

**KELANGSUNGAN HIDUP IKAN KOI (*Cyprinus carpio koi*)
YANG TERINFEKSI KHV (*Koi Herpesvirus*)**

**THE SURVIVAL OF KOI GOLDFISH (*Cyprinus carpio koi*)
WHICH INFECTED BY KHV (*Koi Herpesvirus*)**

Ninik Setyorini¹, Asmaul Khusnah² dan Lilia Widajatingrum³

¹ Kepala Balai Pengembangan Budidaya Air Payau (BPBAP) Bangil

² Analis Pengujian Virus pada Laboratorium Penguji BPBAP Bangil

³ Manajer Teknis Laboratorium Penguji BPBAP Bangil

Abstract

The research aim to know the capability of survival life of the infected KHV koi fish that proved with PCR test. The research held from 2003 until 2008, with the method took gill sample from the same fish every 4 months. Result of PCR showed positive KHV in each analysis during 4.5 years. According to the PCR test for KHV that conducted for 4.5 years showed that the result always positive in every test.

Key words : KHV, koi, PCR

Pendahuluan

Koi Herpesvirus (KHV) adalah penyakit yang disebabkan oleh virus yang menyerang ikan Koi (*Cyprinus carpio koi*) dan ikan Mas (*Cyprinus carpio*). Penyakit ini telah mewabah di Israel pada tahun 1998 dan di negara-negara lainnya seperti di Amerika, Eropa dan Asia (Gilad *et al.*, 2004). KHV di Indonesia dimulai di Blitar Jawa Timur pada bulan Maret 2002 akibat masuknya ikan koi impor yang membawa virus KHV, adapun tingkat kematiannya bisa mencapai 80 % – 85 % yang menyebabkan kerugian sekitar 5 milyar rupiah. Penyakit ini menyerang populasi ikan koi dan ikan mas dari berbagai umur dan ukuran baik yang dipelihara di kolam, danau maupun karamba jaring apung (Sunarto *et al.*, 2004).

Mekanisme serangan virus pada tahapan pertama terjadinya infeksi adalah penyerangan (*attachment*) dimana reseptor mulai mengenali virus tersebut pada lapisan membran plasma. Proses berikutnya adalah penetrasi (*penetration*) yaitu masuknya partikel virus ke dalam sel inang (*host*) selanjutnya virus akan melepas bagian luar yang melapisi tubuhnya (*uncoating*) untuk masuk ke dalam membran sel atau saluran lisosom. Berikutnya terjadi proses transkripsi yaitu virus mulai membuat rekaman untuk mRNA yang selanjutnya akan diterjemahkan sebagai protein. Proses selanjutnya DNA virus akan memperbanyak diri (*replication*) untuk kemudian membentuk virion dan apabila telah sempurna akan melepaskan diri keluar dari sel untuk menginfeksi sel yang lainnya (Roberts, 1989).

Gejala yang ditimbulkan oleh serangan KHV yaitu (1) produksi lendir (*mucus*) berlebih

sebagai respon fisiologis terhadap kehadiran patogen, selanjutnya produksi lendir menurun drastis sehingga tubuh ikan terasa kasar; (2) insang berwarna pucat dan terdapat bercak putih atau coklat yang sebenarnya adalah kematian sel-sel insang atau “gill necrosis”, selanjutnya menjadi rusak, geripis pada ujung tepi insang dan akhirnya membusuk. Secara mikroskopis menunjukkan adanya kerusakan jaringan yang serius serta kematian sel yang berat; (3) pendarahan (*hemorrhage*) di sekitar pangkal dan ujung sirip serta permukaan tubuh lainnya; (4) sering pula ditemukan adanya kulit yang melepuh atau bahkan luka yang diikuti dengan infeksi sekunder oleh bakteri, jamur dan parasit; (5) hati berwarna pucat, selanjutnya menjadi rusak; (6) ginjal (*anterior & posterior*) berwarna pucat. Kematian terjadi antara 1 – 5 hari setelah gejala awal dan kematian mencapai 100 % dalam waktu singkat yaitu 5 - 7 hari pada suhu air 22 – 27 °C (Hartman *et al.*, 2004).

Organ yang menjadi target infeksi KHV adalah organ insang, ginjal, otak dan hati karena organ tersebut diduga memiliki prevalensi (populasi virus) lebih tinggi dibandingkan dengan jenis organ lainnya (Taukhid *et al.*, 2005).

Diagnosis penyakit KHV dapat dilakukan dengan melihat gejala klinis, secara histopatologi, mikroskop elektron, isolasi virus dan yang sekarang ini banyak dilakukan yaitu dengan teknologi PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Teknik PCR untuk pengujian virus KHV saat ini telah digunakan lebih dari 10 laboratorium yang ada di Indonesia karena hasilnya dapat diketahui lebih cepat yaitu sekitar 5 (lima) jam, akurat dan tingkat sensitifitasnya tinggi. Kendala yang dihadapi selama ini dalam pengujian

virus KHV dengan teknik PCR adalah pengambilan sampel yang akan digunakan yaitu berupa lamella (lembaran insang) yang berakibat pada kematian Koi sehingga tidak dapat dilakukan upaya penanganan berikutnya, oleh karena itu sebaiknya ada alternatif pengambilan sampel selain insang. Menurut Taukhid *et al.* (2005) menyatakan bahwa hingga kini belum ditemukan teknik sampling yang paling aman (*non-lethal sampling*) untuk diagnosa KHV dengan teknik PCR.

Materi dan Metode Penelitian

Ikan Uji

Ikan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan koi terinfeksi KHV berasal dari Jepang yang dibawa oleh pihak Karantina ke laboratorium Penguji BPBAP Bangil pada tahun 2003. Ikan ini secara visual tidak menunjukkan gejala klinis KHV (kulit melepuh, ekses lendir, insang pucat dan putih kemudian membusuk).

Wadah penelitian dan pemeliharaan ikan uji

Wadah penelitian berupa 3 akuarium kaca dengan berukuran 90 cm x 40 cm x 60 cm masing-masing diisi 1(satu) ekor ikan koi yang terinfeksi KHV dan dilengkapi dengan aerasi. Akuarium ditempatkan pada ruang tertutup sehingga suhu dapat dipertahankan dengan kisaran antara 27 °C – 29 °C.

Penanganan ikan uji

Selama penelitian ikan koi diberi pakan berupa pellet dosis 5% x berat badan per hari dengan frekwensi 2 kali sehari. Kualitas air dijaga dalam kondisi optimal melalui penyiponan dan penggantian air dengan jumlah sesuai kebutuhan. Untuk keperluan pengujian, Ikan koi diambil sedikit insang (bagian ujing) untuk diuji PCR KHV. Setelah ikan uji diambil insangnya, ikan yang terluka karena pengungtingan insang dimasukkan pada wadah tersendiri untuk diberi iodium dan diaerasi kuat untuk menyembuhkan luka. Setelah ikan kembali normal dikembalikan lagi ke tempat pemeliharaan / akuarium semula.

Ikan uji secara berkala 4 bulan sekali diambil sebagian insangnya untuk bahan uji. Pembuktian adanya virus pada ikan koi dilakukan dengan menggunakan metode PCR KHV, Insang diekstraksi menggunakan DTAB-CTAB Solution (IQ 2000) untuk mendapatkan pellet DNA dan menggunakan primer spesifik menurut Gray *et al* (2002) yang telah dimodifikasi oleh Sunarto *et al*

(2002). Kemudian diamplifikasi dengan menggunakan master mix (Promega). Selanjutnya produk PCR dielektrophoresis pada gel agarose, kemudian perendaman dalam ethidium bromide sehingga dapat diamati di atas UV dan diabadikan dengan kamera digital.

Alat dan Bahan

Disetting set (gunting + pinset), *glass ware*, Mikropipet, tube, Mikrotube, tip mikropipet, penggerus, sentrifuge, Vortex, timbangan analitik, hot plate, *waterbath*, *thermalcycler*, *Encluser*, elektrophoresis horizontal, UV transilluminator, kamera digital.

DTAB Solution, CTAB Solution, *Dissolving Solution*, Alkohol 95 % dan 70 %, Chloroform, DEPC ddH₂O, primer KHV 290 bp, PCR Master Mix, Kontrol Positif KHV 290 bp, 6X *Loading Dye*, DNA Marker 100 bp), agarose, ethidium bromide (10 mg/ml), larutan TAE (tris acetate), *tris base*, *glacial acetic acid*, EDTA 0,5 M (pH 8,0), akuades steril.

Tahapan ekstraksi DNA

Insang digunting sebanyak 20 mg selanjutnya dimasukkan ke dalam test tube ukuran 2 ml yang didalamnya sudah dimasukkan 0.6 mLDTAB Solution dan dihancurkan hingga homogen. Diinkubasikan pada suhu 75°C pada *waterbath* selama 5 menit. Kemudian didinginkan pada suhu ruang, setelah itu vortex sebentar dan ditambahkan 0.7 ml *Chloroform* lalu vortex kembali selama 20 detik dan disentrifugasi 12000 rpm selama 5 menit. Supernatan dipindahkan kedalam tube baru ukuran 2 ml dan ditambahkan 100 µl CTAB solution dan 900 µl ddH₂O, lalu divortex kemudian diinkubasi pada suhu 75 °C selama 5 menit pada *waterbath*, setelah itu didinginkan pada suhu ruang dan disentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 10 menit. Kemudian supernatant dibuang, lalu pellet dilarutkan dengan 150 µl *Dissolve Solution*. Lalu diinkubasikan pada suhu 75 °C selama 5 menit. Didinginkan pada suhu ruang dan sentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 5 menit. Supernatant dipindahkan pada tube ukuran 0.5 ml dan ditambahkan 300 µl alkohol 95%, kemudian divortex dan disentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 5 menit, kemudian alkohol dibuang, pellet dicuci dengan 200µl alkohol 70%, lalu diputar pada kecepatan 10000 rpm selama 5 menit. Alkohol dibuang dan pellet dikeringkan setelah itu larutkan pellet dengan DEPC ddH₂O sebanyak 50 µl .DNA siap digunakan,

apabila tidak langsung digunakan maka harus disimpan pada kondisi beku.

Tahapan amplifikasi

Sebelum mencampur reagen, pastikan reagen dalam keadaan cair (jangan sampai ada cairan yang menggumpal/beku) yaitu dengan cara divortex. Komposisi larutan PCR untuk deteksi KHV (25 µl/reaksi) dibuat dengan mencampurkan bahan-bahan sebagai berikut :

Master Mix (<i>Taq DNA Polymerase</i> , <i>dNTP</i> dan <i>MgCl2</i>)	12,5 µL
<i>Nuclease Free Water</i>	9,5 µL
Primer KHV 290-R	1,0 µL
Primer KHV 290-F	1,0 µL
Template DNA ikan	1,0 µL +
Total	25 µL

Setelah semua bahan dicampur (kecuali template DNA), bagikan ke dalam mikrotube 0,2 ml dengan volume masing-masing 24 µl. Tambahkan template DNA, termasuk kontrol positif (dna positif KHV) dan kontrol negatif (ddH₂O), masing-masing sebanyak 1 µl. Vortex sebentar sebelum dimasukkan ke dalam mesin PCR (*Thermalcycler*) . Pastikan bahwa program yang akan dijalankan adalah KHV.

Tabel 1. Suhu pada Thermalcycler PCR

Reaksi	Suhu(°C)	Waktu	Jumlah Siklus
Denaturation	94	1 menit	30
Annealing	55	2 menit	30
Extension	72	3 menit	30
Final Elongation	72	7 menit	2

Tahapan elektroforesis

Tabung yang sudah diamplifikasi disiapkan dan ditambahkan 5 l 6X *Loading dye* pada masing-masing tabung dan mengganti tip mikropipet untuk tiap-tiap pengambilan loading dye. Larutan dicampur hingga homogen. Sebelumnya gel yang sudah dicetak diletakkan di atas tangki elektroforesis lalu tangki diisi dengan larutan TAE 1X sebanyak 500 ml (sampai gel terendam). produk PCR yang sudah dicampur dengan *loading dye* dimasukkan dengan mikropipet ke dalam sumuran gel sebanyak 5 – 10 µL. *Marker* atau penanda DNA yang sudah diketahui berat molekulnya (848 bp, 630 bp, 333 bp) juga dimasukkan sebanyak 5 µl. *Marker* diletakkan di awal atau di akhir deretan sumuran gel. Setelah semua sampel disuntikkan dalam sumuran, tutup electroforesis dipasang dan listrik dihidupkan dengan voltage diatur 120 V selama 30 menit.

Tahapan pengamatan dan dokumentasi

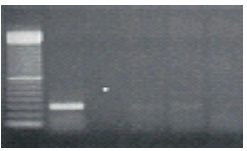
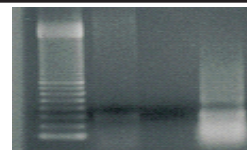
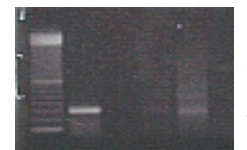
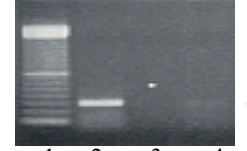
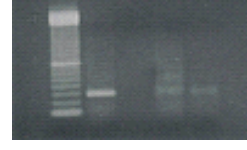
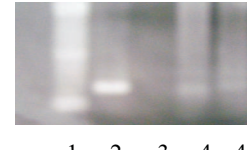
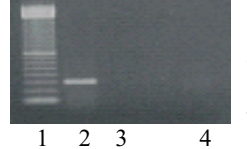
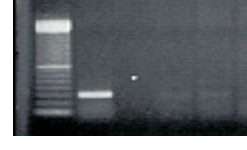
Setelah selesai proses dalam electroforesis, gel diangkat dari electroforesis. Selanjutnya gel direndam dalam larutan Ethidium Bromide (EtBr) 0,05 % selama 4 menit. Setelah itu gel direndam dalam akuades steril selama 10 menit. Terakhir gel diamati di atas UV transilluminator dan dokumentasikan dengan kamera digital.

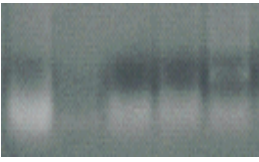
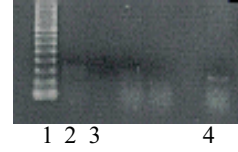
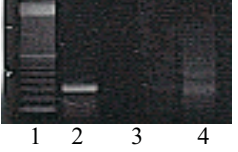
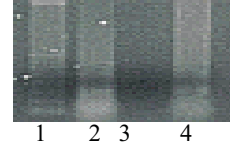
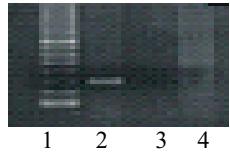
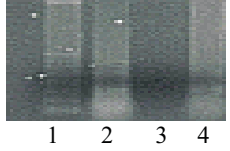
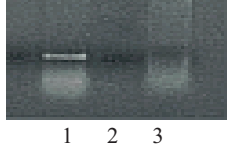
Pembacaan hasil

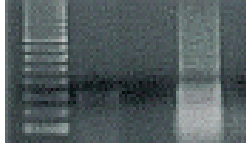
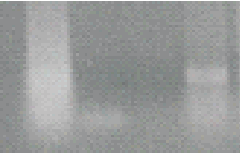
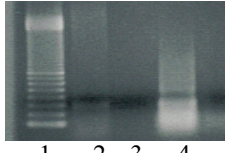
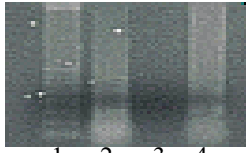

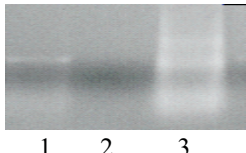
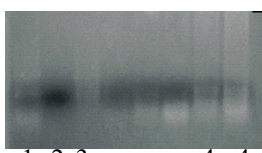
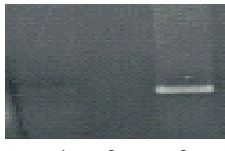
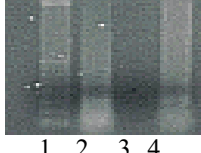
- Hasil positif KHV bila terlihat garis perpendaran pita DNA (band) dengan ukuran 290 bp.
- Hasil negatif bila tidak terlihat garis perpendaran pita DNA (band) pada 290 bp.

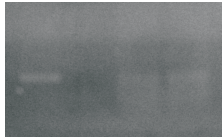
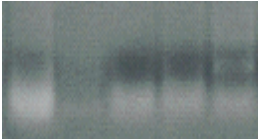
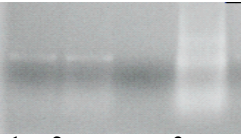
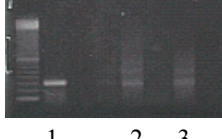
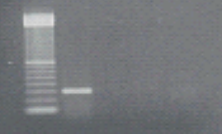

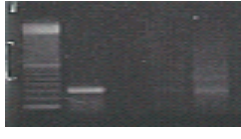
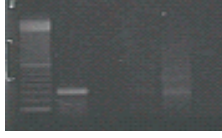
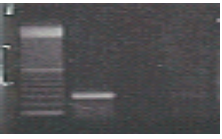
Hasil dan Pembahasan


Tabel 2. Hasil uji PCR untuk masing-masing sampel ikan koi

Tanggal	Organ	Kondisi Ikan	Hasil Uji PCR
24 sep 03	insang	Ikan tidak menunjukkan gejala klinis KHV	 <p>1. Marker 100 bp 2. Kontrol Positif KHV 290 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel (Ak.1) Positif KHV 5. Sampel (Ak.2) Positif KHV 6. Sampel (Ak.3) Positif KHV</p>
14 Jan 04	insang	Ikan tidak menunjukkan gejala klinis KHV	 <p>1. Marker 100 bp 2. Kontrol Positif KHV 290 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel (Ak.1) Positif KHV</p>
			 <p>1. Marker 100 bp 2. Kontrol Positif KHV 290 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel (Ak.2) Positif KHV</p>
			 <p>1. Marker 100 bp 2. Kontrol Positif KHV 290 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel (Ak.3) Positif KHV</p>
12 Mei 04	insang	Ikan tidak menunjukkan gejala klinis KHV	 <p>1. Marker 100 bp 2. Kontrol Positif KHV 290 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel (Ak.1) Positif KHV</p>
			 <p>1. Marker 100 bp 2. Kontrol Positif KHV 290 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel (Ak.2) Positif KHV</p>
			 <p>1. Marker 100 bp 2. Kontrol Positif KHV 290 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel (Ak.3) Positif KHV</p>
15 Sep 04	insang	Ikan tidak menunjukkan gejala klinis KHV	 <p>1. Marker 100 bp 2. Kontrol Positif KHV 290 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel (Ak.1) Positif KHV</p>

17 Jan 05	insang	Ikan tidak menunjukkan gejala klinis KHV	 <p>1. Kontrol Positif KHV 290 bp 2. Kontrol Negatif 3. Sampel(Ak.1) Positif KHV</p>
			 <p>1. Marker 100 bp 2. Kontrol Positif KHV 290 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel (Ak.2) Positif KHV</p>
			 <p>1. Marker 100 bp 2. Kontrol Positif KHV 290 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel (Ak.3) Positif KHV</p>
15 Mei 05	insang	Ikan tidak menunjukkan gejala klinis KHV	 <p>1. Marker 100 bp 2. Kontrol Positif KHV 290 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel (Ak. 1) Positif KHV</p>
			 <p>1. Marker 100 bp 2. Kontrol Positif KHV 290 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel (Ak.2) Positif KHV</p>
			 <p>1. Marker 100 bp 2. Kontrol Positif KHV 290 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel (Ak.3) Positif KHV</p>
15 Sep 05	insang	Ikan tidak menunjukkan gejala klinis KHV	 <p>1. Kontrol positif KHV 290 bp 2. Kontrol negatif 3. Sample (AK.3) Positif KHV</p>

15 Jan 06	irsang	Ikan tidak menunjukkan gejala klinis KHV	 <p>1. Marker 100 bp 2. Kontrol Positif KHV 290 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel (Ak.1) Positif KHV</p> <p>1 2 3 4</p>
			 <p>1. Marker 100 bp 2. Kontrol Positif KHV 290 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel (Ak.2) Positif KHV</p> <p>1 2 3 4</p>
			 <p>1. Marker 100 bp 2. Kontrol Positif KHV 290 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel (Ak.3) Positif KHV</p> <p>1 2 3 4</p>
15 Mei 06	irsang	Ikan tidak menunjukkan gejala klinis KHV	 <p>1. Marker 100 bp 2. Kontrol Positif KHV 290 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel (Ak.1) Positif KHV</p> <p>1 2 3 4</p>
			 <p>1. Marker 100 bp 2. Kontrol Positif KHV 290 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel (Ak.2) Positif KHV</p> <p>1 2 3 4</p>
			 <p>1. Kontrol Positif KHV 290 bp 2. Kontrol Negatif 3. Sampel (Ak.3) Positif KHV</p> <p>1 2 3</p>
15 Sep 06	irsang	Ikan tidak menunjukkan gejala klinis KHV	 <p>1. Marker 100 bp 2. Kontrol Positif KHV 290 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel (Ak.1) Positif KHV</p> <p>1 2 3 4 4</p>
			 <p>1. Kontrol Positif KHV 290 bp 2. Kontrol Negatif 3. Sampel (Ak.2) Positif KHV</p> <p>1 2 3</p>
			 <p>1. Marker 100 bp 2. Kontrol Positif KHV 290 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel (Ak.3) Positif KHV</p> <p>1 2 3 4</p>

15 Jan 07	insang	Ikan tidak menunjukkan gejala klinis KHV	 <ul style="list-style-type: none"> 1. Marker 100 bp 2. Kontrol Positif KHV 290 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel (Ak.1) Positif KHV
			 <ul style="list-style-type: none"> 1. Marker 100 bp 2. Kontrol Positif KHV 290 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel (Ak.2) Positif KHV
			 <ul style="list-style-type: none"> 1. Kontrol Positif KHV 290 bp 2. Kontrol Negatif 3. Sampel (Ak.3) Positif KHV
15 Mei 07	insang	Ikan tidak menunjukkan gejala klinis KHV	 <ul style="list-style-type: none"> 1. Kontrol Positif KHV 290 bp 2. Kontrol Negatif 3. Sampel (Ak.1) Positif KHV
			 <ul style="list-style-type: none"> 1. Marker 100 bp 2. Kontrol Positif KHV 290 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel (Ak2) Positif KHV
			 <ul style="list-style-type: none"> 1. Marker 100 bp 2. Kontrol Positif KHV 290 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel (Ak.3) Positif KHV
15 Sep 07	insang	Ikan tidak menunjukkan gejala klinis KHV	 <ul style="list-style-type: none"> 1. Marker 100 bp 2. Kontrol Positif KHV 290 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel (Ak.1) Positif KHV
			 <ul style="list-style-type: none"> 1. Marker 100 bp 2. Kontrol Positif KHV 290 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel (Ak.2) Positif KHV
			 <ul style="list-style-type: none"> 1. Marker 100 bp 2. Kontrol Positif KHV 290 bp 3. Kontrol Negatif 4. Sampel (Ak.3) Positif KHV

15 Feb 08	insang	Insang tampak putih dan mengeluarkan banyak lendir		<ol style="list-style-type: none"> 1. Kontrol Positif KHV 290 bp 2. Kontrol Negatif 3. Sampel (Ak.1) Positif KHV 4. Sampel (Ak.2) Positif KHV 5. Sampel (Ak.3) Positif KHV
-----------	--------	----------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Dari hasil diatas menunjukkan bahwa ketiga ekor ikan koi uji sejak awal penelitian tgl 24 September 2003 hingga akhir penelitian pada tgl 15 Februari 2008 menunjukkan positif terinfeksi KHV meskipun secara visual tidak menunjukkan gejala klinis.

Kesimpulan

Pada kondisi kualitas air optimal (terkontrol) dengan perlakuan pemberian pakan pellet yang teratur ikan koi yang terinfeksi KHV mampu bertahan hidup selama 4,5 tahun bahkan mungkin lebih.

Ikan koi terinfeksi KHV tidak selalu menunjukkan gejala klinis KHV (kulit melepuh, ekses lendir, insang pucat dan putih kemudian membusuk).

Tetap waspada dengan KHV, karena ikan koi yang telah terinfeksi KHV dapat bersifat carier tetapi secara fisik tidak menampakkan gejala klinis, sehingga dapat menularkan penyakit KHV pada ikan lain dan keturunannya.

Daftar Pustaka

Gray, W.L., Mullis, L., LaPatra, S.E., Groff, J.M. and Goodwin, A. 2002. Detection of Koi Herpesvirus DNA in Tissues of Infected Fish, *Journal of Fish Diseases*. 25:171-178.

Hartman, K. H., Yanong, R.P.E, Petty, B.D, Floyd, R.F, and Riggs, A.C. 2004. Koi Herpesvirus (KHV) Disease, *Journal KHV-PCR/ Koi Herpesvirus (KHV) Disease*.

Roberts, R.J. 1989. *Fish Pathology*. Second Edition. Wyvern Typesetting Ltd, Bristol British.

Sunarto, A. Rukyani, A., Cameron, A., Reantaso, M. dan Subasinghe, R. 2004. Outbreak of Disease Causing Mass Moratlity in Koi and Common Carp (*Cyprinus carpio*) in Indonesia. paper presented in the international Workshop on Koi Herpesvirus, 12 – 13 February 2004, London, England.

Taukhid, A., Komarudin, O., Supriyadi, H. dan Bastiawan, D. 2005. Strategi Pengendalian Penyakit pada Budidaya Ikan Air Tawar. Kumpulan Makalah Strategi Pengelolaan dan Pengendalian Penyakit KHV. Pusat Riset Perikanan Budidaya. Jakarta.