

## **Analisis Filogenetik Gen *Thymidin Kinase* Koi Herpesvirus (KHV) Beberapa Ikan Air Tawar pada Sentra Budidaya di Jawa Timur**

### **Phylogenetic Analysis of Thymidin Kinase Gene Koi HerpesVirus (KHV) in Some Freshwater Fish Aquaculture Centers in East Java**

**Budi Rianto Wahidi**

Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Surabaya II  
Email : wachidi\_vespa@yahoo.com

#### **Abstract**

*Koi Herpesvirus* ( KHV ) is a virus that infects goldfish and koi that resulted in mass death and cause economic and social losses. The use of Polymerase Chain Reaction (PCR) technique to detect KHV was done in nila and gurame. Proof that KHV could infect nila and gurame KHV following genetic variation in each definitive host and spreading area have not been done. Based on these problems, this research was conducted to study the genetic variability and genetic relationships between KHV isolates in some freshwater fish as the definitive host koi, komet , koki, nila and gurame that exist in the area of East Java. The results showed that clinically the gills were pale and hemorrhage the end of the tail fin. Electrophoresis results showed that all samples from KHV infected koi, koki, komet, nila and gurame were all positive but the sequencing results for tilapia and carp could not be further identified using the BLAST program. Genetically, koi fish, koki and komet isolates were identical to GenBank isolates code KHV-GZ11 and Indo\_0K02SS.

**Key Words** : Koi Herpesvirus, Fresh Water Fish, Thymidin Kinase Gene, Phylogenetic, East Java.

#### **Abstrak**

*Koi Herpesvirus* (KHV) adalah virus yang menginfeksi ikan mas dan koi yang mengakibatkan kematian massal dan menimbulkan kerugian secara ekonomi dan sosial. Penggunaan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk deteksi KHV pernah dikerjakan pada nila dan gurame. Pembuktian bahwa KHV dapat menginfeksi nila dan gurame berikut variasi genetik KHV pada tiap-tiap inang definitifnya dan wilayah persebarannya belum pernah dilakukan. Berdasarkan permasalahan tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mempelajari variabilitas genetik dan kekerabatan isolat KHV pada beberapa ikan air tawar sebagai inang definitif yaitu koi, komet, koki, nila dan gurame yang ada di wilayah Jawa Timur. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gejala klinis yang tampak adalah insang memucat dan terjadi pendarahan pada ujung sirip ekor. Hasil elektroforesis, untuk ikan koi, koki, komet, nila dan gurame yang terinfeksi KHV semuanya positif namun hasil sekuensing menunjukkan bahwa untuk ikan nila dan gurame tidak dapat diidentifikasi lebih lanjut menggunakan program BLAST. Secara genetik, isolat yang berasal dari ikan koi, koki dan komet identik dengan isolat GenBank kode KHV-GZ11 dan Indo\_0K02SS.

**Kata Kunci** : Koi Herpesvirus, Ikan Air Tawar, Gen *Thymidin Kinase*, Filogenetik, Jawa Timur.

## Pendahuluan

*Koi Herpesvirus* (KHV) adalah virus yang menginfeksi ikan mas dan koi dan berhubungan dengan kematian massal (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). KHV masuk ke Indonesia pada tahun 2002 melalui perdagangan ikan lintas negara (Sunarto *et al.*, 2005).

KHV telah menyebar ke hampir semua daerah di Indonesia sejak terjangkit pertama kali di Blitar, Jawa Timur. Virus ini mengakibatkan kematian massal, yaitu kematian mencapai 80–95 % populasi sehingga berdampak pada kerugian ekonomi dan sosial. Kerugian secara materi akibat penyakit ini mencapai 15 milyar rupiah dalam tiga bulan pertama sejak kejadian penyakit ditemukan, yaitu bulan Maret sampai September 2002 (Sunarto, 2004).

Tahun 2010 KHV telah tersebar di 17 provinsi di Indonesia (Pusat Karantina Ikan, 2010). Sesuai dengan Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia No. Kep.26/MEN/2013 tentang Penetapan Jenis-jenis Hama dan Penyakit Ikan Karantina, Golongan, Media Pembawa, dan Sebarannya, KHV termasuk HPIK golongan I dengan inang definitif Cyprinidae, Nila (*Oreochromis niloticus*), Gurame (*Osphronemus gourame*), koki, komet (*Carassius auratus*), maka tidak menutup kemungkinan beberapa ikan inang diatas juga bisa sebagai pembawa *herpesvirus*.

Hasil pemantauan hama dan penyakit ikan karantina (HPIK) yang dilakukan Unit Pelaksana Teknis (UPT) karantina ikan di Indonesia 3 tahun

terakhir menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) selalu ditemukan KHV pada ikan nila dan gurami. Namun demikian, hingga saat ini belum ada data dan informasi tentang kemampuan KHV menginfeksi ikan nila dan gurami berikut variasi genetik KHV pada tiap-tiap inang definitif dan wilayah persebarannya. Analisa PCR yang digunakan oleh UPT karantina ikan menggunakan sekuen *thymidin kinase* yang telah diisolasi dan dapat mengamplifikasi fragmen template DNA KHV pada 409 bp tetapi tidak dapat mengamplifikasi fragment template DNA lain (Bercorvier *et al.*, 2005). *Koi Herpesvirus* (KHV) memiliki dan menghasilkan sekurangnya empat gen yang mengkode protein yang sama dengan yang diekspresikan oleh virus pox, yaitu: *thymidylate kinase* (TmkK), *ribonucleotide reductase* (RNR), *thymidine kinase* (TK) dan *B22R-like gene* (Ilouze *et al.*, 2006).

Berkaitan dengan permasalahan tersebut, perlu dilakukan penelitian untuk: 1. Mempelajari variabilitas gen thymidin kinase KHV pada beberapa ikan air tawar (ikan koi, komet, koki, nila dan gurami) di wilayah Indonesia khususnya Jawa Timur dibandingkan dengan data GenBank dan 2. Mempelajari homologi dan hubungan kekerabatan antara gen thymidin kinase KHV yang berasal dari Jawa Timur dengan KHV dari negara lain. Penelitian tentang variasi genetik KHV dan sebaran geografisnya di Indonesia memegang peran penting untuk identifikasi varian virus yang berkembang di Indonesia khususnya Jawa Timur dan patogenesanya. Hal tersebut merupakan petunjuk berharga berkaitan dengan pola transmisi virus, tindakan pencegahan maupun pengendalian penyakit.

## Materi dan Metode

Ikan koi, koki, komet, nila dan gurame digunakan dalam penelitian. Ikan yang diduga terinfeksi KHV dengan gejala klinis tubuh berwarna kemerahan, insang busuk diambil secara acak dari pembudidaya tradisional di Jawa Timur antara lain Kecamatan Ngoro, Kabupaten Jombang; Kecamatan Boyolangu, Kabupaten Tulungagung; Kecamatan Plosoplaten, Ngadiluwih, Keras, Badas Kabupaten Kediri dan Kecamatan Kanigoro, Kabupaten Blitar.

Erlenmeyer, gelas ukur, tabung Eppendorf, timbangan analitik, *shaker*, *microcentrifuge*, *thermal cycler*, *electrophoresis system*, *gel documentation*, *micropipet*, sequencing DNA menggunakan ABI Prism 3130 *Genetic analyzer* – Perkin Elmer.

*Tri Reagent*, Alkohol, 2X *Master Mix*, *ddH<sub>2</sub>O* / *Nuclease Free Water (PCR Grade Water)*, *Agarose gel (2% Gel-O-Shooter)*, kontrol negatif, kontrol positif, *TAE buffer*, *Ethidium bromide*, 6x *Loading dye*, *Marker (Molecular Weight Ladder) 100 bp*. Primer *forward* (F : 5' –GGG TTA CCT GTA CGAG –3) dan *reverse* (R : 5' –CAC CCA GTA GAT TAT GC –3'), alkohol absolut, fenol–TNE *saturated*, *agarose–L* dan *agarose–S*, primer *sense* dan primer *antisense*, EDTA, *distilled water*, *template supression reagent (TSR)*, *big dye® terminator v.1.1 v.3.1 5X sequencing buffer*.

Insang dari ikan yang diduga terinfeksi KHV dipotong kecil-kecil/ digerus halus, dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* steril dan ditambah 1 ml *Tri Reagent*. Jaringan dan larutan *Tri Reagent* dihomogenisasi menggunakan *pellet pastle*, diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit

dilanjutkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm pada suhu ruang selama 5–10 menit. Setelah sentrifugasi, 200 µl bagian supernatan yang jernih diambil dan dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf baru. Ke dalam tabung kemudian ditambahkan 0,5 ml alkohol 100%, dicampur hingga homogen dan disentrifugasi pada 10.000 rpm, pada suhu ruang selama 5 menit. Supernatan kemudian dibuang, *pellet* dicuci dengan cara ditambahkan 1 ml alkohol 70% dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm, pada suhu ruang, selama 5 menit. Pencucian dengan cara tersebut diulang sebanyak 3 kali atau sampai warna pigmen kekuningan hilang. Untuk tahap terakhir, supernatan dibuang, *pellet* DNA dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan dilarutkan dengan *ddH<sub>2</sub>O* atau *Nuclease Free Water* sebanyak 25 µl dan langsung dilanjutkan dengan amplifikasi (Pusat Karantina Ikan, 2008).

Campuran primer dan *template control* diletakkan di atas es, untuk menghilangkan sifat aerosol serta dicampur dengan cara divorteks secara cepat atau disentrifugasi. Setiap kali uji selalu disertakan kontrol negatif dan kontrol positif. (Catatan: *template* kontrol positif adalah positif untuk KHV). Selanjutnya tambahkan 25 µl Promega master mix 2x; 2 µl 10pM , primer forward; 2 µl 10pM primer reverse, 4 µl template DNA dan 17 µl *ddH<sub>2</sub>O* . Semua bahan dicampur dengan vortex. Dilanjutkan dengan proses amplifikasi sebagai berikut: 1. *Denaturasi* awal pada suhu 95°C selama 5 menit (1 siklus), dilanjutkan dengan 30 siklus amplifikasi yang terdiri dari *denaturasi* pada suhu 95°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 50 °C selama 30 detik dan *extension* pada suhu 72 °C selama 30 detik, diakhiri dengan ekstra *elongasi* pada suhu 72 °C selama 7 menit (1 siklus) (Pusat

Karantina Ikan, 2008).

Setelah proses amplifikasi selesai, 10 µl dari setiap sampel diambil (demikian juga dengan *marker*) ditambah 2 µl *staining solution* (6x *loading dye*) dan dicampur dengan baik di atas parafilm. Sepuluh mikroliter dari campuran sampel tersebut dimasukkan ke dalam setiap sumuran pada agarose secara perlahan dan hati-hati. Elektroforesis dilakukan dengan kekuatan listrik 100 V, 400 mA selama 30 – 60 menit. Gel direndam dalam buffer yang telah ditambah 0,05 % *ethidium bromida* (EtBr) selama 15 menit. Gel diletakkan pada *gel documentation* untuk diamati dan didokumentasi (Pusat Karantina Ikan, 2008).

Amplikon yang positif teridentifikasi KHV selanjutnya dipurifikasi DNAny. Amplikon dipotong dan dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 ml, ditambah 1/10 volume buffer natrium asetat untuk menyeimbangkan konsentrasi ion dan ditambah etanol 100% dingin 2 x dari volume sampel; diinkubasi pada suhu -20°C selama ± 1 jam. Sampel kemudian disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan tinggi (13.000 rpm) pada suhu

4°C. Supernatan yang ada dipindahkan ke *microtube* 1 ml; disentrifugasi kembali dengan cara yang sama. Ditambahkan 200 µL etanol 70% dingin; disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan tinggi (13.000 rpm) pada suhu 4°C. Supernatan dibuang dengan *micropipette* 200 µL; sisa etanol diuapkan dalam penangas air (*water bath*) suhu 37°C. Pellet kemudian dilarutkan dengan ddH<sub>2</sub>O atau buffer TE sampai volume yang diinginkan (sama dengan volume sampel awal) (BUSKIPM, 2012).

Konsentrasi DNA dari produk PCR hasil purifikasi diukur menggunakan GeneQuant pada panjang gelombang 260 nm. Tabel 1 memperlihatkan jumlah *template* yang digunakan dalam reaksi *cycle sequencing*. Selanjutnya semua bahan untuk *cycle sequencing* dicampur sampai homogen dalam tabung mikro 0.2 ml. Tabung mikro berisi campuran untuk reaksi *cycle sequencing* dimasukkan ke dalam *thermal cycler* dan diatur volumenya 10 atau 20 µl (tergantung volume akhir reaksi). Pengaturan suhu, waktu dan siklus sesuai dengan Tabel 2. Setelah selesai, hasil disimpan pada 4°C sampai siap untuk dipurifikasi.

Tabel 1. Jumlah *template* yang digunakan dalam reaksi *cycle sequencing*.

Template	Quantity
Produk PCR (PCR Product):	
100 – 200 bp	1 – 3 ng
200 – 500 bp	3 – 10 ng
500 – 1000 bp	5 – 20 ng
1000 – 2000 bp	10 – 40 ng
> 2000 bp	20 – 50 ng
<i>Single-stranded</i>	25 – 50 ng
<i>Double-stranded</i>	150 – 300 ng
<i>Cosmid, BAC</i>	0.5 – 1.0 µg
<i>Bacterial genomic DNA</i>	2 – 3 µg

Tabel 2. Performa *cycle sequencing*

Denaturasi		<i>Rapid Thermal Ramp</i>				<i>Hold</i>			
Suhu	Waktu	Suhu	Waktu	Suhu	Waktu	Suhu	Waktu		
96 °C	1 menit	96 °C	10 detik	50 °C	5 detik	60 °C	4 menit	4 °C	~

Hasil produk *cycle sequencing* ditambahkan EDTA 125 mM pada dasar tabung. Volume EDTA yang ditambahkan tergantung pada volume produk *cycle sequencing* (untuk volume/well atau tabung 10 µl, maka volume EDTA 125 mM/well atau tabung 2,5 µl, dan itu berlaku kelipatan), kemudian ditambahkan etanol 100% dingin, minimal 3X volume produk *cycle sequencing* (untuk volume/well atau tabung 10 µl, maka volume etanol 100% /well atau tabung 30 µl, dan itu berlaku kelipatan). Supaya merata, tabung sampel dibolak balik, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 4.000 rpm selama 30 menit dan supernatan yang dihasilkan dibuang. Kemudian ditambahkan lagi etanol 70% dingin, minimal 3X volume produk *cycle sequencing* (untuk volume/well atau tabung 10 µl, maka volume etanol 100% /well atau tabung 30 µl, dan itu berlaku kelipatan).

Sampel selanjutnya disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 4.000 rpm suhu 4°C. Semua supernatan yang ada dibuang secara hati-hati dengan *micropipette* 200 µL. *Pellet* kemudian dikeringkan dengan menguapkan sisa etanol (dapat digunakan Speed-Vac selama ± 10-15 menit). Tabung sampel hasil purifikasi *cycle sequencing* ditambahkan Hi-Di Formamide kemudian divortex dengan kecepatan 2.000 rpm selama 1 menit. Volume Hi-Di Formamide yang ditambahkan tergantung volume produk *cycle sequencing* (untuk volume produk

*cycle sequencing* 10 µl, maka volume Hi-Di Formamide 10 µl). Sampel kemudian dipanaskan pada suhu 95 °C selama 2 – 5 menit, dan dipindahkan ke dalam es. Pipet 10 – 13 µl ke dalam 96 *well microplate* dan tutup dengan septa, dan harus segera dilakukan CE (tidak dapat disimpan) (BUSKIPM, 2012).

### Hasil dan Pembahasan

Pendekatan filogenetika molekuler merupakan kombinasi teknik molekuler secara statistik untuk rekonstruksi hubungan filogenetik. Sekuen DNA digunakan dalam filogenetik untuk mengetahui perubahan basa nukleotida yang terjadi, sehingga dapat diperkirakan kecepatan evolusi yang terjadi. Analisa filogenetika molekuler merupakan proses bertahap untuk mengolah data sekuen DNA atau protein sehingga diperoleh hasil yang dapat menggambarkan perkiraan mengenai hubungan evolusi suatu organisme (Andalusia, 2011).

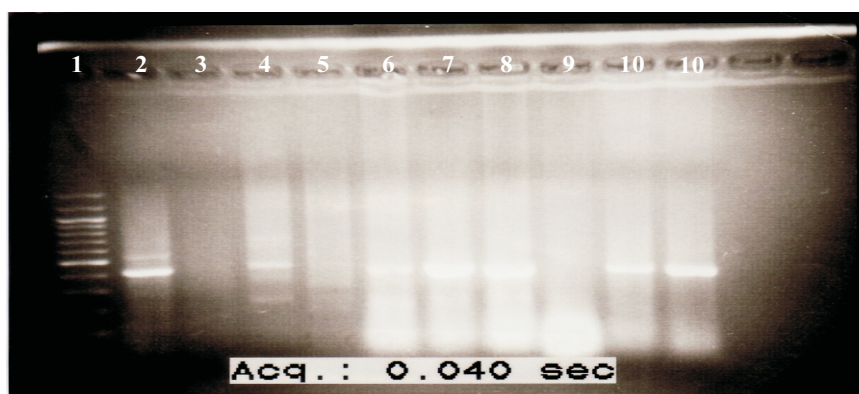
Analisis filogenetik dengan menggunakan program komputer ClustalW2 dan TreeviewX terhadap susunan basa nukleotida KHV utamanya sekuen *thymidin kinase* bertujuan untuk membandingkan hubungan kekerabatan antara sampel dengan isolat pembanding. Kemungkinan adanya mutasi pada KHV yang mendasari sebagian besar penelitian terkait KHV, dimana perubahan susunan basa nukleotida akan berpengaruh terhadap

terjadinya mutasi. Menurut Pusat Karantina Ikan (2008), dilaporkan bahwa KHV tidak hanya spesifik pada jenis ikan *Cyprinidae* namun juga telah menyerang ikan lain misalnya *Tilapia niloticus* dan *Osphronemus gouramy*, hal tersebut dimungkinkan karena virus dapat dengan cepat bermutasi secara genetik dan menyesuaikan diri dengan inang.

Isolat KHV dari GenBank dapat digunakan sebagai acuan atau referensi untuk analisa terkait dengan data *genomic* dari suatu isolat yang ada sehingga dapat diperkirakan kecepatan evolusi yang terjadi dan dapat direkonstruksi hubungan evolusi antara satu organisme dengan yang lain. Gejala klinis yang paling dominan dari ikan yang terserang KHV antara lain insang memucat dan terjadi pendarahan pada ujung sirip ekor. Pada penelitian ini, hanya beberapa ikan yang secara klinis menunjukkan gejala klinis seperti tersebut sebelumnya. Ikan yang menunjukkan gejala klinis diantaranya koi dari Desa Telogo, Kec. Kanigoro, Kab. Blitar; koki dari Desa Canggung, Kec. Badas, Kab. Kediri dan komet dari Desa Rembang, Kec. Ngadiluwih, Kab. Kediri dan Desa Boyolangu, Kec. Boyolangu, Kab. Tulungagung, sedangkan ikan nila

dan gurame tidak menunjukkan gejala klinis. Sampel ikan nila dan gurame yang diperoleh tidak ada yang mencirikan terserang KHV. Beberapa ikan yang terinfeksi KHV bisa saja tidak menunjukkan tanda-tanda yang terlihat dengan kasat mata (Lio, 2009)

Ikan yang menunjukkan gejala klinis selanjutnya satu per satu dilakukan pemeriksaan dengan menggunakan PCR untuk memastikan adanya infeksi KHV, sedangkan untuk ikan yang tidak menunjukkan gejala klinis dilakukan pemeriksaan secara bersamaan per daerah dengan cara semua organ dari ikan tersebut diambil kemudian diekstraksi secara bersamaan. Prosedur dan kondisi pengujian sesuai dengan prosedur pada metode standar pemeriksaan KHV (Pusat Karantina Ikan, 2008). Hasil dari elektroforesis menunjukkan bahwa tidak semua ikan, terutama ikan yang tidak menunjukkan gejala klinis terdapat pita (*band*) yang spesifik dengan KHV atau terhadap kontrol positifnya yaitu di 409 bp. Sedangkan untuk ikan yang menunjukkan gejala klinis KHV diperoleh pita pada 409 bp atau sejajar dengan kontrol positifnya. Gambar hasil elektroforesis disajikan dalam Gambar 1.



Gambar 1. Hasil Elektroforesis terhadap sampel ikan yang diduga terserang KHV. Ket : 1. Marker 100 bp, 2. Kontrol Positif, 3. Kontrol Negatif, 4. Ikan Nila, 5. Ikan Gurame, 6. Ikan Komet, 7. Ikan Koki, 8. Ikan Koi, 9. Kontrol Negatif, 10. Kontrol Positif.

Setelah diperoleh hasil sekuensing dengan menggunakan ABI Prism 3130 Genetyx Analyzer dan dimasukkan dalam program BLAST didapatkan urutan nukleotida yang sama dengan yang ada pada GenBank yaitu untuk kode KHV-GZ11 dan Indo\_0K02SS1 dengan sampel dari Desa Telogo, Kec. Kanigoro, Kab. Blitar; koki dari Desa Cangu,

Kec. Badas, Kab. Kediri dan komet dari Desa Rembang, Kec. Ngadiluwih, Kab. Kediri yang diperoleh dari primer spesifik berdasarkan *Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animal – OIE (2012)*. Hasil BLAST dengan data GenBank dapat dilihat pada Gambar 2, 3 dan 4.

Cyprinid herpesvirus 3 isolate KHV-GZ11 thymidine kinase gene, complete cds  
 Sequence ID: **gb|JQ247183.1|** Length: 1007 Number of Matches: 1  
 Range 1: 367 to 766

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
739 bits(400)	0.0()	400/400(100%)	0/400(0%)	Plus/Plus	
<b>Features:</b>					
Query 1	GGGTTACCTGTACGAGGTGATGCAGCGCTCGGAGGAATACGACGCCGTGGCCGTCGACGA				60
Sbjct 367	GGGTTACCTGTACGAGGTGATGCAGCGCTCGGAGGAATACGACGCCGTGGCCGTCGACGA				426
Query 61	GGGACAGTTCTTCCCGACCTCTACGAGGGAGTTCGTGCAGCTGCTGACCGCGGGCAAGTA				120
Sbjct 427	GGGACAGTTCTTCCCGACCTCTACGAGGGAGTTCGTGCAGCTGCTGACCGCGGGCAAGTA				486
Query 121	CGTGATCGTGGCGGCGCTGGACGGGGACTTTATGCAGCAGCCCTTCAAGCAGGTGACGGC				180
Sbjct 487	CGTGATCGTGGCGGCGCTGGACGGGGACTTTATGCAGCAGCCCTTCAAGCAGGTGACGGC				546
Query 181	GTTGGTGGCCATGGCGGACAAGCTGGACAAGCTGACGGCGGTGTGCATGAAGTGCAAGAT				240
Sbjct 547	GTTGGTGGCCATGGCGGACAAGCTGGACAAGCTGACGGCGGTGTGCATGAAGTGCAAGAT				606
Query 241	GCGCGACGCACCCTTCACCGTCAGAATCTCTCAGGGCACGGACCTGGTCCAGGTTGGAGG				300
Sbjct 607	GCGCGACGCACCCTTCACCGTCAGAATCTCTCAGGGCACGGACCTGGTCCAGGTTGGAGG				666
Query 301	CGCCGAGTCTTACCAGGCGGTGTGTCGTCCCTGTCTCACGGGGTTTCAGGATGGCCCAGTA				360
Sbjct 667	CGCCGAGTCTTACCAGGCGGTGTGTCGTCCCTGTCTCACGGGGTTTCAGGATGGCCCAGTA				726
Query 361	CGAGCTGTACGGTCCGCCGCCTCCTCCTCCTGCGCATAAT	400			
Sbjct 727	CGAGCTGTACGGTCCGCCGCCTCCTCCTCCTGCGCATAAT			766	

Cyprinid herpesvirus 3 isolate Indo\_0K02SS1 thymidine kinase (TK) gene, complete cds  
 Sequence ID: **gb|HM347113.1|** Length: 997 Number of Matches: 1  
 Range 1: 363 to 762

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
739 bits(400)	0.0()	400/400(100%)	0/400(0%)	Plus/Plus	
<b>Features:</b>					
Query 1	GGGTTACCTGTACGAGGTGATGCAGCGCTCGGAGGAATACGACGCCGTGGCCGTCGACGA				60
Sbjct 363	GGGTTACCTGTACGAGGTGATGCAGCGCTCGGAGGAATACGACGCCGTGGCCGTCGACGA				422
Query 61	GGGACAGTTCTTCCCGACCTCTACGAGGGAGTTCGTGCAGCTGCTGACCGCGGGCAAGTA				120
Sbjct 423	GGGACAGTTCTTCCCGACCTCTACGAGGGAGTTCGTGCAGCTGCTGACCGCGGGCAAGTA				482
Query 121	CGTGATCGTGGCGGCGCTGGACGGGGACTTTATGCAGCAGCCCTTCAAGCAGGTGACGGC				180
Sbjct 483	CGTGATCGTGGCGGCGCTGGACGGGGACTTTATGCAGCAGCCCTTCAAGCAGGTGACGGC				542
Query 181	GTTGGTGGCCATGGCGGACAAGCTGGACAAGCTGACGGCGGTGTGCATGAAGTGCAAGAT				240
Sbjct 543	GTTGGTGGCCATGGCGGACAAGCTGGACAAGCTGACGGCGGTGTGCATGAAGTGCAAGAT				602
Query 241	GCGCGACGCACCCTTCACCGTCAGAATCTCTCAGGGCACGGACCTGGTCCAGGTTGGAGG				300
Sbjct 603	GCGCGACGCACCCTTCACCGTCAGAATCTCTCAGGGCACGGACCTGGTCCAGGTTGGAGG				662
Query 301	CGCCGAGTCTTACCAGGCGGTGTGTCGTCCCTGTCTCACGGGGTTTCAGGATGGCCCAGTA				360
Sbjct 663	CGCCGAGTCTTACCAGGCGGTGTGTCGTCCCTGTCTCACGGGGTTTCAGGATGGCCCAGTA				722
Query 361	CGAGCTGTACGGTCCGCCGCCTCCTCCTCCTGCGCATAAT	400			
Sbjct 723	CGAGCTGTACGGTCCGCCGCCTCCTCCTCCTGCGCATAAT			762	

Gambar 2. Hasil BLAST dan *alignment* sampel ikan koi dengan data GenBank

Cyprinid herpesvirus 3 isolate KHV-GZ11 thymidine kinase gene, complete cds  
 Sequence ID: **gb|JQ247183.1|** Length: 1007 Number of Matches: 1  
 Range 1: 367 to 776

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
758 bits(410)	0.0()	410/410(100%)	0/410(0%)	Plus/Plus	
<b>Features:</b>					
Query 1	GGGTTACCTGTACGAGGTGATGCAGCGTCTGGAGGAATACGACGCCGTGGCCGTCGACGA				60
Sbjct 367	GGGTTACCTGTACGAGGTGATGCAGCGTCTGGAGGAATACGACGCCGTGGCCGTCGACGA				426
Query 61	GGGACAGTTCTTCCCGACCTCTACGAGGGAGTCTGTCAGCTGCTGACCGCGGGCAAGTA				120
Sbjct 427	GGGACAGTTCTTCCCGACCTCTACGAGGGAGTCTGTCAGCTGCTGACCGCGGGCAAGTA				486
Query 121	CGTGATCGTGGCGGCGCTGGACGGGGACTTTATGTCAGCAGCCCTTCAAGCAGGTGACGGC				180
Sbjct 487	CGTGATCGTGGCGGCGCTGGACGGGGACTTTATGTCAGCAGCCCTTCAAGCAGGTGACGGC				546
Query 181	GTTGGTGCCCATGGCGGACAAGCTGGACAAGCTGACGGCGGTGTGCATGAAGTGAAGAT				240
Sbjct 547	GTTGGTGCCCATGGCGGACAAGCTGGACAAGCTGACGGCGGTGTGCATGAAGTGAAGAT				606
Query 241	GCGCGACGCACCCCTTACCCGTCAGAATCTCTCAGGGCACGGACCTGGTCCAGGTTGGAGG				300
Sbjct 607	GCGCGACGCACCCCTTACCCGTCAGAATCTCTCAGGGCACGGACCTGGTCCAGGTTGGAGG				666
Query 301	CGCCGAGTCTTACCAGGCGGTGTGTCTCCCTGTCTCACGGGGTTCAGGATGGCCAGTA				360
Sbjct 667	CGCCGAGTCTTACCAGGCGGTGTGTCTCCCTGTCTCACGGGGTTCAGGATGGCCAGTA				726
Query 361	CGAGCTGTACGGTCCGCGCGCCTCCTCCTTCCGCGCATAATCTACTGGGTG	410			
Sbjct 727	CGAGCTGTACGGTCCGCGCGCCTCCTCCTTCCGCGCATAATCTACTGGGTG	776			

Cyprinid herpesvirus 3 isolate Indo\_0K02SS1 thymidine kinase (TK) gene, complete cds  
 Sequence ID: **gb|HM347113.1|** Length: 997 Number of Matches: 1  
 Range 1: 363 to 772

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
758 bits(410)	0.0()	410/410(100%)	0/410(0%)	Plus/Plus	
<b>Features:</b>					
Query 1	GGGTTACCTGTACGAGGTGATGCAGCGTCTGGAGGAATACGACGCCGTGGCCGTCGACGA				60
Sbjct 363	GGGTTACCTGTACGAGGTGATGCAGCGTCTGGAGGAATACGACGCCGTGGCCGTCGACGA				422
Query 61	GGGACAGTTCTTCCCGACCTCTACGAGGGAGTCTGTCAGCTGCTGACCGCGGGCAAGTA				120
Sbjct 423	GGGACAGTTCTTCCCGACCTCTACGAGGGAGTCTGTCAGCTGCTGACCGCGGGCAAGTA				482
Query 121	CGTGATCGTGGCGGCGCTGGACGGGGACTTTATGTCAGCAGCCCTTCAAGCAGGTGACGGC				180
Sbjct 483	CGTGATCGTGGCGGCGCTGGACGGGGACTTTATGTCAGCAGCCCTTCAAGCAGGTGACGGC				542
Query 181	GTTGGTGCCCATGGCGGACAAGCTGGACAAGCTGACGGCGGTGTGCATGAAGTGAAGAT				240
Sbjct 543	GTTGGTGCCCATGGCGGACAAGCTGGACAAGCTGACGGCGGTGTGCATGAAGTGAAGAT				602
Query 241	GCGCGACGCACCCCTTACCCGTCAGAATCTCTCAGGGCACGGACCTGGTCCAGGTTGGAGG				300
Sbjct 603	GCGCGACGCACCCCTTACCCGTCAGAATCTCTCAGGGCACGGACCTGGTCCAGGTTGGAGG				662
Query 301	CGCCGAGTCTTACCAGGCGGTGTGTCTCCCTGTCTCACGGGGTTCAGGATGGCCAGTA				360
Sbjct 663	CGCCGAGTCTTACCAGGCGGTGTGTCTCCCTGTCTCACGGGGTTCAGGATGGCCAGTA				722
Query 361	CGAGCTGTACGGTCCGCGCGCCTCCTCCTTCCGCGCATAATCTACTGGGTG	410			
Sbjct 723	CGAGCTGTACGGTCCGCGCGCCTCCTCCTTCCGCGCATAATCTACTGGGTG	772			

Gambar 3. Hasil BLAST dan *alignment* sampel ikan koki dengan data GenBank

Cyprinid herpesvirus 3 isolate KHV-GZ11 thymidine kinase gene, complete cds  
 Sequence ID: **gb|JQ247183.1|** Length: 1007 Number of Matches: 1  
 Range 1: 367 to 775

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
756 bits(409)	0.0()	409/409(100%)	0/409(0%)	Plus/Plus	
<b>Features:</b>					
Query 1	GGGTTACCTGTACGAGGTGATGCAGCGTCTGGAGGAATACGACGCCGTGGCCGTCGACGA				60
Sbjct 367	GGGTTACCTGTACGAGGTGATGCAGCGTCTGGAGGAATACGACGCCGTGGCCGTCGACGA				426
Query 61	GGGACAGTTCTTCCCGACCTCTACGAGGGAGTCTGTCAGCTGCTGACCGCGGGCAAGTA				120
Sbjct 427	GGGACAGTTCTTCCCGACCTCTACGAGGGAGTCTGTCAGCTGCTGACCGCGGGCAAGTA				486
Query 121	CGTGATCGTGGCGGCGCTGGACGGGGACTTTATGTCAGCAGCCCTTCAAGCAGGTGACGGC				180
Sbjct 487	CGTGATCGTGGCGGCGCTGGACGGGGACTTTATGTCAGCAGCCCTTCAAGCAGGTGACGGC				546
Query 181	GTTGGTGCCCATGGCGGACAAGCTGGACAAGCTGACGGCGGTGTGCATGAAGTGAAGAT				240
Sbjct 547	GTTGGTGCCCATGGCGGACAAGCTGGACAAGCTGACGGCGGTGTGCATGAAGTGAAGAT				606
Query 241	GCGCGACGCACCCCTTACCCGTCAGAATCTCTCAGGGCACGGACCTGGTCCAGGTTGGAGG				300
Sbjct 607	GCGCGACGCACCCCTTACCCGTCAGAATCTCTCAGGGCACGGACCTGGTCCAGGTTGGAGG				666
Query 301	CGCCGAGTCTTACCAGGCGGTGTGTCTCCCTGTCTCACGGGGTTCAGGATGGCCAGTA				360
Sbjct 667	CGCCGAGTCTTACCAGGCGGTGTGTCTCCCTGTCTCACGGGGTTCAGGATGGCCAGTA				726
Query 361	CGAGCTGTACGGTCCGCGCGCCTCCTCCTTCCGCGCATAATCTACTGGGTG	409			
Sbjct 727	CGAGCTGTACGGTCCGCGCGCCTCCTCCTTCCGCGCATAATCTACTGGGTG	775			

Cyprinid herpesvirus 3 isolate Indo\_0K02SS1 thymidine kinase (TK) gene, complete cds  
 Sequence ID: **gb|HM347113.1|** Length: 997 Number of Matches: 1  
 Range 1: 363 to 771

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
756 bits(409)	0.0()	409/409(100%)	0/409(0%)	Plus/Plus	
<b>Features:</b>					
Query 1	GGGTTACCTGTACGAGGTGATGCAGCGTCTGGAGGAATACGACGCCGTGGCCGTCGACGA				60
Sbjct 363	GGGTTACCTGTACGAGGTGATGCAGCGTCTGGAGGAATACGACGCCGTGGCCGTCGACGA				422
Query 61	GGGACAGTTCTTCCCGACCTCTACGAGGGAGTCTGTCAGCTGCTGACCGCGGGCAAGTA				120
Sbjct 423	GGGACAGTTCTTCCCGACCTCTACGAGGGAGTCTGTCAGCTGCTGACCGCGGGCAAGTA				482
Query 121	CGTGATCGTGGCGGCGCTGGACGGGGACTTTATGTCAGCAGCCCTTCAAGCAGGTGACGGC				180
Sbjct 483	CGTGATCGTGGCGGCGCTGGACGGGGACTTTATGTCAGCAGCCCTTCAAGCAGGTGACGGC				542
Query 181	GTTGGTGCCCATGGCGGACAAGCTGGACAAGCTGACGGCGGTGTGCATGAAGTGAAGAT				240
Sbjct 543	GTTGGTGCCCATGGCGGACAAGCTGGACAAGCTGACGGCGGTGTGCATGAAGTGAAGAT				602
Query 241	GCGCGACGCACCCCTTACCCGTCAGAATCTCTCAGGGCACGGACCTGGTCCAGGTTGGAGG				300
Sbjct 603	GCGCGACGCACCCCTTACCCGTCAGAATCTCTCAGGGCACGGACCTGGTCCAGGTTGGAGG				662
Query 301	CGCCGAGTCTTACCAGGCGGTGTGTCTCCCTGTCTCACGGGGTTCAGGATGGCCAGTA				360
Sbjct 663	CGCCGAGTCTTACCAGGCGGTGTGTCTCCCTGTCTCACGGGGTTCAGGATGGCCAGTA				722
Query 361	CGAGCTGTACGGTCCGCGCGCCTCCTCCTTCCGCGCATAATCTACTGGGTG	409			

Gambar 4. Hasil BLAST dan *alignment* sampel ikan komet dengan data GenBank

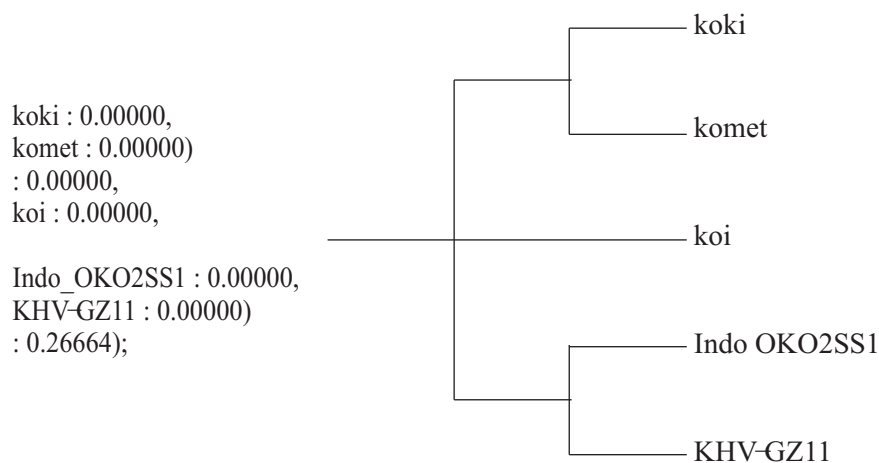
Hasil sekuensing ikan nila dan gurame dari Desa Canggung, Kec. Badas, Kab. Kediri, meskipun dapat terbaca namun tidak dapat dianalisis karena terdapat banyak *gap* pada susunan nukleotidanya. Hal ini kemungkinan disebabkan adanya kontaminan pada amplikon yang memiliki nukleotida hampir sama sehingga dimungkinkan nukleotida dari kontaminan tersebut menempel pada primer dan terbaca pada alat. Maka dari itu meskipun tetap dilakukan BLAST hasil sekuensing amplikon dari ikan nila dan gurame tetap tidak dapat diidentifikasi.

Analisis homologi dan gambaran pohon filogenetik dilakukan pada urutan asam amino KHV menggunakan program ClustalW2. Hasil analisa

homologi terhadap urutan nukleotida, menunjukkan bahwa sampel ikan koi, koki dan komet yang terinfeksi KHV dari Desa Telogo, Kec. Kanigoro, Kab. Blitar; koki dari Desa Canggung, Kec. Badas, Kab. Kediri dan komet dari Desa Rembang, Kec. Ngadiluwih, Kab. Kediri 100 % identik dengan data dari GenBank untuk kode KHV-GZ11 (isolat dari China) dan Indo\_0K02SS1 (Isolat dari Indonesia) tidak tampak adanya perbedaan pasangan basa nukleotida. Hasil analisis homologi dapat dilihat pada Tabel 3. Sedangkan hubungan kekerabatan antara sampel dengan data dari GenBank digambarkan dengan pohon filogenetik pada Gambar 5.

Tabel 3. Analisis homologi urutan nukleotida KHV koi, koki, dan komet terhadap GenBank

	Koi	Koki	Komet
KHV-GZ11	100%	100%	100%
Indo_0K02SS1	100%	100%	100%



Gambar 5. Konstruksi pohon filogenetik isolat KHV Koi, Koki dan Komet dan isolat pembanding dengan metode Neighbour-Joining

Sampel yang diperoleh dari 4 Kabupaten sebagai sentra budidaya ikan koi, koki, komet, nila dan gurame di Jawa Timur tidak semuanya menunjukkan gejala klinis terserang KHV. Namun berdasarkan anamnesa dari pembudidaya dapat diketahui bahwa lokasi-lokasi tersebut pernah terjadi serangan KHV dan hampir sepanjang tahun terjadi serangan KHV. Virus KHV dapat menyebar dalam tubuh inang, meskipun terdapat banyak antibodi dalam cairan tubuh di luar sel. Hal tersebut yang mengakibatkan infeksi virus selama berbulan-bulan bahkan bertahun-tahun pada ikan yang kelihatannya sehat (Malole, 1998).

Perelberg *et al.* (2003) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa secara histologi ikan yang terserang KHV menunjukkan adanya kerusakan jaringan atau lesi pada kulit, insang dan organ dalam. Pada jaringan insang terlihat adanya hiperplasia pada sel-sel epitel lamela sehingga berakibat terjadinya fusi antar lamela yang berdekatan. Begitu juga dengan penelitian yang dilakukan oleh Hendrich *et al.* (2000) menggunakan mikroskop elektron, sel jaringan yang terinfeksi terlihat mengalami pembengkakan sel dengan inti mengalami hipertrofi.

Gejala klinis lainnya berupa pendarahan pada ujung sirip juga terjadi pada sampel koi dari Desa Telogo, Kec. Kanigoro, Kab. Blitar dan komet dari Desa Rembang, Kec. Ngadiluwih, Kab. Kediri. Sirip ekor sampel ikan koki terlihat mengalami geripis dan ditemukan luka pada jaringan kulit, yang secara keseluruhan merupakan ciri akibat infeksi KHV. Namun tidak demikian dengan ikan nila dan gurame, dari keseluruhan sampel tidak ada satupun yang mencirikan ikan tersebut terserang KHV. Sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Perelberg *et*

*al.* (2003) yang meneliti tentang kerentanan ikan terhadap infeksi KHV dan cara transmisinya, ditemukan bahwa untuk ikan *Cyprinus carpio*, *Oreochromis niloticus*, *Bidyanus bidyanus*, dan *Carasius auratus* hanya *Carasius auratus* saja yang rentan terhadap infeksi KHV sedangkan ikan-ikan yang lain tidak terpengaruh dan tidak menunjukkan gejala klinis sama sekali serta mampu bertahan hidup. Namun tidak dijelaskan lebih lanjut apakah KHV pada ikan yang lain tetap ada dan bersifat *carrier* atau tidak.

Dari keseluruhan sampel yang telah di periksa, kemudian dipisahkan hasil yang positif saja untuk selanjutnya dielektroforesis ulang untuk menyederhanakan hasil dan memudahkan dalam proses selanjutnya. Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa untuk ikan dengan gejala klinis terserang KHV tidak semuanya menunjukkan hasil positif terutama untuk ikan komet dari Desa Boyolangu, Kec. Boyolangu, Kab. Tulungagung, dimana secara visual ikan tersebut menunjukkan lesi pada jaringan kulit dan geripis pada sirip ekor namun insang ikan tidak pucat. Hal ini dimungkinkan karena ikan yang terserang oleh bakteri dapat juga menunjukkan gejala klinis yang hampir mirip dengan gejala klinis terserang KHV, misalnya gejala klinis ikan yang disebabkan oleh bakteri.

Hasil dari elektroforesis menunjukkan bahwa semua sampel ikan positif KHV teridentifikasi dari pita yang sejajar dengan kontrol positif pada posisi 409 bp, termasuk untuk ikan nila dan gurame. Penelitian yang dilakukan oleh Perelberg *et al.* (2003) tentang kerentanan ikan terhadap infeksi KHV, membuktikan bahwa hanya *Carassius auratus* saja yang rentan terhadap infeksi KHV sedangkan ikan-ikan yang lain yang diujicobakan termasuk

*Oreochromis niloticus* yang diinfeksi dengan dikohabitasi tidak terpengaruh dan tidak menunjukkan gejala klinis.

Berdasarkan hasil sekuensing dan setelah dilakukan BLAST terhadap 5 (lima) sampel tersebut, diperoleh hasil bahwa untuk isolat koi, koki dan komet identik dengan urutan nukleotida dari GenBank untuk genom KHV-GZ11 (isolat dari China) dan Indo\_0K02SS1 (isolat dari Indonesia). Hasil yang identik untuk ikan koi, koki, dan komet dengan genom KHV-GZ11 dari China tidak lepas dari asal mula serangan KHV muncul pertama kali di Indonesia, dimana pada tahun 2002 KHV dilaporkan menyerang di wilayah Blitar yang disebabkan oleh adanya aktifitas impor terhadap induk ikan koi dari China dan pada akhirnya menyebar di berbagai wilayah Indonesia. KHV yang menyerang ikan koi, koki dan komet identik dengan satu sama lain dengan KHV-GZ11 (isolat dari China) dan Indo\_0K02SS1 (isolat dari Indonesia) meskipun berbeda wilayah, dimungkinkan karena keterangan dari pembudidaya bahwa hampir semua sentra budidaya di Jawa Timur mengambil benih atau induk kebanyakan dari wilayah Blitar.

Meskipun terdapat variasi genetik karena pengaruh lingkungan, namun isolat yang berasal dari satu wilayah geografis akan membentuk suatu kelompok yang bersifat *relative homogeny* (Banks (1993) dalam Sugiyanti, 2012). Hal ini dapat dilihat dari hasil analisa homologi terhadap urutan nukleotida yang memberikan gambaran bahwa ikan-ikan tersebut identik 100 % terhadap data dari GenBank untuk isolat KHV-GZ11 dan Indo\_0K02SS1.

Hasil dari pohon filogenetik tersebut menunjukkan bahwa isolat ikan koi, koki dan komet

memiliki kekerabatan yang dekat dengan isolat KHV-GZ11 dan Indo\_0K02SS1. Dari konstruksi pohon filogenetik terbentuk tiga klaster, yaitu klaster pertama terdiri dari isolat uji koki dan komet yang masih terbagi menjadi subklaster koki dan komet, klaster kedua isolat uji koi dan klaster ketiga merupakan isolat pembanding dari China (KHV-GZ11) dan dari Sulawesi Selatan, Indonesia (Indo\_0K02SS1) dan dari hasil analisa pohon filogenetik yang dibuat menunjukkan bahwa dari isolat KHV ikan koi, koki dan komet hanya diperoleh 1 (satu) varian. Tidak adanya varian lain yang ditemukan mengindikasikan bahwa tidak terjadi mutasi gen pada isolat tersebut. Sugiyanti (2012) dalam penelitiannya terkait variasi genetik KHV pada *Cypricus carpio* di Indonesia, menemukan 17 (tujuh belas) varian dari 18 (delapan belas) sampel di seluruh Indonesia dan telah dikelompokkan berdasarkan wilayah, yaitu wilayah I meliputi Kalimantan Selatan, Lampung, Papua Barat, Kalimantan Barat, Jawa, Bali dan Nusa Tenggara Timur dan wilayah II meliputi Sumatera Utara, Kalimantan Timur, Nusa Tenggara Barat, Riau dan DKI Jakarta.

Meskipun terdapat beberapa faktor yang menyebabkan kemungkinan terjadinya mutasi, diantaranya tekanan lingkungan (suhu dan kualitas air) dan tekanan imunitas. Mutasi dapat terjadi sebagai salah satu upaya suatu virus untuk menghindar dari tekanan lingkungan dan tekanan imunitas dari inang (Andalusia, 2011). Cann (2002) juga menyatakan bahwa tingkat virulensi virus makin tinggi apabila persentase homologi nukleotida virus makin kecil.

Hasil analisis pohon filogenetik menunjukkan bahwa isolat ikan koi, koki dan komet memiliki

kekerabatan yang dekat dengan isolat KHV-GZ11 dan Indo\_0K02SS1. Dari konstruksi pohon filogenetik terbentuk 3 (tiga) klaster, yaitu klaster pertama terdiri dari isolat uji koki dan komet yang masih terbagi menjadi subklaster koki dan komet, klaster kedua isolat uji koi dan klaster ketiga merupakan isolat pembanding dari China (KHV-GZ11) dan dari Sulawesi Selatan, Indonesia (Indo\_0K02SS1).

Infeksi KHV yang terjadi pada ikan nila dan gurame belum dapat dibuktikan, karena meskipun terbaca pada alat namun tidak dapat dianalisa lebih lanjut menggunakan program BLAST. Hasil yang diperoleh pada saat di BLAST adalah *unidentified*, hal ini terjadi karena banyak urutan nukleotida dari ikan nila dan gurame yang tidak terbaca pada saat sekuensing. Kemungkinan lain adalah karena hasil ekstraksi yang kurang baik atau terdapat pengotor, misalnya DNA ikan sehingga pada saat sekuensing mengacaukan pembacaan pada alat atau memang ada DNA KHV pada isolat tersebut namun jumlahnya sangat sedikit.

Tidak menutup kemungkinan juga bahwa primer yang digunakan kurang sensitif. Pada penelitian ini digunakan primer dengan urutan Primer Forward (F : 5' -GGG TTA CCT GTACGAG -3') dan Primer Reverse (R : 5' -CAC CCA GTA GAT TAT GC -3') yang akan menghasilkan produk pada 409 bp, yang banyak / umum digunakan oleh UPT Karantina Ikan di Indonesia. Namun belum pernah dicoba menggunakan pasangan primer lain. Analisa homologi dan desain pohon filogenetik tidak dilakukan terhadap isolat KHV dari ikan nila dan gurame sehingga tidak dapat diketahui kekerabatannya.

## Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Gunanti Mahasri, Ir. M.Si., dan Dr. drh., Mufasirin, M.Si, yang telah memberikan banyak masukan dan arahan terkait penelitian ini, serta Haristanto, A.Pi., M.P. yang telah mengizinkan laboratoriumnya digunakan untuk penelitian ini.

## Daftar Pustaka

- Andalusia, R. (2011) Analisis Antigenitas Berdasarkan Susunan Nukleotida, Asam Amino dan Peptida pada *Infectious Myo Necrosis Virus* yang Menyerang Udang Putih (*Litopenaeus vannamei*). Tesis. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Bretzinger, A., Fischer-Scherl, T., Oumouma, M., Hoffmann, R. and Truyen, U. (1999) Mass Mortalities in Koi, *Cyprinus carpio*, Associated with Gill and Skin Diseases. Bulletin Europe Association. Fish Pathology. Vol 19.
- BUSKIPM, (2012) Metode Standar Penggunaan Squencer ABI 3130. Jakarta.
- Cann, A.J. (2005) Principles of Molecular Virology. 4<sup>th</sup> Edition. University of Leicester, United Kingdom.
- Hedrick R.P., Marty G.D., Nordhausen R.W., Kebus M.J., Bercovier H. and Eldar A. (1999) A Herpesvirus Associated with Mass Mortality of Juvenile and Adult Koi *Cyprinus carpio*, Fish Health Section, American Fisheries Society.
- Hedrick R.P., Gilad O., Yun S., Spangenberg J.V., Marty G.D., Nordhausen R.W., Kebus M.J., Bercovier H. and Eldar A. (2000) A Herpesvirus Associated with Mass Mortality of Juvenile and Adult Koi, a Strain of Common carp. *J. Aquat. Anim. Health*. Vol. 12.

- Ilouze, M., Dishon, A., and Kotler, M. (2006) Characterization Of A Novel Virus Causing A Lethal Disease In Carp And Koi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*.
- Kepmen. No. Kep.26/Men/2013, (2013) Penetapan Jenis-jenis Hama dan Penyakit Ikan Karantina, Golongan, Media Pembawa dan Sebarannya. Jakarta.
- Lio, G. (2009) *Koi Herpesvirus (KHV) : Diagnosa, Pencegahan dan Pengendalian*. Departement Aquaculture Asia Tenggara, Tigbauan. Iloilo. Filipine.
- Malole, M.B. (1988) *Virologi*. Pusat Antar Universitas Institut Pertanian Bogor.
- Office International des Epizooties (OIE). (2012) *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animal*. Office International des Epizooties. Chapter 2.3.6.
- Perelberg, A., Smirnov, M., Hutoran, M., Diamant, A., Bejerano, Y., Kotler, M. (2003) Epidemiological Description of A new Viral Disease Afflicting Cultured *Cyprinus carpio* in Israel. *Israeli journal of Aquacultur* 55:1-8.
- Pikarsky E, Ronen A, Abramowitz J, Levavi-Sivan B, Hutoran M, Shapira Y, Steinitz M, Perelbrg A, Soffer D. (2004) Pathogenesis of Acute Viral Disease Induced in Fish bay Carp Interstitial Nephritis Gill Necrosis Virus. *Journal of Virology. J. Virol.* 78 : 9544-9551.
- Pusat Karantina Ikan, (2008) *Metode Standar Pemeriksaan HPIK Golongan Virus Koi Herpesvirus (KHV)*. Penerbit Puskari. Jakarta.
- Pusat Karantina Ikan, (2010) *Pengambilan Contoh Media Pembawa Hidup Air Tawar/Payau/Laut*. Penerbit Puskari. Jakarta.
- Sugiyanti, B. (2012) *Variasi Genetika dan Perubahan Patologis Infeksi Koi Herpes Virus (KHV) pada Cyprinus carpio*. Desertasi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Sunarto, A., Rukyani, A., Cameron, A., and Subasinghe, R. (2004) *Outbreak of Disease Causing Mass Mortality in Koi and Common Carp in Indonesia*. Workshop on Koi Herpesvirus. London.
- Sunarto, A. and Cameron, A. (2005) *Epidemiology and Control of Koi Herpesvirus in Indonesia*. *Procedings of the 11<sup>th</sup> International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics*.
- Yuwono, T. (2006) *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Andi Offset. Yogyakarta.

## INDEKS PENULIS

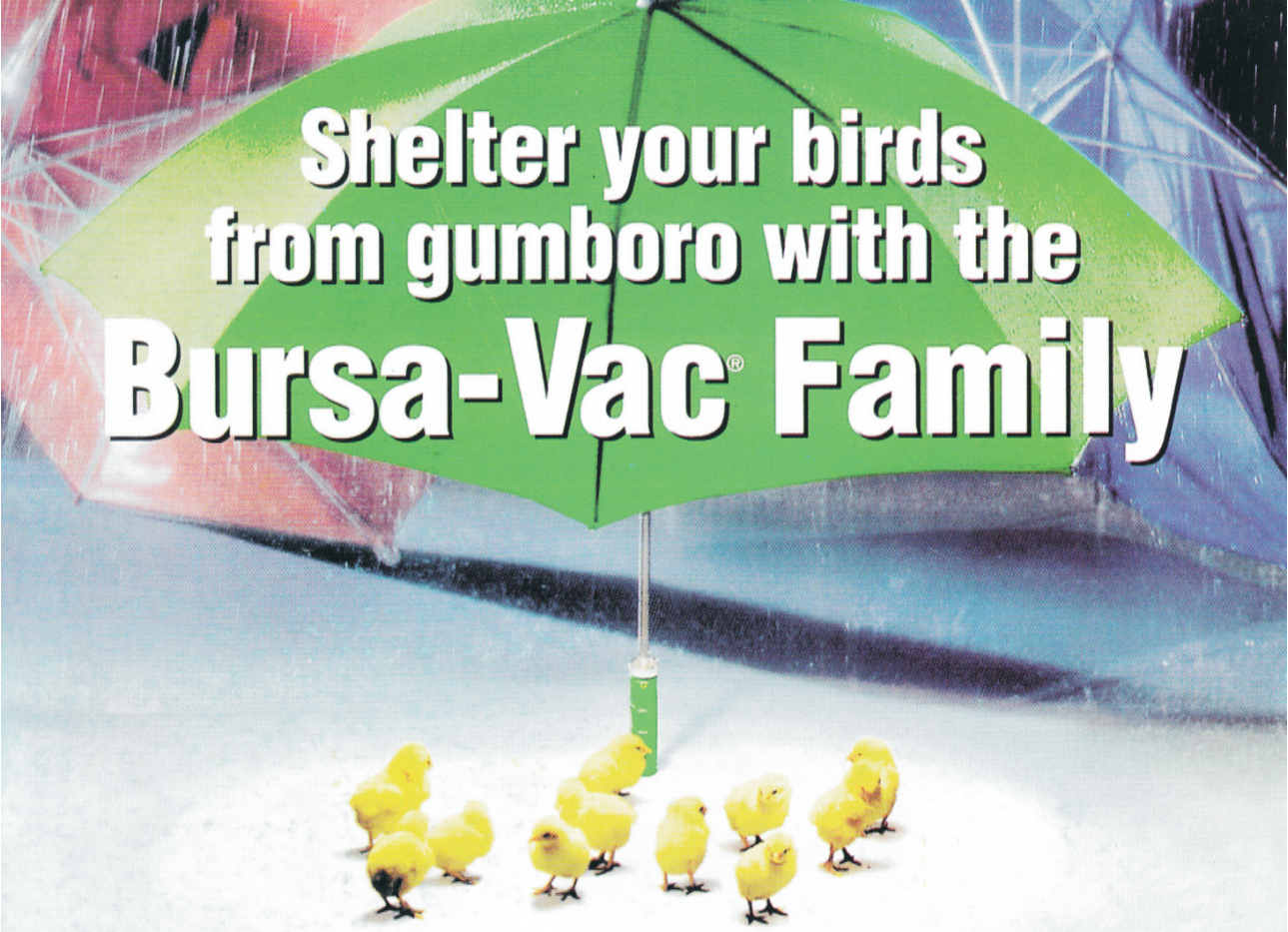
Agnya Sinung Suminar 117  
Agung Budiyanto 46  
Anis Dwi Utami 13  
Artanti Tri Lestari 85  
Asmarani Kusumawati 22  
Bintang Perkasa B 105  
Budi Rianto Wahidi 130  
Denok Asih T.R 105  
Dewi Istika 94  
Dwi Priyowidodo 13  
Ema Damayanti 94  
Erif Maha N 46  
Hardi Julendra 94  
Hastari Wuryastuty 1  
Ida Arlita Wulandari 40  
Ikrom 105  
Irene Linda Megawati Saputra 117  
Lusty Istiqomah 94  
Monica Septiani 68  
Paula Nancy Lefaan 55  
Prabowo Purwono Putro 22  
Putu Eka Sudaryatma 85  
Rafika Tiara N 105  
Reni Wira A 105  
Rika Yuniar Siregar 78  
Sri Winarsih 94  
Surya Agus Prihatno 40  
Tarsisius Considus Tophianong 32, 46  
Tri Utami 32  
Tri Wahyu Pangestinationsih 117  
Wasito 1, 105  
Yatri Drastini 68  
Yuswandi 78

## INDEKS SUBYEK

- Aeromonas hydrophila* 105  
Aktivitas antibakteri 95  
*Antibacterial activity* 94  
*Artificial insemination* 40, 46  
*Bali cattle* 46  
*Beef cattle* 40  
*Biophytum petersianum* 55  
*Blood* 85  
Cacing tanah (*L.rubellus*) 95  
CATT 78  
*Cerebellum development* 117  
*Cooperatives* 68  
*Corpus luteum* 22  
*Cow milk* 68  
Darah 85  
*Diffusion* 105  
Difusi 106  
Dilusi 106  
*Dilution* 105  
Domba 78  
*Earthworm (L. rubellus)* 94  
*East Java* 130  
Ekstrak 95  
Ekstrak buah merah 1  
Ekstrak daun kamboja 106  
*Erythrocytes* 13  
Eritrosit 13  
*Estrus* 46, 47  
*Extract* 94  
*Fascicularis* 117  
Filogenetik 130  
*First trimester of cerebellum* 117  
Fitofarmaka 1  
*Flavonoid* 55  
Folikel ovulasi 22  
*Fresh Water Fish* 130  
*Friesian Holstein* 32  
*Friesian Holstein* 32  
*Frozen semen* 40  
Gen *Thymidin Kinase* 130  
*GnRH* 22  
Granulasi 95  
*Granulation* 94  
Hemoglobin 13  
*Hemoglobine* 13  
Hiperplastik goiter 1  
*Hyperplastic goiter* 1  
Ikan Air Tawar 130  
*Immunochemical* 85  
Imunokimia 85  
*In vitro* 105, 106  
Inseminasi buatan 40, 47  
*Isthmus and rhombic lip* 117  
*Isthmus* 117  
Jawa Timur 130  
Jumlah total bakteri 68  
Kabupaten Sikka 47  
*Kamboja leaves extract* 105  
*Kebar grass* 55  
Kerapu macan 85  
*Koi Herpesvirus* 130  
Korpus luteum 22  
Kualitas spermatozoa 32  
*Livestock* 46  
*Long tailed macaque* 117  
*Macaca* 117  
*Macaca fascicularis* 117  
Monyet ekor panjang 117  
Morfologi 32  
*Morphology* 32  
Motilitas 32  
*Motility* 32  
*Non returnrate* 40  
*Non returnrate (NR)* 40  
Obat herbal anti-gondok terstandar 1  
Organ 85  
*Organs* 85  
*Ovulatory follicle* 22  
PCV 13  
Perkembangan serebelum 117  
*PGF2* 22  
*Phylogenetic* 130  
*Phytopharmaca* 1  
*Plate count agar* 68  
*Prevalences* 78  
Prevalensi 78  
*Quality of spermatozoa* 32  
*Red fruit extract* 1  
*Red fruit's extract* 13  
*Rhombic lip* 117  
Rumah potong hewan 78  
*Rumput Kebar* 55  
Sapi Bali 47  
Sapi potong 40  
*Saponin* 55  
Sari Buah Merah 13  
Semen beku 40  
*Sheeps* 78

*Sikka Regency* 46  
*Slaughterhouse* 78  
SNI 68  
*Spermatogenesis* 55  
*Sprague Dawley rats* 1  
*Standardized anti-goitrogenic herbal medicine* 1  
Susu sapi 68  
Ternak 47  
*Thawing* 32, 40  
*Thawing* 40  
*Thymidin Kinase Gene* 130  
*Tiger grouper* 85  
Tikus Sprague Dawley 1  
Toksoplasmosis 78  
*Total bacteria count* 68  
*Toxoplasma gondii* 13  
*Toxoplasmosis* 78  
Trimester pertama serebelum 117  
VNN 85









# Shelter your birds from gumboro with the **Bursa-Vac<sup>®</sup> Family**

## **The Bursa-Vac Family umbrella of protection...**

### **Bursa-Vac 3**

-  Highly antigenic chicken embryo origin intermediate vaccine
-  Safe enough for use at day-of-age

### **Bursa-Vac**

-  The time-proven #1 vaccine worldwide for protection against VV IBD
-  First choice for booster in breeder vaccination programs

**The Bursa-Vac Family...  
helps you weather the storm**

**PMC PT. PIMAIMAS CITRA**

Mugi Griya, 3rd Floor, Suite 304  
Jl. MT. Haryono Kav. 10  
P.O. Box 2981 / JKT, Jakarta 12810, Indonesia  
Phone : (62-21) 830 8470, 830 8471  
Fax. : (62-21) 830 8472



# **Dengan Ayam Membangun Bangsa**

**WONOKOYO FEED**



**WONCHICK**



**888 ISA BROWN**



**DAGING AYAM 808**



**GOLDSTAR NUGGET**



**WONOKOYO  
GROUP**



BREEDING FARM SUKABUMI

**PT. WONOKOYO JAYA CORPORINDO**

Jl. Taman Bungkul 1 - 7, Surabaya 60241  
Telp. (031) 295 6000 - Fax. (031) 567 9655

**PT. WONOKOYO JAYA KUSUMA**

Jl. Raya Rangkasbitung Km. 2, Cikande, Serang 42186  
Telp. (0254) 403 333 - Fax. (0254) 400 602

[www.wonokoyo.co.id](http://www.wonokoyo.co.id)



my country...my diseases...  
**my vaccines**...my solutions...



**vaksindo**  
 RESEARCH BASED VACCINES



**PT VAKSINDO SATWA NUSANTARA**

Jl. Pembangunan II, Cicadas, Gunung Putri, Bogor, Jawa Barat, Indonesia  
 T. (62-21) 867 0414 • F. (62-21) 867 2501 • E. info@vsnjapfacomfeed.co.id  
 www.vaksindo.co.id

Hubungi Technical Coordinator (0813 10048964)/  
 Marketing Coordinator (081392587013) untuk membantu anda.

**trusted · homologous · efficacious**

**DISTRIBUTOR:** PT. Agrinusa Jaya Sentosa • Jl. Raya Panjang, Komplek Kedoya Elok Plaza, Blok DE - 12, Jakarta Barat • T. (021) 581 281 9

**PERTAMA DI INDONESIA !!!**

# KEPROMEK ORAL

**OBAT KUTU DAN CACING  
UNTUK UNGGAS, SAPI, DOMBA DAN KAMBING  
MELALUI AIR MINUM**

- Ampuh mengobati parasit eksternal (kutu) juga parasit internal (cacing).
- Tidak menyebabkan stress.
- Sangat praktis dan lebih ekonomis.
- Sudah terbukti sangat ampuh karena telah digunakan oleh para peternak layer hampir di seluruh Indonesia.

Kutu (Parasit eksternal) sangat merugikan dapat menyebabkan anemia, kebotakan (rontok bulu), gelisah dan konsumsi pakan berkurang sehingga produksi telur menurun dan bisa terjadi kematian.



No. Reg: Deptan RI No. I. 07043206. PKC



**PT. OTASINDO**  
*Prima Sejahtera*

APARTMENT & OFFICE PATRIA PARK NO. RK-07  
Jl. Jend. D.I. Panjaitan Kav. 5-7, Jakarta 13340  
Telp : (62-21) 85918477; (62-21) 85918478  
Fax : (62-21) 85918498  
E-mail : info@otasindo.com  
Website : www.otasindo.com



**KEPRO BV  
HOLLAND**

**Ketamine** termasuk ke dalam kelompok anestesi yang general/umum dan menyebabkan hilangnya kesadaran dan ditambah pula memiliki efek analgesik setelah pemberian secara parenteral, tanpa kehilangan efek refleks. Lama anestesi antara 15 sampai 20 menit dan pemulihan kira-kira 30 sampai 60 menit.

## INDIKASI

**Ketamine 10% Inj.** efektif untuk:

**Terapi tunggal:** sebagai agen pengendali untuk diagnosis dan pemeriksaan x-ray, dalam prosedur operasi minor dan cepat dimana tidak memerlukan relaksasi otot dan dalam perjalanan.

**Terapi kombinasi:** dikombinasikan dengan **Atropine** dan penenang /sedative seperti **Xylazine** dalam prosedur operasi seperti Ovariektomi, Kastrasi, Pembedahan Caesar dan Ekstraksi gigi.

# KETAMINE 10% INJ.

**Untuk Anestesi umum**



Deptan RI No. I. 04032739 PKC



**PT. OTASINDO**  
*Prima Sejahtera*

APARTMENT & OFFICE PATRIA PARK NO. RK-07  
Jl. Jend. D.I. Panjaitan Kav. 5-7, Jakarta 13340  
Telp : (62-21) 85918477; (62-21) 85918478  
Fax : (62-21) 85918498  
E-mail : info@otasindo.com  
Website : www.otasindo.com



**KEPRO BV  
HOLLAND**