iridovirus dapat menimbulkan kematian massal pada ikan kerapu stadia pembesaran. Infeksi iridovirus diketahui tidak hanya menyerang ikan laut tetapi juga ikan air tawar (Sudthongkong *et al.*, 2002).

Kasus kematian massal akibat infeksi iridovirus pernah terjadi pada ikan kerapu lumpur di Sumatera Utara (Owen, 1993; Koesharyani *et al.*, 2001) dan di Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut (BBRPBL), Gondol-Bali yaitu ikan yang benihnya berasal dari Lamongan, Jawa Timur (Mahardika *et al.*, 2001). Penyakit ini dikenal sebagai penyakit *Sleepy Grouper Disease*. Iridovirus selain dapat menginfeksi dan menimbulkan kematian massal pada kerapu lumpur, juga dilaporkan menginfeksi dan menimbulkan kematian massal pada *red sea bream*, *Pagrus major* di Jepang (Inouye *et al.*, 1992; Nakajima & Sorimachi, 1994; Nakajima *et al.*, 1995), kerapu malabar, *Epinephelus malabaricus* di Thailand (Danayadol *et al.*, 1997; Kasornchandra & Khongpradit, 1997), *Epinephelus* sp. di Taiwan (Chou *et al.*, 1998), dan *brown-spotted grouper*, *Epinephelus tauvina* di Singapura (Chua *et al.*, 1994). Secara histopatologi ditemukan sel-sel yang membesar yang merupakan ciri khas dari infeksi iridovirus pada jaringan haematopoetik dan saluran pencernaan (Danayadol *et al.*, 1997; Mahardika *et al.*, 2001). Selain itu keberadaan virus ini di dalam tubuh ikan dapat dideteksi dengan *polymerase chain reaction* (PCR) (Kurita *et al.*, 1998; Koesharyani *et al.*, 2001).

Berdasarkan hal ini di BBRPBL, Gondol-Bali yang sedang mengembangkan budi daya berbagai jenis ikan kerapu, uji *susceptibility* (kerentanan) kerapu lumpur dan kerapu batik terhadap infeksi iridovirus diperlukan untuk mengetahui seberapa besar ikan kerapu rentan terhadap infeksi iridovirus. Dengan demikian akan dapat dilakukan upaya pencegahan serta penanggulangan terhadap penyakit ini.

BAHAN DAN METODE

Ikan Uji

Ikan uji yang digunakan adalah yuwana kerapu lumpur (*E. coioides*) dengan rata-rata bobot dan panjang total 51,71 g (42,95—65,4) dan 15,5 cm (11,8—18,4) dan kerapu batik (*E. microdon*) 13,22 g (9,33—18,46) dan 9,18 cm (8,7—10,0). Sebelum digunakan ikan uji tersebut diaklimatisasi selama 1—2 minggu.

Inokulum Virus

Inokulum virus dibuat dari yuwana kerapu lumpur yang terserang iridovirus secara alami (deteksi dengan PCR, positif terinfeksi iridovirus), dengan mengambil limpa dan ginjalnya kemudian digerus dan ditambahkan 10 mm *phosphate buffered saline* (pbs, pH 7,2) dengan perbandingan 1:9. Bahan disentrifugasikan dengan kecepatan 3.000 rpm selama 30 menit. Supernatannya disaring dengan

membran filter (0,45 mm) dan disimpan pada suhu -85°C sampai digunakan (Arimoto *et al.*, 1993). Sebelum digunakan, inokulum virus tersebut diujikan pada 10 ekor yuwana kerapu lumpur dengan konsentrasi 1 mL/kg BB dan diamati selama 3 minggu pemeliharaan.

Perlakuan

Masing-masing 10 ekor yuwana kerapu lumpur dan kerapu batik yang sehat, ditempatkan dalam bak fiber ukuran 200 L dan ditantang dengan iridovirus melalui penyuntikan secara intramuskular sebanyak 1 mL/kg BB dengan pengenceran, A) 10 kali, B) 10.000 kali, dan C) Kontrol (pbs). Selanjutnya ikan-ikan tersebut dipelihara dan diberi pakan pelet dua kali sehari selama 3 minggu. Pengamatan dilakukan terhadap gejala klinis dan mortalitas akibat serangan iridovirus, deteksi iridovirus dengan teknik PCR menggunakan spesifik primer dan pengamatan secara histopatologi. Uji patogenisitas dilakukan secara terpisah untuk masing-masing spesies dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 3 ulangan.

Deteksi Iridovirus dengan PCR

Deteksi iridovirus dengan metode PCR menggunakan organ limpa yang diekstraksi dengan ISOGEN sebanyak 800 mL dan disentrifugasi pada 12.000 g (*gravitation*) selama 10 menit. DNA diekstrak dengan 200 mL chloroform dengan sentrifugasi pada 12.000 g selama 15 menit, kemudian pelet DNA dicuci dengan alkohol absolut dan alkohol 75% berturut-turut dan disentrifugasi kembali pada 2.000 g selama 5 menit. Selanjutnya DNA dikeringkan dalam desikator selama 15—10 menit. Pelet kemudian dilarutkan dalam akuades steril dan siap digunakan untuk amplifikasi (Koesharyani *et al.*, 2001). PCR amplifikasi menggunakan DNA kit dari promega dan primer yang digunakan adalah hasil sekuensing dari genom DNA *red sea bream* iridovirus (RSIV) yaitu primer 1F dan 1R dengan target berat molekul 570 bp berdasarkan metode Kurita *et al.* (1998). Analisis hasil amplifikasi dilakukan dengan elektroforesis 100 V pada 1,5% gel agaros menggunakan *buffer* TAE (2 Na EDTA 2 Na, Triss dan Akuades) selama 20—25 menit. Kemudian dilakukan *staining* menggunakan *ethidium bromide* 0,5 mg/mL dalam *buffer* TAE. Pembacaan hasil elektroforesis menggunakan ultra violet transluminator.

Pengamatan Histopatologi

Pemeriksaan histopatologi dilakukan terhadap ikan uji yang sakit (*moribund*) dan 2—3 ekor ikan uji pada sampling akhir dari tiap-tiap perlakuan. Semua ikan setelah dilakukan pembedahan, dilihat kondisi organ

dalamnya. Selanjutnya organ dalam dari masing-masing ikan diambil (limpa, hati, ginjal, jantung, lambung, usus, dan insang) dan difiksasi dalam *phosphate buffer* formalin 10%. Khusus untuk insang setelah difiksasi dilakukan dekalsifikasi dengan 5% asam *formic* dalam *phosphate buffer* formalin 10% selama 1—2 hari dan dinetralisasi dengan 5% Na_2SO_4 dalam akuades. Selanjutnya diproses berdasarkan metode Gunarso (1989) yang telah dimodifikasi. Semua sampel di-*embedding* dalam *paraffin wax* dan dipotong dengan ketebalan 3—5 μm serta diwarnai dengan haematoxylin-eosin (H&E).

HASIL DAN BAHASAN

Pada uji pendahuluan infeksi iridovirus dengan konsentrasi 1 mL/kg BB terhadap 10 ekor yuwana kerapu lumpur menunjukkan gejala klinis dan kematian ikan uji terlihat mulai hari ke-7 setelah infeksi. Mortalitas mencapai 80% selama 3 minggu pemeliharaan. Sedangkan ikan-ikan uji pada perlakuan A maupun B mulai menampakkan gejala klinis pada hari ke-7 sampai hari ke-8 setelah infeksi, baik pada yuwana kerapu lumpur maupun kerapu batik. Ikan yang sakit menunjukkan gejala seperti nafsu makan menurun, terlihat lemah, berdiam di dasar bak, dan seperti tidur dengan satu sisi tubuh. Kemudian ikan-ikan tersebut akan mati beberapa jam setelah menampakkan gejala klinis. Jumlah kematian tertinggi terjadi pada hari ke-10 sampai hari ke-15 dan kematian tidak terjadi lagi mulai hari ke-18 sampai hari ke-19 setelah infeksi. Secara anatomi, terlihat adanya pembengkakan pada limpa (*spleenomegally*) (Gambar 2A) dan ginjal depan serta hati tampak lebih gelap. Gejala ini sama seperti pada kasus kematian akibat infeksi iridovirus pada ikan kakap merah, *Pagrus major* (Inouye *et al.*, 1992; Nakajima & Sorimachi, 1994; Nakajima *et al.*, 1995), pada ikan kerapu, *Epinephelus malabaricus* (Danayadol *et al.*, 1997; Kasornchandra & Khongpradit, 1997), pada kerapu *Epinephelus* sp. (Owen, 1993) yang dikenal dengan nama *Sleepy Group*

per Disease, pada kerapu lumpur, *E. coioides* dan *E. bleekeri* (Koesharyani *et al.*, 2001; Mahardika *et al.*, 2001).

Pada Tabel 1 terlihat bahwa sintasan yuwana kerapu lumpur setelah diinfeksi dengan iridovirus pengenceran 10 dengan 10.000 kali dan kontrol tidak berbeda nyata ($P>0,05$), dan antara kontrol dengan pengenceran iridovirus 10.000 terdapat perbedaan yang nyata ($P<0,05$). Sedangkan sintasan yuwana kerapu batik antar perlakuan menunjukkan perbedaan yang nyata ($P<0,05$). Hal tersebut menunjukkan bahwa iridovirus yang diisolasi dari yuwana kerapu lumpur dapat menginfeksi yuwana kerapu batik dan kerapu lumpur lainnya. Iridovirus bersifat patogen terhadap yuwana ikan kerapu lumpur dan kerapu batik di mana dengan pengenceran 10.000 kali masih menimbulkan mortalitas yang tinggi.

Iridovirus merupakan DNA virus yang diklasifikasikan ke dalam famili Iridoviridae dan dengan elektron mikroskop virus ini berbentuk hexagonal atau icosahedral dengan diameter yang bervariasi yaitu berkisar antara 120—240 nm serta berkembang pada sitoplasma sel-sel yang terinfeksi (Inouye *et al.*, 1992; Danayadol *et al.*, 1997; Jung *et al.*, 1997; Chou *et al.*, 1998).

Tabel 1 juga menunjukkan bahwa sintasan kerapu lumpur dan kerapu batik perlakuan A lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan B atau infeksi iridovirus pengenceran 10.000 kali lebih patogen dibandingkan dengan pengenceran iridovirus 10 kali. Menurut Mahardika *et al.* (2002), pembuatan inokulum iridovirus dari jaringan limpa ikan yang positif terserang iridovirus dimungkinkan mengandung faktor interferon yang diproduksi dalam jaringan limpa ikan donor sehingga dapat mencegah perbanyakan virus tersebut. Pengenceran inokulum akan membuat konsentrasi dari interferon sedikit bahkan tidak ada. Pengenceran inokulum yang mengandung sedikit virion, di mana penyebaran virus ini tidak mampu dicegah oleh interferon yang jumlahnya sedikit

Tabel 1. Rata-rata sintasan dua spesies yuwana ikan kerapu setelah diinfeksi dengan iridovirus selama 21 hari pengamatan

Table 1. Average survival rate of two species of fish grouper juveniles after experimentally infected with iridovirus for 21 days exposure time

Jenis ikan kerapu <i>Fish grouper species</i>	Rata-rata sintasan (%) pada masing-masing perlakuan <i>Average survival rate (%) of each treatment</i>		
	A) 10	B) 10,000	C) Kontrol (<i>Control</i>)
<i>E. coioides</i>	90.00 ^{ab}	43.33 ^a	100.00 ^b
<i>E. microdon</i>	60.00 ^b	26.67 ^a	100.00 ^c

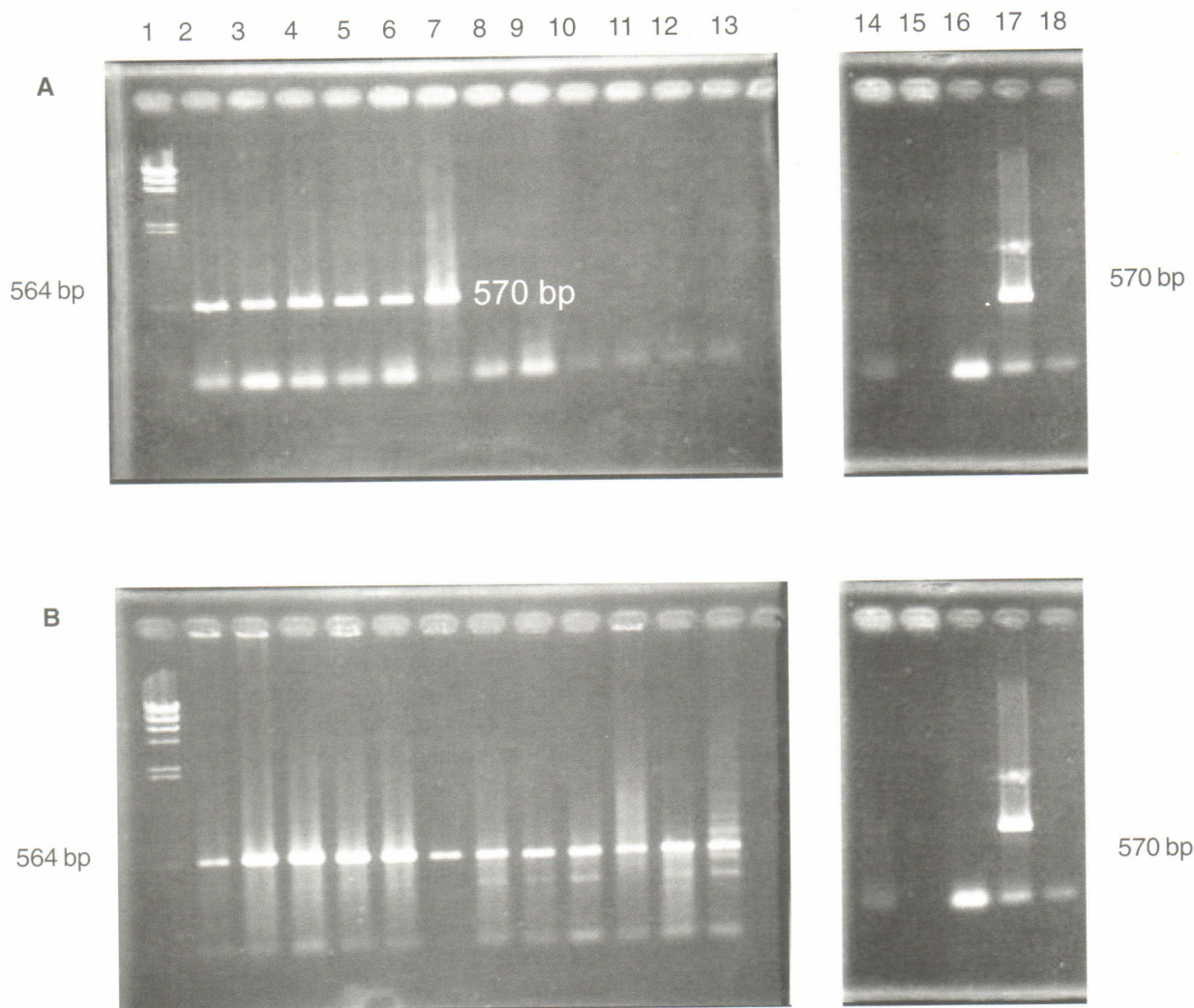
*) Perbandingan adalah horizontal. Angka yang diikuti huruf superskrip yang sama tidak berbeda nyata ($P>0,05$)

*) Comparison is horizontal. Values with the same superscript indicated not significantly different ($P>0.05$)

sehingga infeksi yang ditimbulkan lebih tinggi. Selanjutnya Imanishi (1997) mengatakan bahwa interferon dapat mencegah penyebaran virus di dalam sel inangnya. Oleh karena itu untuk mendapatkan virus murni diperlukan penanaman ke dalam biakan jaringan (*tissue culture*) yang spesifik terhadap virus tersebut.

Deteksi iridovirus dengan metode PCR menggunakan primer spesifik (RSIV) ternyata memberikan hasil positif. Hal ini terlihat dari gambaran hasil elektroforesis yaitu adanya garis *band* (570 bp) pada gel agarose. Hasil analisis elektroforesis untuk virus ini dapat dilihat pada Gambar 1.

Dari Tabel 2 terlihat bahwa ikan-ikan uji yang mati setelah diinfeksi dengan iridovirus pada perlakuan A dan B setelah dideteksi menggunakan metode PCR ternyata positif terinfeksi iridovirus. Ikan uji pada perlakuan A maupun B yang masih hidup yang diambil secara acak (masing-masing 2 ekor setiap ulangan) pada sampling terakhir pada yuwana kerapu batik masih dapat terdeteksi adanya iridovirus dalam organ limpanya, sedangkan pada yuwana kerapu lumpur semua hasilnya negatif. Selanjutnya pada kontrol (perlakuan C) dari kedua spesies yuwana ikan kerapu tersebut sampai sampling terakhir tidak terinfeksi



Gambar 1. A) Deteksi virus dengan PCR terhadap yuwana kerapu lumpur (*E. coioides*) dan B) kerapu batik (*E. microdon*) dari hasil elektroforesis pada gel agarose. 1) marker I Hind III, 2-7) hasil amplifikasi iridovirus dari ikan uji perlakuan A dan B yang mati, 8-13) hasil amplifikasi iridovirus dari ikan uji perlakuan A dan B pada sampling akhir, 14-16) hasil amplifikasi iridovirus dari ikan uji perlakuan C pada sampling akhir, 17) positif kontrol, 18) negatif kontrol

Figure 1. A) Agarose gel electrophoresis of PCR amplification products from *E. coioides* juveniles and B) 1) I Hind III marker, 2-7) iridovirus amplification product from dead fish tests, 8-13) iridovirus amplification product from fish tests treatment A and B of final sampling, 14-16) iridovirus amplification product from fish tests treatment C of final sampling, 17) positive control, 18) negative control

Tabel 2. Hasil deteksi iridovirus dengan metode PCR terhadap dua spesies yuwana ikan kerapu setelah diinfeksi dengan iridovirus
 Table 2. Iridovirus detection results with PCR method of two species of fish grouper juveniles after bring treated with iridovirus

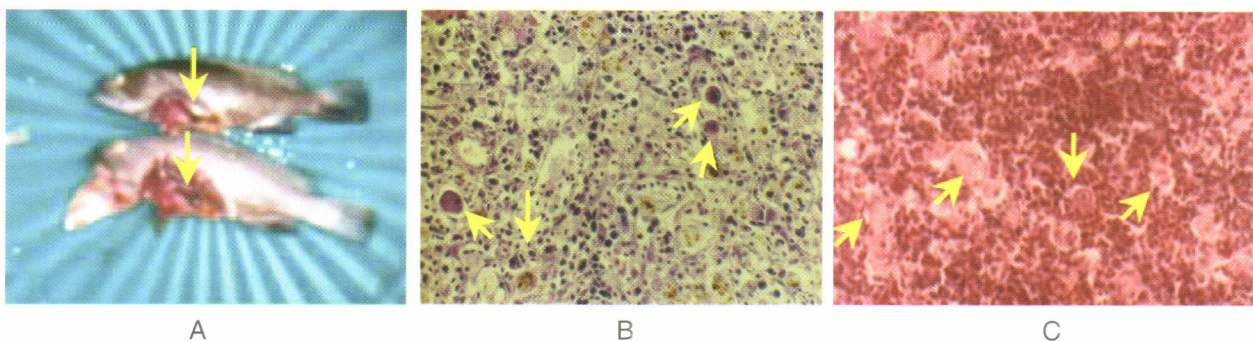
Jenis ikan uji (Fish tests species)	Hasil uji PCR dari ikan uji yang mati (PCR test results of dead fish)						Hasil uji PCR dari ikan uji pada sampling akhir (PCR test results of fish at the end of experiment)								
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
<i>E. cooides</i>	P	P	P	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<i>E. microdon</i>	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N

P : Positif terinfeksi iridovirus (positive iridovirus infection)
 N : Tidak/negatif terinfeksi iridovirus (negative iridovirus infection)
 A1-A3 : Penyuntikan iridovirus dengan pengenceran 10 kali (iridovirus injection with inoculums at 10 fold dilutions)
 B1-B3 : Penyuntikan iridovirus dengan pengenceran 10.000 kali (iridovirus injection with inoculums at 10.000 fold dilutions)
 C1-C3 : Group kontrol yang disuntik dengan pbs (control group were injected with pbs)

iridovirus. Ikan uji dari perlakuan A dan B yang masih hidup di mana dari uji PCR sudah positif terinfeksi iridovirus menunjukkan bahwa ikan uji tersebut masih tahan terhadap serangan virus tersebut. Ikan uji ini nantinya dapat bertahan hidup atau mengalami pemulihan kembali dan kemungkinan dapat membentuk antibodi atau bisa juga sebagai pembawa (carrier).

Secara histopatologi, dari kedua ikan uji (yuwana kerapu lumpur dan kerapu batik) yang sakit pada perlakuan A maupun B menunjukkan perubahan yang sama seperti pada organ limpa, ginjal depan, dan ginjal belakang terlihat adanya nekrosis sel serta sel-sel yang membesar (Gambar 2B dan C). Pada organ hati terlihat adanya akumulasi darah secara tidak

normal (congesty) dan perdarahan (hemorrhage) serta pada beberapa ikan ditemukan adanya nekrosis sel-sel hati dengan sel-sel yang membesar di sekitar pembuluh darah. Sedangkan pada lambung, usus, jantung, dan insang tidak ditemukan adanya sel-sel yang membesar. Sel-sel yang membesar atau oleh peneliti-peneliti lainnya disebut sebagai *ballooned cell*, *heteromorphic balloon cells*, *productively infected cells*, *giant cells*, *basophilic enlarged cells*, merupakan ciri khas dari infeksi iridovirus (Chua et al., 1994; Danayadol et al., 1997; Jung et al., 1997; Chou et al., 1998). Adapun target organ dari iridovirus adalah jaringan pembuat darah (haematopoietic tissue) yaitu limpa dan ginjal (Danayadol et al., 1997).



Gambar 2. A) Organ dalam dari yuwana kerapu lumpur yang terinfeksi iridovirus yang ditandai dengan organ hati berwarna lebih gelap dan pembengkakan pada limpa (tanda panah), B) Sel-sel limfoid yang membesar (tanda panah) pada pulpa limpa kerapu lumpur, dan C) Sel-sel pembuat darah (haematopoetik) yang membesar (tanda panah) pada jaringan ginjal depan kerapu lumpur (pewarnaan H&E, 40 X)

Figure 2. A) Internal organ of the orange spotted grouper juveniles infected with iridovirus showing liver darkened coloration and enlarge of spleen (arrow), B) Enlarged lymphoid cells (arrow) in spleen pulp of the orange spotted grouper, and C) Enlarged haematopoietic cells (arrow) in anterior kidney tissue of the orange spotted grouper (H&E stain, 40 X)

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa yuwana kerapu lumpur dan kerapu batik rentan terhadap infeksi iridovirus. Iridovirus dengan pengenceran 10.000 kali masih menimbulkan kematian tinggi pada yuwana kerapu lumpur dan kerapu batik. Secara histopatologi, kedua yuwana ikan kerapu ini menunjukkan perubahan yang sama yaitu ditemukan adanya sel-sel yang membesar pada jaringan limpa dan ginjal.

DAFTAR PUSTAKA

- Arimoto, M., K. Mori, T. Nakai, K. Muroga, and I. Furusawa. 1993. Pathogenicity of the causative agent of viral nervous necrosis disease in striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch and Schneider). *J. Fish Disease*, 16: 461—469.
- Chou, H.Y., C.C. Hsu, and T.Y. Peng. 1998. Isolation and characterization of a pathogenic iridovirus from cultured grouper (*Epinephelus* sp.) in Taiwan. *Fish Pathol.*, 33: 201—206.
- Chua, F.H.C., M.L. Ng, K.L. Ng, I.J. Loo, and J.Y. Wee. 1994. Investigation of outbreaks of a novel disease, Sleepy Grouper Disease, affecting the brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina* Forskal. *J. Fish Dis.*, 17: 417—427.
- Danayadol, Y., S. Direkbusarakom, S. Boonyaratpalin, T. Miyazaki, and M. Miyata. 1997. Iridovirus infection in brown-spotted grouper (*Epinephelus malabaricus*) cultured in Thailand. In T.W. Flegel and I.H. MacRae (eds.), *Diseases in Asian Aquaculture III*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, p. 67—72.
- Gunarso, W. 1989. *Mikroteknik*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat Institut Pertanian Bogor.
- Inouye, K., K. Yamano, Y. Maeno, K. Nakajima, M. Matsuoka, Y. Wada, and M. Sorimachi. 1992. Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.*, 27: 19—27. (In Japanese with English summary).
- Imanishi, J. 1997. Interferon. In: Hatanaka S (ed.) *Virology*. Asakura-shoten, Tokyo, p. 158—165 (in Japanese).
- Jung, S., T. Miyazaki, M. Miyata, Y. Danayadol, and S. Tanaka. 1997. Pathogenicity of iridovirus from Japan and Thailand for the red sea bream *Pagrus major* in Japan, and histopathology of experimentally infected fish. *Fisheries Science*, 63: 735—740.
- Kasornchandra, J. and R. Khongpradit. 1997. Isolation and preliminary characterization of a pathogenic iridovirus in nursing grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Diseases in Asia Aquaculture III*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, p. 61—66.
- Koesharyani, I., K. Mahardika, K. Sugama, and K. Yuasa. 2001. Iridovirus penyebab kematian pada budidaya ikan kerapu lumpur, *Epinephelus coioides*: deteksi menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR). Prosiding *Teknologi Budi Daya Laut dan Pengembangan Sea Farming di Indonesia*. ISBN 979-8186-82-6. Departemen Kelautan dan Perikanan bekerja sama dengan JICA, p. 228—234.
- Kurita, J., K. Nakajima, I. Hirono, and T. Aoki. 1998. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA of red sea bream iridovirus (RSIV). *Fish Pathol.*, 33: 17—23.
- Mahardika, K., I. Koesharyani, K. Sugama, A. Priyono, and K. Yuasa. 2001. Studi histopatologi iridovirus pada *Epinephelus coioides* dan *Epinephelus bleekeri*. Prosiding *Teknologi Budi Daya Laut dan Pengembangan Sea Farming di Indonesia*. Dep. Kelautan dan Perikanan, p. 334—341.
- Mahardika, K., Zafran, A. Yamamoto, and T. Miyazaki (unpublished). Sensitivity of humpback grouper (*Cromileptes altivelis*) to GGSDIV (grouper sleepy disease iridovirus) of tropical iridovirus
- Nakajima, K. and M. Sorimachi. 1994. Biological and physico-chemical properties of the iridovirus isolated from cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.*, 29: 29—33.
- Nakajima, K., Y. Maeno, M. Fukudome, Y. Fukuda, S. Tanaka, S. Matsuoka, and M. Sorimachi. 1995. Immunofluorescence test for the rapid diagnosis of red sea bream iridovirus infection using monoclonal antibody. *Fish Pathol.*, 30: 115—119.
- Owen, L. 1993. *Report on Sleepy Grouper Disease*. Depart. of Biomedical and Tropical Veterinary Science, James Cook Univ. of North Queensland Townsville, Australia. 4,811 pp.
- Sudthongkong, C., M. Miyata, and T. Miyazaki. 2002. Iridovirus disease in two ornamental tropical freshwater fishes: African lamprey and dwarf gouramy. *Dia. Aquat. Org.*, 48: 163—173.