Preparasi Antigen KHV untuk Pencegahan Infeksi KHV pada Ikan Koi (*Cyprinus carpio*)

E. Sulistiyowati*, St.S. Yasin, W. Suharni, S. R. Setyaningsih,
U. S Kuba, Saribanong, Hasmi, St. Narwiyani, Suriati, Widodo

Balai Besar Karantina Ikan Hasanuddin Makassar
Jl. Landak Baru No. 7 Makassar -90135; Telp. (0411) 874 793 ; Fax. (0411) 855 766
*Korespondensi: E-mail: Zoelist_tiyowati@yahoo.co.id

Abstrak

Infeksi Koi Herpes Virus merupakan penyakit sangat serius yang menyerang ikan mas dan koi. Penyakit ini menyebabkan kematian massal sebesar 80-95% dari total populasi dan menimbulkan kerugian ekonomi yang sangat besar. Tujuan dari studi ini adalah untuk mendapatkan antigen KHV yang dapat digunakan untuk mencegah infeksi KHV. Metode preparasi antigen dilakukan dengan membuat suspensi organ 10% dari seluruh organ target ikan yang positif terinfeksi KHV, kemudian dipekatkan sehingga menghasilkan konsentrat organ (antigen). Sebagian dari konsentrat organ (antigen) yang dihasilkan, di-inaktif-kan dengan formaldehyde 0,3%, kemudian disuntikkan pada ikan koi sehat (vaksinasi). Penyuntikan dilakukan sebanyak 3 kali dalam kurun waktu 4 minggu. Satu minggu setelah penyuntikan ke-3 dilakukan uji tantang. Uji tantang dilakukan dengan menyuntikkan virus aktif KHV dengan dosis 0,1 ml secara intraperitoneal pada koi yang telah divaksin. Sebagai kontrol, dilakukan juga penyuntikan pada koi yang tidak diberi perlakuan. Hasil uji tantang menunjukkan bahwa semua ikan yang divaksinasi dengan ketiga metode preparasi antigen tidak menunjukkan gejala klinis terinfeksi KHV.

Kata kunci : KHV, koi, preparasi antigen, vaksinasi

Pendahuluan

Ikan mas (*Cyprinus carpio*) merupakan komoditi budi daya air tawar terbesar di Indonesia. Produksi tahunan ikan mas mencapai 75,322 ton. Kegiatan budi daya ikan mas tak lepas dari serangan hama dan penyakit ikan, salah satunya adalah penyakit KHV (*Koi Herpes Virus*) yang merupakan penyakit paling ganas yang menyebabkan kematian massal serta kerugian ekonomi yang cukup besar.

Koi Herpes Virus menyerang ikan mas dan koi pertama kali di Blitar pada bulan Maret 2002, terus menyebar ke Jawa Barat pada bulan April 2002, Jawa Tengah, dan Bali. Pada bulan Februari 2003, penyakit ini menyebar ke pulau Sumatera (Sunarto *et al.* 2005). Sejak terjadinya wabah ikan Mas yang disebabkan oleh KHV pada tahun 2002, produksi ikan Mas di Indonesia mengalami kelesuan hingga sekarang.

Infeksi *Koi Herpes Virus* (KHV) adalah salah satu penyakit yang digolongkan sebagai penyakit utama di Indonesia oleh Komisi Nasional Kesehatan Ikan. Selain itu, KHV merupakan Hama Penyakit Ikan Karantina Golongan I sesuai Surat Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan Nomor KEP.17/MEN/2006 tentang penetapan "Jenis-jenis Hama dan Penyakit Ikan Karantina, Golongan, Media Pembawa dan Sebarannya" (Keputusan Menteri 2006).

Hingga kini penyakit virus sulit untuk diberikan perlakuan pengobatan karena virus berada didalam sel. Untuk itu, upaya pencegahan untuk meningkatkan daya tahan tubuh ikan menjadi salah satu alternatif pengendalian. Tujuan dari studi ini adalah untuk mendapatkan antigen KHV yang dapat digunakan untuk mencegah infeksi KHV.

Bahan dan Metode

Studi ini dilakukan di Laboratorium Uji Balai Besar Karantina Ikan Hasanuddin Makassar selama 6 bulan yaitu pada bulan Mei - Oktober 2009.

Bahan dan Alat

Preparasi Antigen

Bahan yang digunakan dalam preparasi antigen adalah 10 ekor ikan koi yang positif terhadap PCR KHV, ikan koi PCR (-) KHV 30 ekor untuk infeksi buatan, antibiotik (*Penicillin* dan *Streptomycin*), aquades bebas *pyrogen*, NaCl kristal, *formaldehyde*, *polyethylen glycol* (PEG-6000), TES (0,01M Tris-HCl, pH 7,2 + 0,002 M EDTA + 0,15 M NaCl), Phosphate Buffered Saline (PBS), *microtubes*, *microtips*, Millex – ha 0,45µm filter unit milipore. Alat yang digunakan dalam preparasi antigen adalah *refrigerated micro centrifuge, macro pippete, micro pippete, magnetic stirer, erlenmeyer flash, laminary air flow vertical cabinet, vortex, deep freezer,* termometer.

Uji PCR

Bahan yang digunakan dalam uji PCR adalah PCR kit untuk KHV (IQ 2000TM), lysis buffer, etanol, ddH_2O, TE buffer, ethidium bromide, agarose, microtubes, microtips. Alat yang digunakan dalam uji PCR adalah mesin PCR, elektroforesis, gel dokumentasi, *laminary air flow vertical cabinet*, *microwave*, vortex, *alumunium foil*, *block heater*.

Uji Tantang

Bahan yang digunakan dalam uji tantang adalah ikan koi PCR (-) KHV yang telah divaksin sebanyak 30 ekor (setiap perlakuan 10 ekor) dan ikan kontrol 10 ekor, spoit 1 ml, antigen aktif KHV hasil preparasi (suspensi organ 10% dari ikan yang terifeksi KHV). Alat yang digunakan dalam uji tantang adalah Aquarium, termometer, blower, selang, batu aerasi.

Metode

Studi ini diawali dengan infeksi buatan yang bertujuan untuk memperbanyak virus. Infeksi buatan dilakukan dengan menginfeksikan suspensi organ 10% dari ikan koi yang positif terinfeksi KHV pada ikan koi sehat yang sebelumnya telah dipastikan status kesehatannya dengan uji PCR. Suspensi organ 10% dalam PBS dibuat dengan cara menggerus organ (insang) pada mortar dingin dan steril dengan perbandingan 1 : 9. Suspensi organ 10% disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan dipindahkan pada microtube baru kemudian disentrifus selama 15 menit dengan kecepatan 12000 rpm. Supernatan disaring dengan filter unit milipore 0,45 µm, kemudian ditambahkan antibiotik Penicillin 1000 iu/ml dan Streptomycin 1000 µg/ml. Campuran supernatan dan antibiotik tersebut kemudian disuntikkan pada ikan koi sehat secara intraperitoneal dengan dosis 0,1 ml. Pengamatan perkembangan infeksi dilakukan selama 7 – 10 hari. Setelah ikan menunjukkan gejala klinis terinfeksi KHV, dilakukan uji PCR untuk memastikan adanya infeksi virus KHV.

Preparasi antigen dilakukan dengan cara membuat suspensi organ 10% dari 10 ekor ikan koi hasil infeksi buatan yang dinyatakan positif terinfeksi KHV melalui pemeriksaan PCR. Suspensi organ 10% dalam PBS dibuat dengan cara menggerus organ (insang, ginjal dan hati) pada mortar dingin dan steril dengan perbandingan 1 : 9. Suspensi organ selanjutnya dipekatkan dengan 3 metode yaitu: A) Suspensi organ segar dengan penambahan polyethylen glycol (PEG-6000) dan TES; B) Suspensi organ segar tanpa penambahan PEG-6000 dan TES; C) freeze thawing dengan penambahan PEG-6000 dan TES.

Metode A dan B dikerjakan secara bersama-sama. Suspensi organ 10% disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C. Supernatan dipindahkan pada microtube baru kemudian disentrifus selama 15 menit dengan kecepatan 12000 rpm. Supernatan disaring dengan filter unit milipore 0,45µm. Metode B berakhir setelah supernatan hasil filtrasi ditambah dengan formaldehyde 0,3% dan dihomogenkan menggunakan magnetic tirrer selama 24 – 48 jam pada suhu 4 °C. Sedangkan metode A masih dilanjutkan dengan menambahkan NaCl pada supernatan sampai konsentrasi 2,3% dan PEG-6000 hingga konsentrasi 7% kemudian dihomogenkan

menggunakan magnetic tirrer selama semalam pada suhu 4 °C. Suspensi lalu disentrifuse dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Supernatan dibuang dan presipitat diresuspensi dalam TES (0,01M Tris-HCl, pH 7,2 + 0,002 M EDTA + 0,15 M NaCl) 0,5ml. Suspensi divortex dan dikumpulkan sebagai virus pekat (Mahy, Brian dan H.O. Kangro 1996).

Sebagian virus pekat diinaktifkan dengan menambahkan formaldehyde 0,3% lalu di stirring overnight selama 24-48 jam pada suhu 4 °C. Urutan cara kerja pada metode C sama dengan metode A, hanya berbeda pada suspensi organ yang digunakan. Pada metode C, suspensi organ terlebih dahulu disimpan pada freezer bersuhu -80 °C selama 24 jam kemudian di lakukan *thawing*. Hasil *thawing* tersebut yang selanjutnya diproses seperti metode A.

Antigen inaktif hasil dari ketiga metode tersebut kemudian disuntikkan pada ikan koi sehat (bebas KHV), masing-masing perlakuan sebanyak 10 ekor dengan dosis 1 ml secara intramuscular. Pengamatan tingkah laku dilakukan selama 2 minggu. Pada minggu ke-2 dan ke-3, dilakukan booster menggunakan antigen inaktif, dengan dosis dan rute injeksi yang sama.

Uji tantang bertujuan untuk menguji ketahanan tubuh ikan Koi pascavaksinasi terhadap virus KHV. Uji tantang dilakukan dengan cara menyuntikkan virus KHV aktif (suspensi organ 10% dari ikan positif KHV) pada ikan koi yang telah divaksin dengan dosis 0,1 ml secara intraperitoneal. Sebagai kontrol dilakukan juga penyuntikkan pada 10 ekor ikan koi sehat yang tidak di vaksin. Dilakukan pengamatan terhadap perubahan tingkah laku, gejala klinis dan tingkat kematian ikan setiap hari.

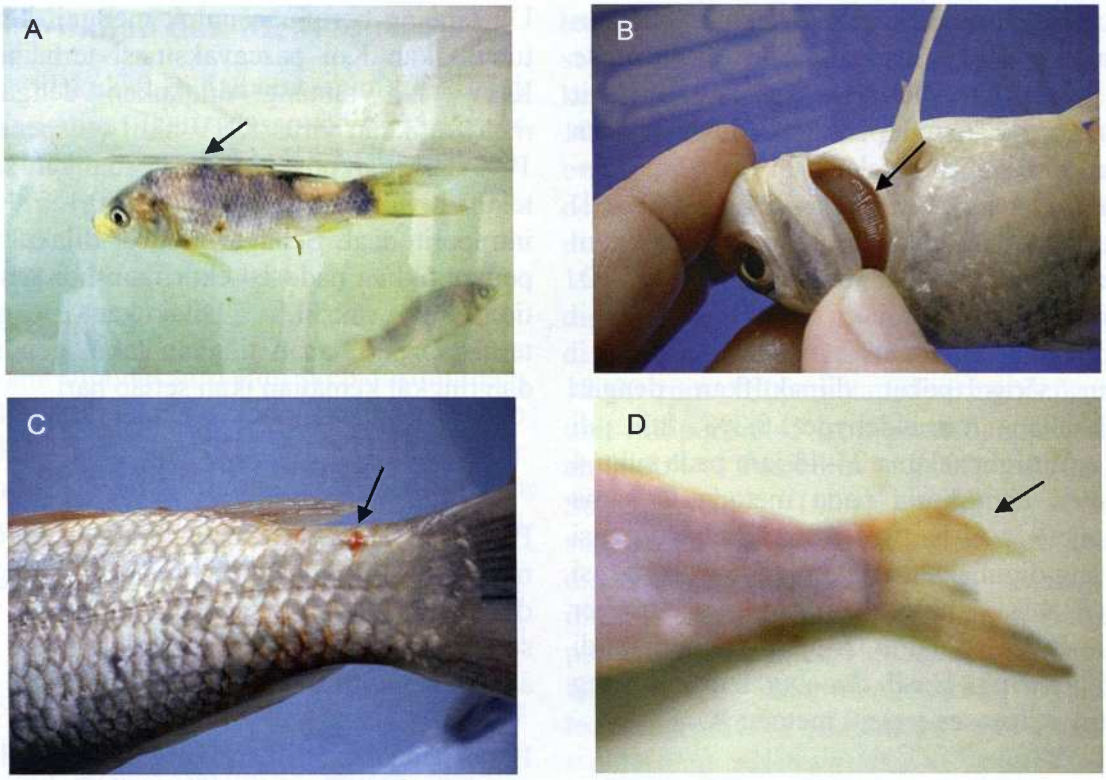
Hasil dan Pembahasan

Penentuan status kesehatan ikan dengan uji PCR menunjukkan hasil bahwa koi yang akan digunakan adalah positif terinfeksi KHV, sedangkan koi yang akan diinfeksi buatan adalah negatif KHV.

Hasil pengamatan ikan koi yang telah diinfeksi buatan 100% memperlihatkan gejala seperti gerakan melamban, berenang dipermukaan air, insang pucat, hemoragie pada permukaan tubuh dan geripis pada sirip ekor. Data pengamatan gejala klinis ikan koi dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengamatan gejala klinis ikan koi yang telah diinfeksi buatan

Hari ke-	Gejala klinis
1	Ikan koi belum menunjukkan gejala klinis (100%).
2	Ikan cenderung berdiam diri di dasar akuarium, sebagian terlihat berenang miring dan sebagian lagi berenang di dekat permukaan air (70%).
3	Ikan masih berdiam diri di dasar akuarium, sebagian masih berenang miring dan sebagian lagi berenang didekat permukaan air. Gerakan ikan cenderung melambat (80%).
4	Kondisi ikan melemah, anoreksia, insang pucat, timbul haemoragie di permukaan tubuh (90%).
5	Sebagian besar ikan berenang mendekati sumber oksigen (90%).
6	Tingkah laku dan gejala klinis masih sama dengan hari sebelumnya (100%).
7	Gejala klinis bertambah dengan munculnya geripis di sirip ekor pada sebagian ikan (100%).



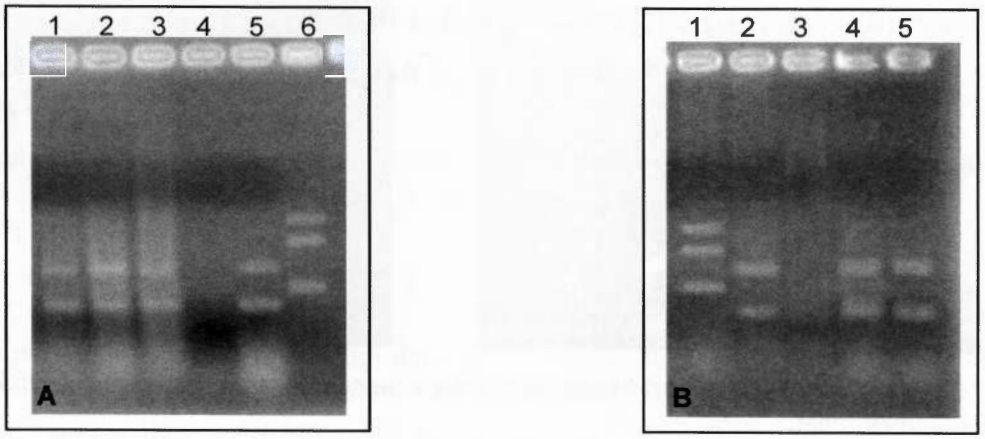
Gambar 1. (A) Ikan berenang di permukaan air; (B) Insang pucat; (C) Haemorag pada permukaan tubuh; (D) Geripis pada sirip ekor.

Gejala klinis pada ikan koi yang telah di infeksi buatan dapat di lihat pada gambar 1. Gejala klinis ini sesuai dengan yang diungkapkan Yosha (2003), ikan yang terserang virus ini biasanya menunjukkan gejala seperti nafsu makan menurun, kondisi melemah, sulit bernapas sehingga mulut sering terlihat dipermukaan air untuk mendapatkan oksigen. OATA (2001) menyatakan bahwa gejala klinis ikan yang terserang herpes antara lain adalah pendarahan pada insang, bercak pucat pada insang, mata cekung dan ikan gelisah (kadang aktif berubah menjadi sangat aktif atau sebaliknya). Ciri lainnya terjadi infeksi sekunder dapat berupa memar atau melepuh ataupun borok pada permukaan kulit dan tubuh akan memproduksi lendir berlebih. Kadang disertai sisik rontok dan ujung sirip geripis (Gray 2002).

Hasil pengukuran suhu selama pengamatan berkisar 26-27 °C. Suhu tersebut masuk dalam kisaran suhu optimal untuk perkembangan virus KHV. Hal ini sesuai dengan pernyataan Hedrick *et al.* (2000), bahwa penyakit KHV menyebabkan kematian yang besar dan bersifat sporadis pada ikan mas dan koi. Suhu optimal virus herpes yang menunjukkan kematian adalah 18-27 °C.

Hasil uji konfirmasi dengan PCR menunjukkan bahwa ikan yang diinfeksi buatan menggunakan suspensi organ 10% dari ikan yang positif KHV adalah positif terinfeksi *Koi Herpes Virus* (KHV). Data hasil elektroforesis uji PCR dapat dilihat pada gambar 2A.

Hasil preparasi antigen yang telah dipekatkan kemudian diuji PCR untuk meyakinkan statusnya. Hasil uji PCR menunjukkan bahwa konsentrat organ (antigen) dengan menggunakan metode A maupun C positif KHV. Suspensi 10% dari metode B tidak dilakukan uji PCR dengan pertimbangan berasal dari suspensi yang sama dengan metode A. Data hasil uji PCR dapat dilihat pada gambar 2B.



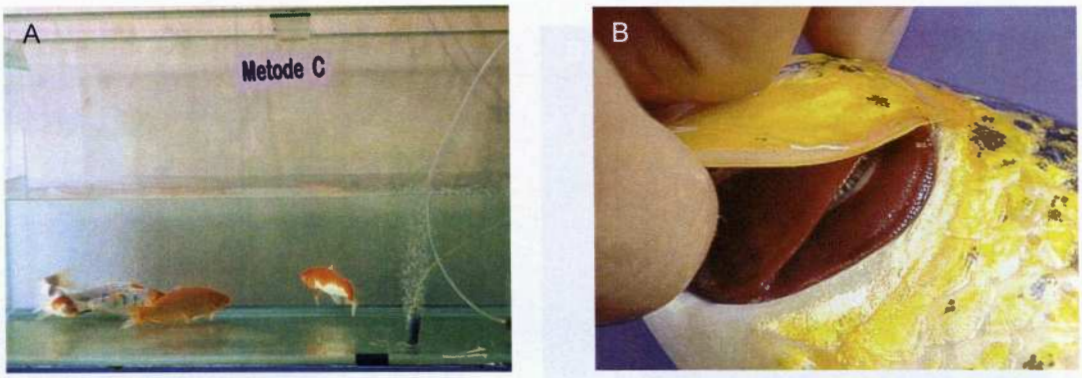
Gambar 2. Hasil elektroforesis uji PCR terhadap: (A) koi yang telah diinfeksi buatan (positif KHV). (1) Insang ikan koi ulangan 1 (+), (2) Insang ikan koi ulangan 2 (+), (3) Insang ikan koi ulangan 3 (+), (4) Kontrol negatif (-), (5) Kontrol positif (+) dan (6) Marker 848 bp, 630 bp, 333 bp. (B) konsentrat organ hasil pemekatan. (1) Marker 848 bp, 630 bp, 333 bp, (2) Kontrol positif (+), (3) Kontrol negatif (-), (4) Metode A (+), (5) Metode C (+).

Konsentrat organ (antigen) dari ketiga metode tersebut, sebagian diinaktifkan dengan formaldehyde 0,3%, kemudian disuntikkan pada 30 ekor ikan koi sehat (vaksinasi), untuk merangsang terbentuknya kekebalan.

Hasil uji tantang menunjukkan bahwa semua ikan yang telah divaksinasi menggunakan ketiga metode tersebut tidak menunjukkan gejala klinis terinfeksi KHV. Hal ini menunjukkan bahwa ikan yang telah divaksin, mempunyai kekebalan terhadap virus KHV. Data pengamatan gejala klinis terhadap ikan koi selama uji tantang dapat dilihat pada Tabel 2

Tabel 2. Pengamatan gejala klinis terhadapi koi selama uji tantang

Hari ke-	Gejala klinis	
	Ikan yang divaksin	**Ikan kontrol (tidak divaksin)**
1.	Ikan koi belum menunjukkan gejala klinis (100%)	Ikan koi belum menunjukkan gejala klinis (100%).
2.	Idem	Ikan cenderung berdiam diri di dasar akuarium, sebagian terlihat berenang miring dan sebagian lagi berenang di dekat permukaan air (70%).
3.	Idem	Ikan masih berdiam diri di dasar akuarium, sebagian masih berenang miring dan sebagian lagi berenang didekat permukaan air. Gerakan ikan cenderung melambat (80%).
4.	Idem	Kondisi ikan melemah, anoreksia, insang pucat, timbul haemoragie di permukaan tubuh (90%).
5.	Idem	Sebagian besar ikan berenang mendekati sumber oksigen (90%).
6.	Idem	Tingkah laku dan gejala klinis masih sama dengan hari sebelumnya (100%).
7.	Sampai dengan hari ke-7 ikan tidak menunjukkan gejala klinis terinfeksi KHV (100%)	Gejala klinis bertambah dengan munculnya geripis di sirip ekor pada sebagian ikan (100%).



Gambar 4. (A) Ikan yang divaksin aktif berenang dan tidak menunjukkan gejala klinis terinfeksi KHV; (B) Insang koi tampak sehat.

Kondisi ikan yang divaksin selama uji tantang dapat dilihat pada gambar 4. Sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Ronen *et al.* (2003) yang menyuntikkan vaksin KHV pada ikan mas menunjukkan bahwa ikan yang divaksin dengan metode injeksi seperti ini memiliki titer antibodi yang lebih tinggi dari ikan yang tidak divaksin.

Kesimpulan dan Saran

Vaksin yang dihasilkan dari ketiga metode preparasi, masing-masing memberi proteksi 100% pada ikan yang divaksinasi. Metode ini dapat diaplikasikan untuk pencegahan infeksi KHV pada budi daya ikan koi dan ikan sejenis yang peka terhadap infeksi KHV.

Ucapan Terima Kasih

Kami mengucapkan terima kasih kepada Dr. M.B. Malole selaku Narasumber atas bimbingan dan arahan selama penulisan makalah ini. Tak lupa kami ucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya studi ini.

Daftar Pustaka

Kep.17/Men/2006. 2006. Tentang Penetapan Jenis-Jenis Hama dan Penyakit Ikan Karantina, Golongan, Media Pembawa dan Sebarannya .

Gray WL, Mullis L, Lapatra SE, Groff JM, Goodwin A. 2002. Detection of koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish. *Journal of Fish Diseases.* **25:**171–178.

Hedrick RP, Gilad O, Yun S, Spangenberg JV, Marty GD, Nordhausen RW, Kebus MJ, Bercovier H, Eldar A. 2000. A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. *J. Aquat. Anim. Health.* **12:**44–57.

Mahy, Brian WJ, Hillar O, Kangro. 1996. *Virology Methods Manual*. Elseviel Ltd. Amsterdam.

Ornamental Aquatic Trade Association (OATA). 2001. Koi Herpes Virus (KHV). United Kingdom. 33 hal

Ronen A, Perelberg A, Abramowitz J, Hutoran M, Tinman S, Bejerano I, Steinitz M, Kotler M. 2003. Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*. *Vaccine.* **21:**4677-4684.

Sunarto A, Taukhid, Rukyani A, Koesharyani I, Supriyadi H, Gardenia L, Huminto H, Agungpriyono DR, Pasaribu FH, Herdikiawan D, Rukmono D, Prayitno B. 2005. *Field Investgation on a Serious Disease Outbreak among Koi and Common Carp (Cyprinus carpio) in Indonesia. dalam* P. Walker, R. Lester dan M.G. Bondad-Reantaso (eds). Diseases in Asian Aquaqulture V.pp. 125 – 135. Fish Health Section. Asian Fisheries Society. Manila.

Yosha, S. 2003. *Update on Koi Herpes Virus (KHV) for The Koi Hobbyist*. Lakeland. Florida. www.AKCA.org.