

KOLEKSI, KARAKTERISASI, DAN SELEKSI PLASMA NUTFAH IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) TAHAN PENYAKIT KOI HERPES VIRUS

Didik Ariyanto, Erma Primanita Hayuningtyas, dan Khairul Syahputra

Balai Penelitian Pemuliaan Ikan
Jl. Raya 2 Sukamandi, Subang 41256
E-mail: *didik_ski@yahoo.com*

(Naskah diterima: 6 Agustus 2013; Disetujui publikasi: 2 Mei 2014)

ABSTRAK

Wabah penyakit *koi herpes virus* (KHV) terjadi sejak tahun 2002 mengakibatkan jumlah produksi ikan mas nasional mengalami penurunan yang cukup signifikan. Salah satu alternatif penanggulangan penyakit KHV yang bisa dilakukan adalah perbaikan genetik untuk membentuk varietas unggul ikan mas tahan KHV. Pembentukan varietas unggul ikan mas tahan KHV dimulai dari kegiatan koleksi, karakterisasi, dan evaluasi plasma nutfah ikan mas. Koleksi plasma nutfah ikan mas dilakukan di beberapa daerah asal ikan mas antara lain di Kabupaten Kuningan, Bandung, Cianjur, dan Pandeglang (Banten). Karakterisasi plasma nutfah ikan mas hasil koleksi dilakukan dengan metode RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) dan evaluasi daya tahan plasma nutfah ikan mas terhadap serangan KHV dilakukan dengan ujiantang secara laboratorium menggunakan metode kohabitasi. Dari hasil kegiatan koleksi diperoleh lima strain ikan mas yang dominan dibudidayakan di Jawa Barat dan Banten, yaitu strain Majalaya (Bandung), Rajadanu (Kuningan), Wildan (Cianjur), Sutisna (Kuningan), dan Sinyonya (Pandeglang). Hasil karakterisasi menunjukkan derajat polimorfisme strain Majalaya, Rajadanu, Wildan, Sutisna, dan Sinyonya secara berturut-turut sebesar 67,71; 83,33; 83,33; 79,17; dan 79,17 dengan heterozigositas sebesar 0,233; 0,274; 0,297; 0,278; dan 0,299. Analisis lanjutan menggunakan program UPGMA mengelompokkan kelima strain tersebut ke dalam tiga kelompok genotipe, yaitu genotipe A (Rajadanu dan Majalaya), genotipe B (Sinyonya dan Wildan), serta genotipe C (Sutisna). Hasil ujiantang dengan KHV menunjukkan bahwa strain Rajadanu mempunyai sintasan tertinggi sebesar 40%, diikuti oleh strain Majalaya (36,67%), Sinyonya dan Sutisna (26,67%), serta Wildan (23,33%). Berdasarkan hasil tersebut, strain Rajadanu berpotensi besar dikembangkan sebagai varietas ikan mas tahan KHV.

KATA KUNCI: ikan mas, genotipe, daya tahan, KHV

ABSTRACT: *Collection, characterization, and selection of genotype of common carp resistance to koi herpes virus (KHV). By: Didik Ariyanto, Erma Primanita Hayuningtyas, and Khairul Syahputra*

In Indonesia, common carp culture production is the highest production number from aquaculture since 1992-1997. West Java contributes more than 60% from those national production. Outbreak of the specific disease, koi herpes virus (KHV) since 2002 has significantly decreased the common carp production. Several ways were conducted to protect the spread of this disease, such as the environment manipulation, improve the aquaculture technology, and improve the resistance or immunity of the fish cultured. Another way which was not carried out to against this specific disease is trough genetic improvement to get the specific pathogen resistance

(SPR) line of common carp. Common carp breeding program in RIFB (Research Institute for Fish Breeding) was started in 2010 with collection of the germplasm of common carp. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis was applied to characterize all the collection. Evaluation of its resistance to KHV was conducted with challenge test in laboratorium. There are five strains were collected from West Java, i.e. Majalaya (Bandung), Rajadanu (Kuningan), Wildan (Cianjur), Sutisna (Kuningan), and Sinyonya (Banten). RAPD analysis showed that the common carp strain was divided into three clusters, i.e. genotype A (Majalaya and Rajadanu), genotype B (Wildan and Sinyonya), and genotype C (Sutisna). Challenge test to evaluate the resistance of these genotypes showed that the Rajadanu strain has higher resistance to KHV, that is 40%, followed by Majalaya strain (36.67%), Sinyonya dan Sutisna strain (26.67%) and the last is Wildan strain (23.33%). Based on this results, breeding program to creates the specific pathogen resistance (SPR) line of common carp was suggested to conducted on Rajadanu strain.

KEYWORDS: common carp, genotype, resistance, KHV

PENDAHULUAN

Budidaya ikan mas (*Cyprinus carpio*) di Indonesia telah dimulai sejak akhir abad ke-19 (Poernomo, 2000). Selama kurun waktu tersebut sampai sekarang budidaya ikan mas terus berlangsung bahkan semakin berkembang. Ikan mas merupakan komoditas yang cukup banyak diproduksi oleh pembudidaya pada luasan hampir di seluruh wilayah Indonesia dan telah memberikan kontribusi ekonomi cukup besar. Hal ini tercermin dari angka produksi ikan mas yang menduduki urutan pertama dari produksi ikan hasil budidaya air tawar skala nasional selama kurun waktu 1992-1997. Sebagai gambaran, pada tahun 1996 produksi ikan mas menduduki peringkat pertama dari total produksi nasional ikan hasil budidaya dengan kontribusi sebesar 54,3% dari jumlah produksi nasional sebesar 328.475 ton atau setara dengan 178.362 ton (Ditjenkan, 1999). Namun demikian, timbulnya wabah penyakit yang disebabkan oleh virus (*Koi Herpes Virus*, KHV) pada tahun 2002 membuat usaha budidaya ikan mas mengalami penurunan yang sangat drastis. Kerugian yang ditimbulkan penyakit KHV pada tahun 2002 mencapai lebih dari US\$ 10.000.000 (Rukmono, 2005). Hal tersebut mengakibatkan sebagian besar pembudidaya ikan mas di beberapa sentra produksi seperti waduk Cirata dan Jatiluhur beralih ke komoditas lainnya seperti ikan nila dan patin.

Dalam rangka penanggulangan dan pengendalian penyakit KHV, beberapa strategi alternatif telah dilakukan antara lain melalui manajemen kesehatan ikan secara terpadu, penggunaan ikan mas bebas KHV, aplikasi

imunopropilaksis, dan lain-lain (Taukhid *et al.*, 2005). Dari beberapa strategi tersebut, pembentukan benih unggul ikan mas tahan KHV belum diinisiasi. Berdasarkan hasil-hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa karakter daya tahan ikan mas terhadap penyakit mempunyai kisaran yang relatif luas sehingga memungkinkan untuk dilakukan kegiatan pemuliaan khususnya program seleksi (*selective breeding*) (Kirpichnikov *et al.*, 1993; Fjalestad *et al.*, 1993). Taukhid *et al.* (2005) juga menyatakan bahwa dalam sebagian besar kasus *outbreak* KHV, menyisakan sekitar 15%-20% populasi yang mampu bertahan hidup (*survivors*). Populasi-populasi *survivors* tersebut perlu diselamatkan dan diharapkan dapat dijadikan sebagai populasi awal pengembangan ikan mas tahan KHV. Selain itu, banyaknya strain ikan mas yang berkembang di masyarakat pembudidaya juga merupakan modal penting dalam kegiatan pemuliaan.

Teknik pemuliaan ikan air tawar yang saat ini banyak dikembangkan adalah teknik seleksi dengan mengeksploitasi potensi dan karakter genetik, khususnya ragam gen aditif (V_A). V_A merupakan fungsi dari alel yang akan diturunkan melalui gamet haploid dari generasi ke generasi. V_A bersifat masing-masing gen menambah sifat-sifat tertentu dari suatu sifat, dengan kata lain setiap alel bersama-sama dengan kemampuan berbeda membentuk ragam fenotipe (V_p). Seleksi tidak menciptakan gen baru, namun eksploitasi V_A akan merubah frekuensi gen sehingga meningkatkan mutu genetik secara kualitatif dan kuantitatif dengan sasaran akhir adalah mendapatkan induk unggul sebagai tetua (*parent*). Peningkatan mutu genetik (*genetic gain*) pada induk

melalui seleksi akan mengubah rata-rata populasi turunannya ke arah yang lebih baik. Diperkirakan seleksi pada setiap generasi akan meningkatkan mutu genetik hingga 10%-15% (Tave, 1993; Falconer & Mackay, 1996; Hardjosubroto, 1994; Warwick *et al.*, 1995; Tave, 1996).

Penelitian ini bertujuan mendapatkan strain-strain plasma nutfah ikan mas yang tersebar di masyarakat khususnya di Jawa Barat, mengkarakterisasi masing-masing strain hasil koleksi, serta mengevaluasi daya tahannya terhadap infeksi KHV melalui ujiantang. Hasil evaluasi ini digunakan sebagai dasar dalam penentuan strain atau genotipe dalam program pembentukan varietas unggul ikan mas tahan KHV.

BAHAN DAN METODE

Koleksi Plasma Nutfah

Koleksi dimulai dengan mencari informasi mengenai keberadaan jenis-jenis ikan mas yang ada di beberapa daerah di Jawa Barat. Dalam kegiatan koleksi, diupayakan untuk mendapatkan induk-induk ikan mas yang sudah siap memijah. Namun jika tidak memungkinkan, koleksi dapat berupa calon induk maupun benih untuk dipelihara menjadi induk. Jumlah induk setiap strain sebanyak 25-50 ekor, terdiri atas jantan dan betina dengan perbandingan yang sama. Ikan mas hasil koleksi dibawa ke Balai Penelitian Pemuliaan Ikan (BPPI), Sukamandi dan diadaptasi pada sistem budidaya yang optimal. Pemeliharaan masing-masing strain dilakukan secara terpisah di kolam yang berbeda.

Karakterisasi Genotipe Plasma Nutfah

Isolasi DNA

DNA diisolasi dari jaringan organ sirip ekor setiap strain ikan mas hasil koleksi, yaitu strain Majalaya, Rajadanu, Sutisna, Wildan, dan Sinyonya. Jumlah sampel masing-masing strain sebanyak 10 ekor. Potongan sirip diawetkan dalam alkohol 95%. Jaringan sirip diekstraksi menggunakan metode ekstraksi *spin column* sesuai prosedur *DNeasy Blood & Tissue Kits* (Qiagen). Setelah diperoleh Genom DNA dilakukan pengecekan kuantitas dan kualitas DNA menggunakan DNA Analyzer (*Gene Quant, GE*). Kemudian masing-masing sampel disamakan konsentrasinya menjadi 450 mg/mL melalui pengenceran.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Tahapan pertama yang dilakukan dalam analisa *Randomly amplified polymorphic DNA* (RAPD) adalah tahapan *screening* terhadap beberapa *single* primer. Pada penelitian ini dilakukan *screening* dengan menggunakan 61 jenis primer, di antaranya: OPA (1-20), OPB (10), OPC (2, 14, 15), OPG (1-14), OPM (9, 12, 14), OPZ (1-20). Komposisi *reagen* PCR terdiri atas: 1 µL primer (1 µM), 1 µL DNA (450 µg/mL), 10 µL *2x hot star master mix* (Qiagen), dan 8 µL *nuclease free water* hingga total volume 20 µL. Selanjutnya dilakukan amplifikasi menggunakan *thermocycler gradient* (Esco) agar suhu *annealing* bisa diatur sesuai dengan *Thermal Melting* (TM) dari masing-masing primer. Program PCR terdiri atas denaturasi awal pada suhu 94°C selama dua menit, suhu denaturasi 94°C selama satu menit, *annealing* sesuai *Temperature Melting* primer selama satu menit, yang diulang sebanyak 35 siklus, dan *extension* 72°C selama dua menit, dan *extension* akhir pada 72°C selama tujuh menit. Setelah diperoleh jenis primer yang dapat memberikan *polymorphic*, selanjutnya dilakukan PCR pada sampel-sampel dari lima strain ikan mas tersebut.

Elektroforesis

Elektroforesis dilakukan pada gel agarose dengan konsentrasi sebesar 1,5% dalam 0,5 X *TBE Buffer* (Tris Borate EDTA). Produk PCR sebanyak 3 µL ditambah 1 µL *loading dye* dimasukkan dalam sumur elektroforesis. *Running* pada voltase 175 V selama 50 menit dengan DNA marker 100 bp dan 1 kb sebagai standar berat molekul menggunakan *Maxi-Standard Horizontal Gel Electrophoresis Unit* (Scie-Plas). Setelah di-*staining* menggunakan ethidium bromide selama sepuluh menit dan dibilas dengan aquades, hasilnya dapat divisualisasikan pada *gel doc UV transiluminator*. Fragmen yang dihasilkan diubah ke dalam data biner untuk dapat dianalisis menggunakan *software TFPGA*.

Analisis Data

Analisis data pada kegiatan karakterisasi secara genetika molekuler berupa zimogram hasil elektroforesis DNA yang diinterpretasi menjadi data frekuensi alel. Selanjutnya data tersebut digunakan untuk menghitung beberapa parameter struktur genetika populasi yang meliputi derajat polimorfisme, hetero-

zigositas, dan jarak genetik. Karakter genetik lima strain ikan mas dianalisis menggunakan program TFGA (*Tools for Population Genetic Analysis*) (Miller, 1997). Hubungan kekerabatan antara strain dianalisis dengan menggunakan jarak genetik berdasarkan program UPGMA mengikuti Wright (1978) dalam Miller (1997). Data yang dihasilkan dari penggunaan program tersebut berupa konstruksi pohon filogeni yang disajikan dalam bentuk dendrogram.

Evaluasi Daya Tahan Terhadap KHV

Penyiapan benih uji

Benih uji diperoleh dari pemijahan induk ikan mas hasil koleksi yang dilakukan dengan metode pemijahan buatan. Jumlah induk yang dipijahkan sebanyak lima pasang setiap strain. Pemijahan dimulai dengan pemilihan induk jantan dan betina yang sudah siap memijah. Keseragaman kematangan gonad dilakukan dengan pemberian suntikan hormon perangsang pemijahan pada bagian bawah sirip punggung induk ikan. Pada induk betina, dosis yang diberikan sebanyak 0,3 mL/kg bobot badan dan pada induk jantan sebanyak 0,15 mL/kg bobot badan. Setelah 12 jam pasca penyuntikan, dilakukan pengaliran (*stripping*) induk betina dan jantan. Proses fertilisasi dilakukan pada wadah plastik dan diaduk perlahan menggunakan bulu ayam yang sudah dibersihkan. Telur-telur yang sudah difertilisasi selanjutnya ditebar pada "kakaban" yang terbuat dari ijuk yang dijepit dua bilah bambu dengan ukuran 30 cm x 100 cm. "Kakaban" ditempatkan di dalam hapa ukuran 2 m x 2 m x 1,5 m yang sudah dipasang di kolam. Jumlah "kakaban" pada masing-masing hapa sebanyak dua buah. Selanjutnya telur dibiarkan di dalam hapa hingga menetas menjadi larva. Sampai hari ke-3 setelah menetas, larva belum diberi pakan karena masih dapat memanfaatkan makanan cadangan dari kuning telur (*endogenous feeding*). Pada hari ke-4-10, larva diberi pakan tambahan berupa kuning telur ayam rebus yang disaring halus. Selanjutnya pakan alami seperti *Moina* dan *Daphnia* diberikan sampai hari ke-20. Pada hari ke-15, larva mulai dikenalkan dengan pakan buatan berbentuk serbuk dengan kandungan protein 40%. Larva diberi pakan buatan secara keseluruhan mulai hari ke-21. Pemeliharaan pada tahap pendederan tersebut dilakukan selama dua bulan.

Pembuatan benih sumber infeksi KHV

Pembuatan ikan sumber infeksi KHV dimaksudkan sebagai ikan yang akan menularkan penyakit kepada ikan uji yang belum terinfeksi penyakit pada saat ujiantang. Pembuatan ikan sumber KHV dilakukan melalui injeksi *intramuscular* menggunakan *filtrate homogenate* KHV. *Filtrate homogenate* KHV diperoleh dari organ insang ikan mas yang sekarat (*moribund*) dan secara laboratorium positif terinfeksi KHV. Dosis *filtrate homogenate* KHV (pengenceran 10^{-5}) yang diinjeksi ke dalam tubuh ikan sebesar 0,1 μ L setiap benih ikan. Ukuran benih ikan sumber adalah 8-12 g/ekor. Jumlah ikan yang diinfeksi KHV melalui injeksi *intramuscular* sebanyak 50 ekor. Selanjutnya ikan yang terinfeksi KHV yang masih hidup digunakan untuk ujiantang menggunakan metode kohabitasi.

Uji tantang

Uji tantang dilakukan dengan menempatkan benih uji dari masing-masing strain ke dalam akuarium volume 60 L dengan kepadatan 30 ekor benih per akuarium. Pada masing-masing akuarium dimasukkan ikan mas terinfeksi KHV (benih sumber KHV) yang sudah disiapkan. Suhu air pada akuarium disesuaikan dengan suhu optimal bagi KHV untuk berkembang dengan baik, yaitu pada 20°C-22°C dengan cara mengatur suhu ruangan menggunakan alat pengatur suhu. Secara detail, ujiantang KHV menggunakan metode kohabitasi ini mengacu pada protokol ujiantang ikan mas dengan KHV (Protokol No. 03) yang dikeluarkan oleh Pusat Pengembangan Induk Ikan Mas Nasional, Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Tawar (BBPBAT) Sukabumi. Pengamatan dilakukan selama 14 hari.

Evaluasi daya tahan ikan mas hasil koleksi terhadap infeksi KHV meliputi gejala klinis dan tingkat sintasan benih yang diuji. Sebagai data dukung dilakukan uji laboratorium deteksi infeksi KHV untuk memastikan kematian ikan karena KHV. Data sintasan dianalisis menggunakan *analysis of variance* dan jika berbeda nyata dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan's. Selain itu, strain ikan mas yang mempunyai tingkat prevalensi rendah dan sintasan tertinggi dicatat sebagai strain dengan daya tahan tinggi terhadap serangan KHV dan dipilih sebagai bahan utama pembentukan populasi dasar ikan mas tahan KHV.

HASIL DAN BAHASAN

Koleksi Plasma Nutfah

Kegiatan koleksi plasma nutfah ikan mas Balai Penelitian Pemuliaan Ikan (BPPI), Sukamandi telah mendapatkan lima strain yang berbeda dari beberapa daerah yang berbeda. Jenis strain, daerah asal, jumlah, dan ukuran rata-rata masing-masing plasma nutfah disajikan pada Tabel 1.

Kegiatan koleksi plasma nutfah ikan mas yang dilakukan di wilayah Jawa Barat dan Banten mendapatkan lima strain ikan mas yang dominan dibudidayakan di sentra-sentra budidaya ikan mas. Kelima strain ikan mas yang diperoleh berasal dari daerah yang terpisah secara geografis. Kelima strain ikan mas tersebut adalah strain Majalaya yang berasal dari Bandung, strain Rajadanu dan Sutisna yang berasal dari Kabupaten Kuningan, strain Wildan yang dikembangkan di Kabupaten Cianjur dan strain Sinyonya yang berasal dari Kabupaten Pandeglang, Banten.

Plasma nutfah merupakan bahan utama dalam kegiatan pemuliaan, termasuk pemuliaan ikan. Hal ini karena masing-masing plasma nutfah mempunyai karakteristik tertentu yang hanya dimiliki oleh jenis tersebut (*specific characters*). Namun demikian, tidak menutup kemungkinan adanya kemiripan sifat-sifat pada beberapa jenis plasma nutfah. Perbedaan dan kemiripan karakter atau sifat pada suatu jenis plasma nutfah dapat dilihat pada performansi morfologis, fisiologis, maupun genetis.

Secara morfologis, masing-masing populasi plasma nutfah mempunyai karakteristik yang cukup signifikan. Ikan mas strain Majalaya mempunyai warna hitam di bagian punggung (*dorsal*) dan keputihan/kekuningan di bagian perut (*abdominal*). Beberapa ekor ikan mas strain ini berwarna kekuningan di bagian punggung. Salah satu ciri morfologis strain Majalaya adalah proporsi panjang dan lebar yang lebih besar sehingga terkesan mempunyai panjang badan relatif pendek. Ikan mas strain Rajadanu mempunyai warna hitam kehijauan di bagian punggung dan kekuningan di bagian perut dan batang ekor (*caudal peduncle*) hingga ekor (*caudal*). Secara umum bentuk badan strain ini panjang dengan punggung yang relatif tinggi dibanding kepala sehingga terkesan mempunyai kepala relatif kecil. Warna dan bentuk ikan mas strain Sutisna relatif mirip dengan strain Rajadanu tetapi dengan warna yang lebih hitam dan ukuran panjang yang lebih pendek. Kemiripan ini diduga karena secara geografis kedua populasi plasma nutfah tersebut berasal dari daerah Kuningan, Jawa Barat. Ikan strain Wildan yang berasal dari Kabupaten Cianjur memiliki karakteristik warna hitam muda (abu-abu) dengan proporsi panjang dan lebar badan mendekati strain Majalaya. Salah satu strain hasil koleksi yang paling mudah dibedakan dari koleksi lainnya adalah strain Sinyonya. Strain ini berwarna kuning mencolok hampir merata di seluruh bagian badannya tetapi warna ini sedikit memudar di bagian perut. Selain itu, ciri khas lainnya dari strain Sinyonya adalah bermata sipit.

Tabel 1. Jenis, daerah asal strain, ukuran rata-rata, dan jumlah ikan mas koleksi Balai Penelitian Pemuliaan Ikan, Sukamandi

Table 1. Strain, origin of strain, size, and number of common carp have been collected by Research Institute for Fish Breeding, Sukamandi

Jenis strain <i>Strain</i>	Daerah asal <i>Origin of strain</i>	Bobot individu <i>Individual weight</i> (g)	Jumlah (ekor) <i>Number of fish (ind.)</i>		
			Jantan <i>Male</i>	Betina <i>Female</i>	Jumlah <i>Total</i>
Rajadanu	Kuningan	1,000-5,500	25	15	40
Sutisna	Kuningan	400-1,500	15	15	30
Majalaya	Bandung	700-3,200	20	15	35
Wildan	Cianjur	350-1,600	15	15	30
Sinyonya	Pandeglang	800-1,500	5	10	15
Jumlah (<i>Total number</i>)			80	70	150

Hasil pengamatan secara morfologis ini relatif sesuai dengan karakteristik jenis-jenis ikan mas yang dilaporkan antara lain oleh Gustiano (1999) dan Imron *et al.* (2000). Secara lebih spesifik, berdasarkan perbedaan dan kemiripan bentuk morfologisnya, Imron *et al.* (2000) mengelompokkan ikan mas dalam dua kelompok, yaitu strain Rajadanu dan Sutisna dalam satu kelompok sedangkan strain Majalaya dan Wildan dalam kelompok yang lain. Adanya perbedaan antara strain ini dapat disebabkan oleh beberapa alasan antara lain: 1) asal-usul atau sumber genetik yang dikembangkan pada daerah tersebut berbeda dengan sumber genetik yang dikembangkan di daerah lainnya, 2) lingkungan pemeliharaan yang berbeda antar daerah pengembangan masing-masing strain, 3) sistem budidaya yang meliputi media pemeliharaan, wadah pemeliharaan, dan pakan juga berkontribusi tinggi dalam membentuk karakter-karakter suatu strain. Sedangkan kemiripan yang terjadi antar strain dapat disebabkan oleh dugaan asal-usul sumber genetik yang sama tetapi dikembangkan di daerah yang berbeda. Selain itu, intensitas pertukaran atau distribusi induk dan benih yang tinggi antar lokasi yang berbeda juga mengakibatkan terjadinya intrograsi genetik antar populasi atau strain.

Karakterisasi Genotipik Plasma Nutfah

Dari 61 jenis primer yang diuji, 33 primer berhasil mengamplifikasi DNA ikan mas hasil koleksi. Hasil *screening* primer menunjukkan bahwa 24 primer monomorfik dan sembilan primer lainnya polimorfik. Sembilan primer po-

limorfik hasil *screening* tersebut disajikan pada Tabel 2.

Hasil PCR dari sembilan primer yang digunakan, hanya enam primer yang dapat mengamplifikasi sampel secara konsisten dan dapat dianalisis menggunakan *software* TFGA. Hasil analisis derajat polimorfisme dan heterozigositas pada masing-masing strain per primer maupun secara keseluruhan berdasarkan amplifikasi keenam primer tersebut disajikan pada Tabel 3. Pada Tabel 3 terlihat bahwa populasi ikan mas pada penelitian ini mempunyai derajat polimorfisme dan heterozigositas relatif tinggi. Derajat polimorfisme antar populasi tertinggi adalah menggunakan primer OPZ-2 dan OPB-10 (100%) dan terendah pada OPG-5 (82,35%). Nilai heterozigositas antar strain tertinggi pada penggunaan primer OPB-10 (0,3731) dan terendah pada OPZ-5 (0,2523). Berdasarkan analisis ini maka primer OPB-10 merupakan primer yang paling polimorfik dibanding enam primer lainnya. Derajat polimorfisme tertinggi antar strain ikan mas terdapat pada strain Wildan dan Rajadanu sedangkan tingkat heterozigositas tertinggi terdapat pada strain Wildan dan Sinyonya. Hasil analisis ini mengindikasikan bahwa strain Wildan mempunyai keragaman genetik tertinggi dibanding strain lainnya.

Nilai polimorfisme pada lima strain ikan mas dengan menggunakan enam primer menghasilkan kisaran derajat polimorfisme terendah sebesar 67,71% pada strain Majalaya dan tertinggi sebesar 83,33% pada strain Rajadanu dan Wildan. Kisaran ini menunjukkan bahwa lima strain ikan mas hasil koleksi BPPI memiliki

Tabel 2. Sembilan primer polimorfik yang berhasil mengamplifikasi DNA ikan mas

Table 2. Nine polymorphic primers which amplified common carp DNA

Kode primer Primer code	Urutan basa Base pairs (5'-3')	Panjang nukleotida Nucleotid length	G+C (%)	Suhu didih Melting temperature
OPA-10	TGG ATC GCA G	10-mer	60	39.5
OPA-18	AGG TGA CCG T	10-mer	60	39.5
OPB-10	CTG CTG GGA C	10-mer	70	34.0
OPG-5	TCA CGA TGC A	10-mer	50	35.4
OPZ-2	CAT CGC CGC A	10-mer	70	43.6
OPZ-5	GGC TGC GAC A	10-mer	70	43.6
OPZ-9	AGC AGC GCA C	10-mer	70	43.6
OPZ-11	AGA CGA TGG G	10-mer	60	39.5
OPZ-13	GGG TCT CGG T	10-mer	70	43.6

Tabel 3. Jumlah sampel, derajat polimorfisme, dan heterozigositas rata-rata lima strain ikan mas hasil koleksi BPPI

Table 3. Number of sample, degree of polymorfism, and heterozigosity of five strains of common carp in BPPI

Primer Primer	Parameter Parameters	Populasi (<i>Population</i>)					Total/ antar populasi Total/ between population
		Majalaya	Rajadanu	Wildan	Sutisna	Sinyonya	
OPA-18	Jumlah sampel (ekor) Sample number (ind.)	7	9	9	9	7	41
	Jumlah fragmen Fragment number	4-6	5-8	4-8	3-9	3-8	3-9
	Ukuran fragmen Fragment length (bp)	500-2,500	450-3,000	500-2,500	450-3,000	450-2,500	450-3,000
	Jumlah lokus Locus number	13	15	13	15	15	16
	Polimorfisme Polymorphism (%)	75	75	81.25	93.75	87.5	93.75
	Heterozigositas Heterozigosity	0.2462	0.2607	0.2925	0.2978	0.2645	0.2919
OPB-10	Jumlah sampel (ekor) Sample number (ind.)	7	9	9	9	7	41
	Jumlah fragmen Fragment number	1-10	2-9	5-9	4-9	5-13	1-13
	Ukuran fragmen Fragment length (bp)	350-3,000	350-3,000	350-3,000	350-3,000	350-3,000	350-3,000
	Jumlah lokus Locus number	15	14	15	15	14	15
	Polimorfisme Polymorphism (%)	100	93.33	93.33	100	93.33	100
	Heterozigositas Heterozigosity	0.3414	0.3229	0.3627	0.4005	0.4023	0.3731
OPG-5	Jumlah sampel (ekor) Sample number (ind.)	7	9	9	9	7	41
	Jumlah fragmen Fragment number	4-9	4-9	4-8	1-8	3-12	1-12
	Ukuran fragmen Fragment length (bp)	300-1,700	300-2,000	300-1,700	300-2,000	300-2,000	450-2,000
	Jumlah lokus Locus number	13	15	13	14	16	17
	Polimorfisme Polymorphism (%)	70.58	82.35	70.58	82.35	88.23	82.35
	Heterozigositas Heterozigosity	0.2579	0.3114	0.2435	0.2826	0.3275	0.3002

Lanjutan Tabel 3 (Table 3 continued)

Primer Primer	Parameter Parameters	Populasi (<i>Population</i>)					Total/ antar populasi Total/ between population
		Majalaya	Rajadanu	Wildan	Sutisna	Sinyonya	
OPZ-2	Jumlah sampel (ekor) <i>Sample number (ind.)</i>	7	9	9	9	7	41
	Jumlah fragmen <i>Fragment number</i>	3-7	1-7	2-7	1-7	2-6	1-7
	Ukuran fragmen <i>Fragment length (bp)</i>	600-2,500	550-2,800	550-2,500	550-2,800	600-2,500	550-2,800
	Jumlah lokus <i>Locus number</i>	11	14	12	13	10	15
	Polimorfisme <i>Polymorphism (%)</i>	66.66	93.33	80	86.66	60	100
	Heterozigositas <i>Heterozygosity</i>	0.2252	0.3022	0.2857	0.3029	0.2149	0.2798
	Jumlah sampel (ekor) <i>Sample number (ind.)</i>	7	9	9	9	7	41
Jumlah fragmen <i>Fragment number</i>	2-5	1-7	3-7	3-8	1-9	1-9	
Ukuran fragmen <i>Fragment length (bp)</i>	450-1,500	400-2,000	400-2,200	400-1,700	400-2,000	400-2,200	
Jumlah lokus <i>Locus number</i>	10	13	14	10	13	15	
Polimorfisme <i>Polymorphism (%)</i>	66.66	86.66	93.33	53.33	86.66	86.66	
Heterozigositas <i>Heterozygosity</i>	0.2071	0.2343	0.2983	0.1719	0.2998	0.2523	
OPZ-13	Jumlah sampel (ekor) <i>Sample number (ind.)</i>	7	9	9	9	7	41
	Jumlah fragmen <i>Fragment number</i>	8-11	7-13	3-11	4-11	7-12	3-13
	Ukuran fragmen <i>Fragment length (bp)</i>	300-2,000	300-2,000	300-2,000	300-2,000	300-2,000	300-2,000
	Jumlah lokus <i>Locus number</i>	12	16	16	14	14	18
	Polimorfisme <i>Polymorphism (%)</i>	33.33	61.11	83.33	61.11	61.11	88.88
	Heterozigositas <i>Heterozygosity</i>	0.1359	0.2301	0.3047	0.2188	0.2862	0.2947
	Jumlah sampel (ekor) <i>Sample number (ind.)</i>	7	9	9	9	7	41
Polimorfisme (%) (keseluruhan) <i>Polymorphism (%) (overall)</i>	67.71	83.33	83.33	79.17	79.17	90.63	
Heterozigositas (keseluruhan) <i>Heterozygosity (overall)</i>	0.233	0.274	0.297	0.278	0.299	0.301	

keragaman genetik yang tinggi. Muharam *et al.* (2012) melaporkan hasil analisis derajat polimorfisme ikan mas Majalaya menggunakan primer OPA 2 dan OPA 3 sebesar 65%. Nilai keragaman genetik ikan mas Majalaya tersebut relatif sama dengan derajat polimorfisme ikan mas Majalaya yang diperoleh dengan menggunakan 6 primer dalam penelitian ini, yaitu sebesar 67,71%.

Hasil analisis jarak genetik berdasarkan data pada Tabel 3 menunjukkan bahwa kelima strain ikan mas mempunyai jarak genetik bervariasi antara 0,1702-0,2982. Jarak genetik terdekat antara strain Rajadanu dengan Majalaya dan jarak genetik terjauh antara strain Majalaya dengan Sutisna. Nilai jarak genetik pada lima strain ikan mas pada penelitian ini disajikan pada Tabel 4.

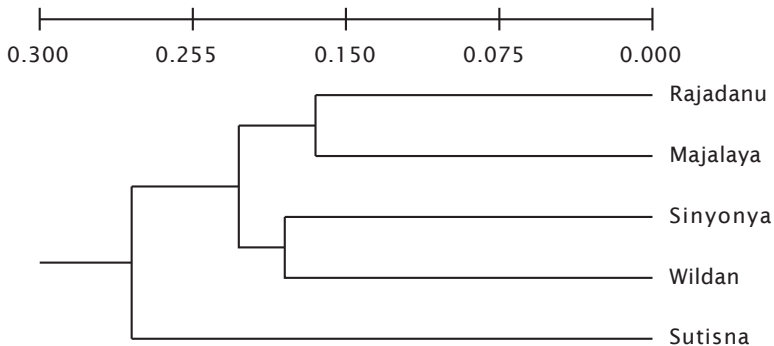
Berdasarkan nilai jarak genetik, strain dengan struktur genetik yang lebih dekat akan dikelompokkan dalam satu kluster bentuk dendrogram (Gambar 1). Dari dendrogram tersebut terlihat bahwa populasi ikan mas terbagi menjadi tiga kelompok genotipe, yaitu satu kelompok terdiri atas strain Rajadanu

dengan Majalaya, kelompok 2 terdiri atas strain Sinyonya dan Wildan sedangkan strain Sutisna secara sendiri terpisah dari dua kelompok tersebut.

Secara umum variasi genetik ikan mas dalam penelitian ini yang diindikasikan dengan derajat polimorfisme dan heterozigositas rata-rata relatif tinggi. Tingginya nilai variasi genetik pada ikan budidaya baik budidaya air tawar, air payau maupun air laut jarang ditemui. Secara umum, variasi genetik populasi ikan budidaya relatif rendah karena terjadinya reduksi pada variabilitas genetiknya. Beberapa faktor dapat menjadi penyebab terjadinya reduksi pada variabilitas genetik ikan budidaya antara lain karena aktivitas seleksi induk, terjadinya silang dalam (*inbreeding*) dan *random genetic drift* atau *bottleneck effect* (Imron *et al.*, 1999). Beberapa contoh penelitian mengenai hal tersebut telah dilaporkan antara lain pada ikan nila (*O. niloticus*) (Eknath *et al.*, 1991), ikan gurame (*O. gouramy*) (Soewardi, 1995) pada air tawar, udang windu (*Penaeus monodon*) (Imron *et al.*, 1999) pada air payau dan ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*)

Tabel 4. Jarak genetik antar lima strain ikan mas
Table 4. Genetic distance among all strains of common carp

	Sutisna	Sinyonya	Wildan	Rajadanu	Majalaya
Sutisna	*****				
Sinyonya	0.2583	*****			
Wildan	0.2269	0.1833	*****		
Rajadanu	0.2359	0.2129	0.1892	*****	
Majalaya	0.2982	0.2127	0.2057	0.1702	*****



Gambar 1. Dendrogram hubungan kekerabatan antar strain ikan mas
Figure 1. Dendrogram of genetic similarity among strains of common carp

(Permana *et al.*, 2001) pada air laut. Tingginya variasi genetik populasi ikan mas pada penelitian ini kemungkinan karena terjadinya introgressi genetik antar populasi dalam masing-masing strain. Selain itu, adanya wabah penyakit KHV sejak tahun 2002 diduga menyebabkan usaha pembenihan ikan mas mengalami penurunan dalam jumlah produksi. Penurunan jumlah produksi tersebut berdampak terhadap rendahnya intensitas penggunaan induk sehingga variasi genetik induk relatif lebih terjaga.

Berdasarkan analisis kluster, kelima strain ikan mas hasil koleksi ini dikelompokkan menjadi tiga genotipe, yaitu genotipe A terdiri atas strain Rajadanu dan Majalaya, genotipe B terdiri atas strain Sinyonya dan Wildan, serta genotipe C yang terdiri atas strain Sutisna. Hasil analisis kluster ini berbeda dengan hasil analisis yang dilakukan oleh Imron *et al.* (2000) maupun Ariyanto *et al.* (2003). Namun demikian, perbedaan ini diduga lebih banyak disebabkan oleh metode yang digunakan dalam kegiatan analisis. Analisis yang dilakukan oleh Imron *et al.* (2000) menggunakan metode *truss* morfometrik. Analisis pada tingkat morfologi ini diduga dipengaruhi oleh kondisi lingkungan sehingga keragaman yang terjadi antar strain belum menggambarkan kondisi genotipe dari masing-masing strain. Ariyanto *et al.* (2003) melakukan analisis menggunakan metode elektroforesis pada tingkat enzim/protein (*isozyme*). Analisis ini lebih menggambarkan kondisi internal masing-masing strain dibandingkan dengan analisis secara morfologi. Namun demikian, analisis enzim/protein juga belum dapat menggambarkan kondisi genetik masing-masing strain tersebut. Hal ini karena enzim/protein merupakan hasil translasi dari mRNA yang merupakan salah satu produk dari transkripsi DNA (genotipe). Analisis RAPD pada percobaan ini dilakukan pada tingkat asam nukleat (DNA). Hasil analisis yang diperoleh dalam penelitian ini diharapkan dapat memberikan gambaran lebih baik tentang keragaman, jarak genetik dan pengelompokan genotipe-genotipe plasma nutfah ikan mas yang ada di masyarakat.

Evaluasi Daya Tahan Terhadap KHV

Benih uji hasil pemijahan

Jumlah larva yang dihasilkan dari pemijahan pada masing-masing strain bervariasi antara 50.000-150.000 ekor. Setelah melalui fase pendederan yang dilakukan di kolam ta-

nah selama dua bulan, benih mencapai ukuran 7-9 cm dengan bobot rata-rata 10 g/ekor. Dalam rangka ujiantang, 500 ekor benih diambil dari setiap strain sebagai benih uji yang mewakili masing-masing strain ikan mas.

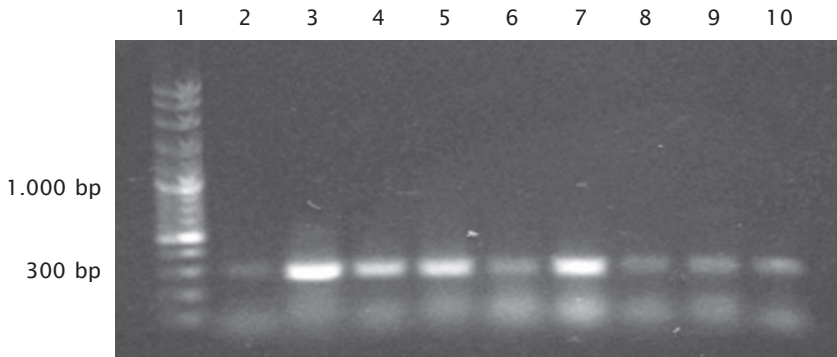
Benih ikan terinfeksi KHV

Jumlah ikan yang diinfeksi KHV melalui suntikan *intramuscular* sebanyak 50 ekor. Dari hasil pengamatan, ikan yang diinfeksi virus KHV menunjukkan gejala terserang penyakit antara 3-5 hari setelah penyuntikan. Hasil analisis laboratorium menggunakan metode PCR menunjukkan sebagian besar ikan yang diinfeksi virus menunjukkan gejala positif terserang KHV (Gambar 2). Gejala klinis yang tampak pada ikan yang terserang KHV adalah sisik yang mulai lepas, berenang cepat dan tidak terkontrol, produksi lendir yang berlebihan, ikan sulit bernafas, gerakan tidak terarah dan mengambang kemudian mati. Selanjutnya ikan sumber KHV yang masih hidup digunakan untuk ujiantang menggunakan metode kohabitasi.

Ujiantang

Hasil pengamatan selama 14 hari masa ujiantang yang menggambarkan pola kematian benih ikan mas pada masing-masing strain disajikan pada Gambar 3. Berdasarkan Gambar 3 terlihat bahwa metode kohabitasi antara benih sumber infeksi KHV dengan benih uji cukup efektif menularkan penyakit. Kematian mulai terjadi pada hari ke-6 dan mencapai puncaknya pada hari ke-7 dan 8. Pada hari ke-9 jumlah kematian ikan mulai menurun dan stabil pada hari ke-11 hingga 14. Hasil verifikasi penyebab kematian benih ikan uji selama ujiantang menggunakan analisis PCR disajikan pada Gambar 4. Gambar 4 memperlihatkan bahwa semua strain ikan mas yang diujiantang dan mengalami gejala klinis KHV secara nyata terinfeksi KHV hingga mengakibatkan kematian. Sampai akhir percobaan, tingkat kematian akibat infeksi KHV berkisar antara 60%-80%. Pola kematian ini relatif sama dengan hasil ujiantang yang dilakukan oleh Gardenia *et al.* (2005). Dari kelima strain yang diuji terlihat bahwa strain Rajadanu mempunyai tingkat sintasan yang paling baik diikuti oleh strain Majalaya, Sutisna, Sinyonya, dan Wildan.

Puncak kematian benih uji pada percobaan ujiantang dengan metode kohabitasi terjadi pada hari ke-6-9. Tingkat kematian relatif

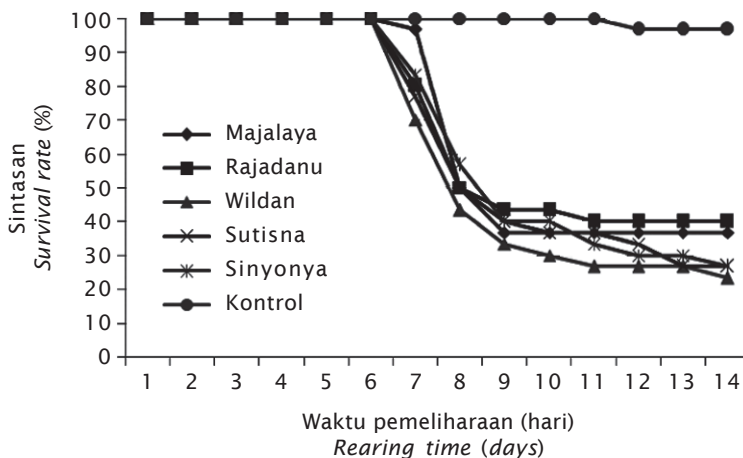


Keterangan (Note):

1 = Marker; 2 = Kontrol negatif (Negative control); 3 = Kontrol positif (Positive control); 3-10 = Sampel ikan sumber infeksi KHV (Sample of KHV infected fish)

Gambar 2. Hasil analisis PCR terhadap ikan terinfeksi KHV melalui penyuntikan filtrate homogenate KHV

Figure 2. PCR analysis result of KHV infected fish which injected by filtrate homogenate of KHV



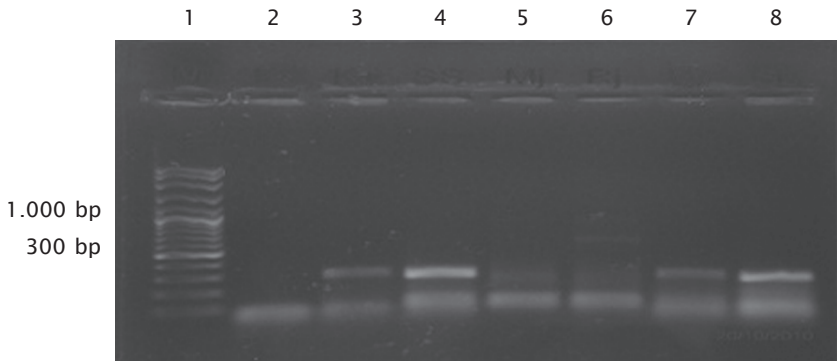
Gambar 3. Pola kematian benih ikan mas pada masing-masing strain selama 14 hari masa ujiantang dengan KHV

Figure 3. The pattern of mortality of each population of fish during the KHV challenge test for 14 days

bervariasi antara 60%-80%. Hasil uji tantang ini sesuai dengan beberapa hasil penelitian sebelumnya seperti yang dilakukan oleh Gardenia *et al.* (2005) dan Rakus *et al.* (2009) yang menerangkan bahwa serangan KHV mencapai puncaknya antara hari ke-6 atau 8 sampai hari ke-12 dengan tingkat kematian kumulatif rata-rata 79,9%.

Meskipun periode puncak serangan KHV terhadap kelima strain ikan mas relatif sama

tetapi akumulasi kematian yang terjadi pada masing-masing strain relatif berbeda. Perbedaan ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor antara lain faktor internal maupun eksternal. Faktor internal meliputi faktor genetis maupun fisiologis. Secara genetis, struktur gen suatu populasi berbeda dengan populasi lainnya. Daya tahan ikan mas terhadap penyakit diduga dipengaruhi oleh keberadaan gen *major histo-compatibility complex* (MHC). Gen



Keterangan (Note):

1 = Marker; 2 = Kontrol negatif (Negative control); 3 = Kontrol positif (Positive control); 4 = Sinyonya; 5 = Majalaya; 6 = Rajadanu; 7 = Wildan; dan 8 = Sutisna

Gambar 4. Hasil analisis PCR pada ikan uji yang menunjukkan gejala klinis terinfeksi KHV

Figure 4. PCR analysis result of fish which showed clinical KHV infection

ini diduga berkorelasi positif dengan daya tahan terhadap penyakit (Rakus *et al.*, 2009). Hasil penelusuran yang dilakukan di BBPBAT Sukabumi menunjukkan bahwa strain Majalaya mempunyai tingkat keberadaan MHC lebih tinggi dibanding strain lainnya. Hasil uji tantangan yang dilakukan juga menunjukkan bahwa strain Majalaya mempunyai daya tahan terhadap KHV relatif lebih baik dibanding strain lainnya (Anonim, 2010). Hasil penelitian menunjukkan bahwa strain Rajadanu mempunyai daya tahan terhadap KHV relatif lebih baik mengindikasikan bahwa koleksi ikan mas yang dilakukan di BPPI Sukamandi relatif berbeda dengan di BBPBAT Sukabumi. Untuk memverifikasi hal ini, perlu dilakukan analisis molekuler menggunakan marka gen MHC pada populasi-populasi hasil koleksi BPPI Sukamandi.

Secara fisiologis, perbedaan daya tahan masing-masing strain dipengaruhi oleh kemampuan suatu strain dalam merespons perubahan-perubahan yang terjadi di sekitarnya. Kemampuan tersebut dapat disebabkan oleh pengaruh internal maupun eksternal (lingkungan). Beberapa faktor lingkungan yang berpengaruh terhadap kemampuan suatu populasi dalam merespons perubahan yang terjadi di sekitarnya antara lain jenis pakan, teknologi budidaya maupun kondisi lingkungan. Benih uji yang dipakai dalam penelitian ini berasal dari beberapa daerah yang berbeda dengan spesifikasi kondisi geografis yang berbeda. Selain itu, jenis pakan dan teknologi budidaya yang diterapkan juga ber-

beda. Hal-hal tersebut secara langsung maupun tidak akan memengaruhi kemampuan fisiologis ikan yang berpengaruh terhadap kemampuan merespons perubahan lingkungan yang terjadi.

KESIMPULAN

Telah diperoleh lima strain plasma nutfah ikan mas hasil koleksi dari sentra budidaya yang terpisah secara geografi di Jawa Barat, yakni Majalaya, Rajadanu, Sutisna, Wildan, dan Sinyonya. Kelima strain tersebut terbagi dalam tiga kelompok genotipe, yaitu genotipe A terdiri atas strain Rajadanu dan Majalaya, genotipe B terdiri atas strain Sinyonya dan Wildan, serta genotipe C terdiri atas strain Sutisna. Ikan mas strain Rajadanu mempunyai daya tahan terhadap infeksi KHV lebih baik dibandingkan strain lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Anggaran Penerimaan dan Belanja Negara melalui DIPA tahun 2010 pada Balai Penelitian Pemuliaan Ikan, Sukamandi. Terima kasih disampaikan kepada semua peneliti dan teknisi yang terlibat dalam kegiatan ini. Secara khusus, terima kasih disampaikan kepada Dr. Atmadja Hardjamulia atas segala saran dan masukannya dalam pelaksanaan kegiatan riset ini. Terima kasih juga disampaikan kepada Mitra Bestari dan Dewan Redaksi atas segala koreksi, kritik dan saran dalam rangka perbaikan makalah ini.

DAFTAR ACUAN

- Anonim. 2010. Laporan perkembangan kegiatan pemuliaan ikan mas di Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Tawar (BBPBAT). Jejaring Pemuliaan Ikan Mas Nasional. Sukabumi, 10-12 November 2010.
- Ariyanto, D., Nugroho, E., & Subagyo. 2003. Karakterisasi biokimia enzimatis empat populasi ikan mas menggunakan metode elektroforesis. *J. Pen. Perik. Indonesia*, 9(4): 1-6.
- Ditjenkan. 1999. Statistik Perikanan Indonesia 1997. Direktorat Jenderal Perikanan, Departemen Pertanian. Jakarta.
- Eknath, A.E., Macaranas, J.M., Agustin, L.Q., Velasco, R.R., Ablan, M.C.A., Pante, M.J.R., & Pullin, R.S.V. 1991. Biochemical and morphometric approaches to characterize farmed tilapias. *ICLARM Quarterly Report*. Manila, 14(2): 7-9.
- Falconer, D.S. & Mackay, T.F.C. 1996. Introduction to quantitative genetics. 4th Ed. Longman, England, 464 pp.
- Fjalestad, K.T., Gjedrem, T., & Gjerde, B. 1993. Genetic improvement of disease resistance in fish: an overview. *Aquaculture*, 111: 65-74.
- Gardenia, L., Sunarto, A., Taukhid, Koesharyani, I., & Novita, H. 2005. Potensi imunogenik dan prospek vaksinasi bagi upaya pencegahan penyakit koi herpes virus pada ikan mas. *Dalam* Supriyadi, H. & Priono, B. (Eds.), Strategi Pengelolaan dan Pengendalian Penyakit KHV. Pusat Riset Perikanan Budidaya, Jakarta, hlm. 73-81.
- Gustiano, R. 1999. Genetic color polymorphisms on common carp stocks in Indonesia. *Indonesian Fish. Res. J.*, V(1): 23-31.
- Hardjosubroto, W. 1994. Aplikasi Pemuliabiakan Ternak di Lapangan. PT Grasindo Indonesia. Jakarta, 284 hlm.
- Imron, Sugama, K., Sumantadinata, K., & Soewardi, K. 1999. Genetic variation in cultured stocks of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Indonesia. *Indonesian Fish. Res. J.*, V(1): 10-18
- Imron, Subagyo, & Arifin, O.Z. 2000. Keragaman truss morfometrik ikan mas strain rajadanu, wildan Cianjur, sutisna Kuningan, dan Majalaya. *Prosiding Penelitian Perikanan tahun 1999*. Puslitbang Eksplorasi Laut dan Perikanan. hlm. 188-197.
- Kirpichnikov, V.S., Ilyasov, J.I., Shart, L.A., Vikhman, A.A., Ganchenko, M.V., Ostashevsky, A.L., Simonov, V.M., Tikhonov, G.F., & Tjurin, V.V. 1993. Selection of Krasnodar common carp (*Cyprinus carpio* L) for resistance to dropsy: principal, results and prospects. *Aquaculture*, 111: 7-20.
- Miller, M.P. 1997. Tools for Population Genetic Analysis (TPFGA) Version 1.3. Department of Biological Science. Northern Arizona University, Arizona. USA, 30 pp.
- Muharam, E.G., Buwono, I.D., & Mulyani, Y. 2012. Analisis kekerabatan ikan mas koi (*Cyprinus carpio koi*) dan ikan mas Majalaya (*Cyprinus carpio carpio*) menggunakan metode RAPD. *J. Perikanan dan Kelautan*, 3(3): 15-23.
- Permana, I.G.N., Sembiring, S.B.M., Haryanti, & Sugama, K. 2001. Pengaruh domestikasi terhadap variasi genetik pada ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) yang didekteksi dengan *allozyme electrophoresis*. *J. Pen. Perik. Indonesia*, 7(1): 25-30.
- Poernomo, A. 2000. Hasil utama penelitian perikanan tahun anggaran 1999/2000. *Warta Penelitian Perikanan Indonesia*, 6(3-4): 30-33.
- Rakus, K.L., Wiegertjes, G.F., Adamek, M., Siwicki, A.K., Lepa, A., & Irmazarowa, I. 2009. Resistance of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to Cyprinid herpesvirus-3 is influenced by major histocompatibility (MH) class II B gene polymorphism. *Fish & Shellfish Immun.*, 26: 737-743.
- Rukmono, D. 2005. Kebijakan pengelolaan kesehatan ikan direktorat kesehatan ikan dan lingkungan. *Dalam* Supriyadi, H. & Priono, B. (Eds.), Strategi pengelolaan dan pengendalian penyakit KHV. Pusat Riset Perikanan Budidaya. Jakarta, hlm. 1-6.
- Soewardi, K. 1995. Karakterisasi populasi ikan gurame (*Osphronemus gouramy*, Lacepede), dengan metode biokimia. *J. Ilmu-Ilmu Perairan dan Perikanan Indonesia*, III(2): 33-39.
- Taukhid, Sunarto, A., Koesharyani, I., Supriyadi, H., & Gardenia, L. 2005. Strategi pengendalian penyakit koi herpes virus (KHV) pada ikan mas dan koi. *Dalam* Supriyadi, H. & Priono, B. (Eds.), Strategi pengelolaan dan pengendalian penyakit KHV. Pusat Riset Perikanan Budidaya. Jakarta, hlm. 41-60.
- Tave, D. 1993. Genetic for fish hatchery managers. 2nd ed. AVI. Publishing Company. Inc. Connecticut, 418 pp.
- Tave, D. 1996. Selective breeding programmes for medium-sized fish farm. *FAO Technical Papers*. Rome, 122 pp.

Warwick, J.W., Astuti, M., & Hardjasubroto, W.
1995. Pemuliabiakan Ternak. Gajah Mada
University Pers. Yogyakarta, 485 hlm.