

B/181
2006
95



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan artikel atau tinjauan suatu masalah.
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumpukan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

TITER DOSIS INFEKTIV *KOI HERPESVIRUS* (KHV) DENGAN MENGGUNAKAN KULTUR SEL KT-2 (KOI TAIL NO. 2)

ADHIM MULYANA



FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2006



RINGKASAN

ADHIM MULYANA. **Titer Dosis Infektiv *Koi herpesvirus* (KHV) dengan Menggunakan Kultur Sel KT-2.** Dibawah bimbingan Prof. Dr. drh. Fachriyan Hasmi Pasaribu dan drh. Agus Sunarto, MSc.

Koi herpesvirus (KHV) merupakan virus herpes yang menyerang ikan mas dan koi (*Cyprinus carpio*) dengan tingkat kematian mencapai 80-95%. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui titer KHV dengan cara menghitung *end point* dari *tissue culture infective dose* (TCID₅₀). Virus yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat virus KHV pasase pertama. Virus diencerkan 10 kali secara berseri dalam media L-15, yaitu 10⁰ (stok virus), 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ 10⁻⁵ dan 10⁻⁶. Virus hasil pengenceran diinokulasikan ke dalam mikropate-96 yang berisi kultur sel KT-2 (Koi Tail). Percobaan dilakukan dengan 12 ulangan pada sumbu mikropate. Pengamatan dilakukan selama 7 hari *post* inokulasi. Penghitungan *end point* didasarkan pada ada tidaknya *cytopathic effect* (CPE). Hasil pengamatan menunjukkan pembentukan CPE mulai terlihat pada hari ke-2 *post* infeksi. Nilai titer KHV adalah 10^{3,8}TCID₅₀/ml. Arti penting penemuan ini dalam riset KHV juga dibahas dalam makalah ini.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumpukan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



ABSTRACT

Koi herpesvirus is a herpesvirus, which infects koi and common carp (Cyprinus carpio) with mortality rate up to 80-95%. The aim of this research was to determine titer of KHV using end point of tissue culture infective dose (TCID₅₀) methods. First passage of the virus isolate was used for this research. The virus was 10-fold serially diluted using L-15 media namely 10⁰ (virus stock), 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ and 10⁻⁶. The diluted virus was inoculated onto 96-microplate containing KT-2 (Koi Tail No.2) cell culture. The experiment was performed using 12 duplicates of wells. The growth of the virus in the cell culture was observed for 7 days post inoculation. The determination of end point was based on the development of cytopathic effect (CPE). The results showed that CPE occurred at 2 days post infection. The titer of KHV was 10^{3.8}TCID₅₀/ml. The significant contribution of these findings on the research of KHV was also discussed in this paper.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

© Hak Cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan artikel atau tinjauan suatu masalah.
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



TITER DOSIS INFEKTIV *KOI HERPESVIRUS* (KHV) DENGAN MENGGUNAKAN KULTUR SEL KT-2 (KOI TAIL NO. 2)

ADHIM MULYANA

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan Pada

Fakultas Kedokteran Hewan

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2006**

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan artikel atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Judul skripsi : Titer Dosis Infektiv *Koi Herpesvirus* (KHV) dengan Menggunakan Kultur Sel KT-2 (Koi Tail No. 2)

Penyusun : Adhim Mulyana

NRP : B04101016

Menyetujui,

Prof. Dr. drh. Fachriyan H. Pasaribu
Pembimbing I

Drh. Agus Sunarto, MSc
Pembimbing II

Mengetahui,

Dr. drh. I Wayan Teguh Wibawan, MS.
Wakil Dekan FKH IPB

Tanggal lulus :

09 JUN 2006

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

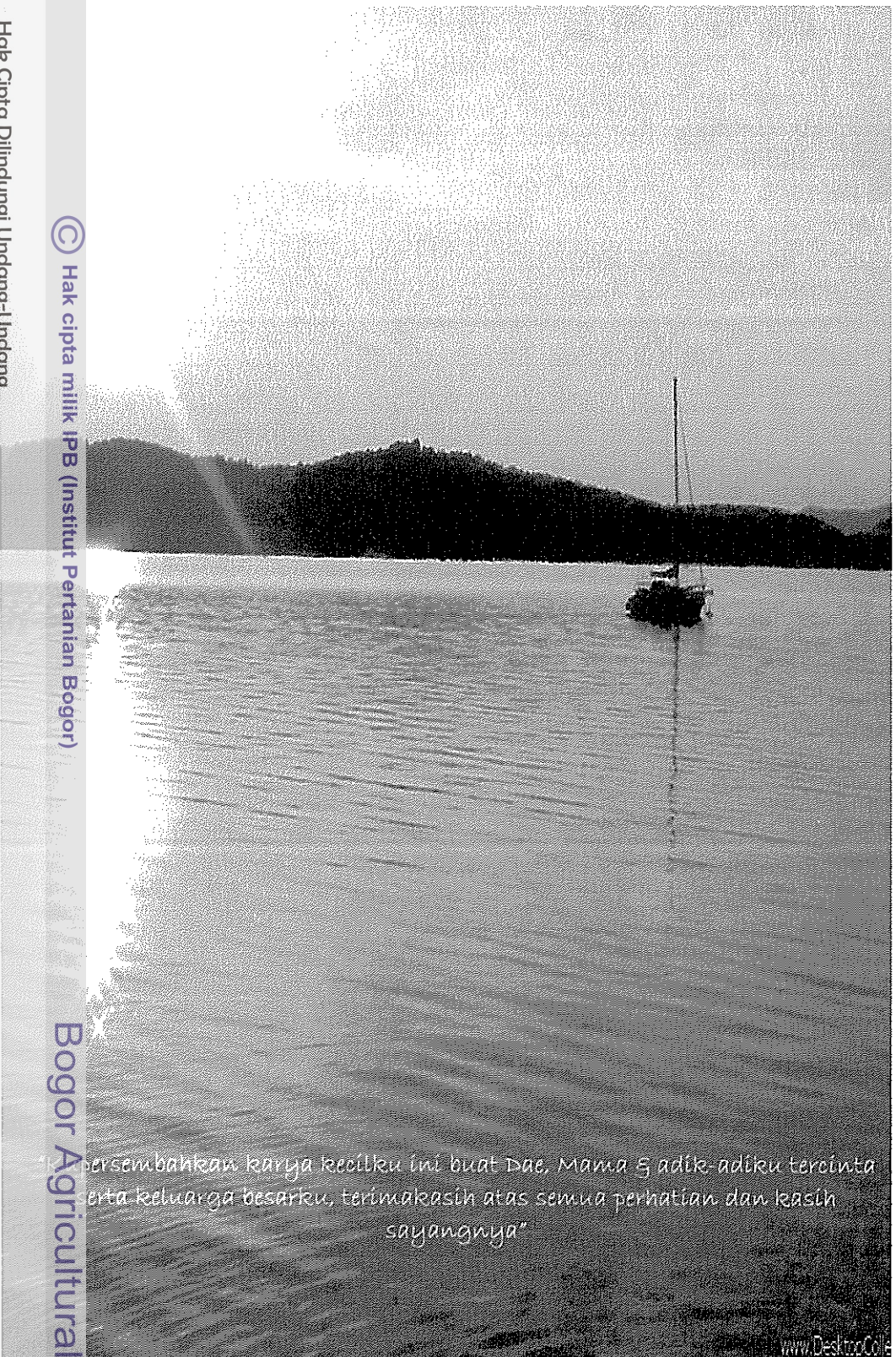
© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan artikel atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Persembahkan karya kecilku ini buat Dae, Mama & adik-adiku tercinta
serta keluarga besarku, terimakasih atas semua perhatian dan kasih
sayangnya"



RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Dompu, Nusa Tenggara Barat pada tanggal 17 Januari 1983 sebagai anak pertama dari tiga orang bersaudara pasangan Bapak M. Yakub Rais dan Ibu Maatu M. Yakub.

Pendidikan sekolah dasar penulis selesaikan di SDN Inpres Kandai I Dompu pada tahun 1995. Selanjutnya penulis meneruskan pendidikan di SLTPN Dompu dan lulus pada tahun 1998. Pendidikan sekolah menengah atas penulis selesaikan di SMU 1 Dompu dan lulus pada tahun 2001.

Penulis diterima di Institut Pertanian Bogor (IPB) pada tahun 2001 melalui jalur SMI (Undangan Seleksi Masuk IPB) sebagai mahasiswa Tingkat Persiapan Bersama (TPB), kemudian pada tahun 2002 penulis mulai menduduki bangku perkuliahan di Fakultas Kedokteran Hewan (FKH) IPB.

Selama menjadi mahasiswa FKH IPB penulis aktif di Badan Eksekutif Mahasiswa (BEM) FKH-IPB sebagai anggota pada tahun 2002-2003. Penulis juga aktif di Himpunan Minat Profesi (Himpro) Ornithologi dan Unggas serta Himpro Ruminansia sebagai anggota pada tahun 2002-2003. Disamping itu penulis juga terdaftar sebagai anggota Forum Ilmiah Mahasiswa (FIM) dan HMI (Himpunan Mahasiswa Islam).

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



PRAKATA

Puji dan syukur penulis haturkan ke hadirat ALLAH SWT. Atas berkat rahmat dan hidayah-Nya, penulisan skripsi dengan judul “*Tissue Culture Infektive Dose (TCID₅₀) Koi Herpesvirus* dengan Menggunakan Kuktur Sel KT-2”. Tugas akhir ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar kesarjanaan di Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.

Shalawat dan Salam senantiasa tercurahkan kepada Suri Tauladan kita Nabi Muhammad SAW beserta keluarga, sahabat, dan para pengikutnya.

Terima kasih penulis ucapkan sebesar-sebesarnya kepada :

1. Prof. Dr. drh. Fachriyan Hasmi Pasaribu selaku dosen pembimbing skripsi yang telah banyak memberikan pengarahan, koreksi dan saran dalam penelitian dan penyusunan skripsi.
 2. Drh. Agus Sunarto, MSc. selaku dosen pembimbing skripsi yang telah memberikan banyak ilmu, kesempatan, motivasi dan inspirasi.
 3. Dr. Nastiti Kusumorini, selaku dosen pembimbing akademik.
 4. Dr. drh. Surachmi Setianingsih. selaku dosen penilai skripsi.
 5. Mama dan Dae-koe tercinta, adik-adikku Agus dan Ayu Mutmainnah serta keluarga besar yang telah memberikan dukungan moril dan materil.
 6. Seluruh staf Laboratorium Riset Kesehatan Ikan (LRKI), Sempur, Bogor telah banyak membantu memberikan informasi demi terselesaikannya tugas skripsi ini.
 7. Unit Virologi LRKI, terutama mbak Tuti yang telah banyak mencurahkan perhatian, waktu dan tenaga selama penelitian.
- Teman-teman sepenelitian, Ali Rizqi, Rudi, Ija, terima kasih atas kebersamaan dan semangat yang telah diberikan.
- Teman-teman Wisma Hattori (Abah, Udel, Agus, Cecep, Gunawan, Dedi, Rezi, Rizqi, Jemix, Nur, Rizal dan Heru.
- Teman-teman terbaikku (Efi, Adi, Ewi', Rini, Ica, Rury, Erwin, dan Rita)
- Gastro 38, terima kasih atas kebersamaan dan kekompakannya.
- Semua pihak yang telah membantu dalam penulisan skripsi ini.



Penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari kesempurnaan, tetapi penulis berharap tulisan ini dapat memberikan warna baru dalam khasanah bidang veteriner terutama virologi ikan. Diluar kekurangan yang ada, penulis juga berharap tulisan ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang memerlukannya. Untuk itu penulis sangat mengharapkan semua kritik dan saran yang bersifat membangun demi kesempurnaan karya ini.

Penulis

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI.....	i
DAFTAR TABEL.....	ii
DAFTAR GAMBAR.....	iii
PENDAHULUAN	
Latar Belakang.....	1
Tujuan Penelitian.....	4
Manfaat Penelitian.....	4
TINJAUAN PUSTAKA	
Ikan Koi.....	5
Asal usul.....	5
Klasifikasi	5
Ciri-ciri.....	6
Sel dan Sel KT-2.....	7
Kultur Sel.....	9
Virus Herpes.....	11
Klasifikasi.....	11
Struktur.....	11
Replikasi.....	12
<i>Koi Herpesvirus</i>	14
Sejarah.....	14
Infeksi oleh KHV.....	15
Gejala klinis.....	17
Pengobatan.....	17
Diagnosa.....	18
MATERI DAN METODE	
Waktu dan Tempat Penelitian.....	19
Bahan dan Alat.....	19
Metodologi.....	20
Persiapan dan pembuatan media.....	20
Penanaman sel.....	20
Penyiapan isolat virus.....	20
Pengenceran virus.....	21
Inokulasi virus.....	22
Pengamatan CPE dan penghitungan titer virus.....	22
HASIL DAN PEMBAHASAN.....	24
KESIMPULAN DAN SARAN.....	33
DAFTAR PUSTAKA.....	33
LAMPIRAN.....	34

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Pembentukan <i>cytopathic effect</i> (CPE) pada kultur sel KT-2.....	27
Tabel 2. Hasil eveluasi <i>cytopathic effect</i> (CPE) pada kultur sel KT-2.....	28

- Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
 2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Foto kultur sel KT-2 hari ke-1 setelah inokulasi KHV	24
2. Foto kultur sel KT-2 hari ke-3 setelah inokulasi KHV.....	25
3. Foto kultur sel KT-2 hari ke-5 setelah inokulasi KHV.....	26
4. Foto kultur sel KT-2 hari ke-7 setelah inokulasi KHV.....	27

Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

- Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan brosur atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Ikan koi merupakan komoditi perikanan yang sudah dikenal luas baik domestik maupun internasional. Ikan koi ini berada dalam naungan genus yang sama dengan ikan mas. Ikan mas dikenal sebagai sumber protein hewani yang relatif murah dan mudah didapat, sementara ikan koi lebih dikenal sebagai ikan hias dengan berbagai variasi warna yang menarik.

Karena nilai estetika yang dimiliki oleh ikan koi menjadikan dia sebagai komoditi yang prospektif untuk dikembangkan. Ikan koi di Jepang lebih dikenal dengan nama *Nishikigoi*. Ikan koi merupakan ikan hias air tawar yang memiliki bentuk badan seperti torpedo dengan berbagai zat warna dan termasuk golongan *omnivora*. Selain keragaman warna, pola serta bentuk tubuh yang unik ikan koi juga tergolong ikan yang memiliki ketahanan terhadap perubahan pada kondisi lingkungan. Kesehatan dan penyakitnya ditentukan oleh keseimbangan antara kepadatan ikan, air, kondisi lingkungan dan parasit serta kondisi ikan itu sendiri (Effendy dan Hersanto 1993).

Ikan mas merupakan komoditas terbesar budidaya ikan air tawar dengan rata-rata produksi 72.000 ton per tahun. Setengah dari produksi ini disumbangkan oleh Jawa Barat. Tetapi produksi ikan mas dan ikan koi menurun sejak terjadi kematian masal pada ikan mas karena serangan penyakit *Koi herpesvirus* (KHV) pada bulan maret 2002 (Departemen Kelautan dan Perikanan 2004).

Di Indonesia, penyakit KHV pertama kali terjadi pada ikan koi pada bulan Maret 2002 di Blitar, Jawa Timur dengan kerugian materi yang menimpa

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

pembudidaya ikan koi diperkirakan mencapai lebih dari 5 milyar rupiah. Sejak saat itu hingga pertengahan Juni 2002, aktivitas perdagangan ikan hidup dari satu daerah ke daerah lain berlangsung tanpa pengawasan, termasuk ke luar Pulau Jawa.

Gejala awal yang ditimbulkan oleh virus ini tidak terlalu nyata, karena virus langsung menyerang bagian dalam tubuh ikan. Serangan yang bersifat akut berakibat kematian yang bersifat fatal pada populasi ikan. Gejala klinis ikan yang terinfeksi akan terlihat lemah, ditunjukkan dengan kehilangan keseimbangan dan kesulitan menghirup udara. Gejala klinis umum yang terlihat adalah terjadinya pengelupasan *epithelium* dengan produksi mukus yang berkurang dan kulit terasa kasar, hemorhagi pada *operculum*, sirip, ekor dan perut yang disertai kerusakan pada insang. Beberapa ikan yang sakit memperlihatkan gejala lepuh-lepuh pada kulit yang disebut juga “penyakit melepuh” di Indonesia. Selama wabah KHV berlangsung, telah banyak diamati dan dilaporkan terjadi variasi gejala klinis (Rukyani dan Sunarto 2003).

Kematian akibat serangan penyakit ini bisa mencapai 80-95%. Pada bulan April 2002, wabah ini menyerang ikan koi dan ikan mas di Subang, Jawa Barat. Gejala klinis penyakit pada ikan mas di Subang sama dengan gejala klinis pada ikan koi di Blitar. Setiap hari puluhan ton ikan mas dari Cirata dikirim ke Sumatera, sehingga pada bulan Februari 2003 wabah KHV akhirnya menyebar ke Lubuk Linggau, Sumatera Selatan. Dari Sumatera Selatan, wabah ini terus menyebar ke arah barat melalui Jambi dan sampai di Sumatera Barat pada bulan Juli 2004 dan Sumatera Utara pada bulan Oktober 2004. Di Danau Toba saja, wabah ini menyebabkan kerugian hingga Rp. 34 milyar. Penyakit ini juga



mewabah di Mandiangin, Kalimantan Selatan karena kontaminasi induk ikan mas yang terkontaminasi KHV dari Puntan, Jawa Timur.

Usaha bersama sedang dilakukan untuk mengantisipasi masalah penyakit tersebut kedepan dengan memperbaiki sistem impor, ekspor, pengiriman ikan hidup ke dan dari Indonesia. Setiap impor ikan dan produk perikanan diwajibkan melalui prosedur IRA (Import Risk Analysis) dan karantina, termasuk di dalamnya sertifikat yang menyatakan status kesehatan ikan. Sesuai dengan Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan no. 28 tahun 2003 yang melarang pengiriman ikan mas dan ikan koi keluar pulau Jawa serta penghentian impor ikan mas dan koi dari luar, dan juga Keputusan Menteri Kelautan dan perikanan no. 40 tahun 2003 yang menyatakan bahwa pulau Jawa dan Bali merupakan daerah terjangkit dan semua aktifitas pengiriman ikan mas dan ikan koi hanya diperbolehkan bila berasal dari negara bebas KHV dan dilengkapi sertifikat status kesehatan ikan (Rukyani dan Sunarto 2003).

Pendeteksian kasus KHV di lapangan relatif sulit dilakukan karena infeksiya yang bersifat laten dengan gejala klinis yang mirip infeksi bakteri *Flavobacterium columnare*, yaitu kerusakan insang. Diagnosa laboratoris dilakukan dengan bermacam cara, antara lain isolasi virus dengan kultur sel, identifikasi melalui histopatologis, mikroskop elektron dan *polymerase chain reaction* (PCR). Teknik lain yang juga dilakukan adalah teknik kohabitasi yaitu dengan mencampur ikan sakit dengan ikan sehat dalam kurun waktu tertentu dan teknik infeksi buatan melalui penyuntikan partikel virus KHV. Pada teknik kohabitasi, rasio ikan sakit dan ikan sehat adalah 1 : 4-8 dalam waktu 7-10 hari.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Teknik yang saat ini tengah dikembangkan adalah pendeteksian KHV dengan menumbuhkan virus pada sel ikan koi secara *in vitro*. Sel kultur yang digunakan untuk isolasi virus ini adalah sel KT-2 yang berasal dari organ ekor ikan koi. Namun demikian, sampai saat ini belum dilakukan penelitian tentang TCID₅₀ KHV pada kultur sel KT-2.

TCID₅₀ merupakan metode penghitungan virus secara titrasi berdasarkan infeksi vitas dengan menggunakan kultur jaringan (*tissue culture*/TC). Titer virus ini ditentukan dengan menghitung *end point* dari pengenceran virus yang menyebabkan kerusakan 50% dari sel yang dicirikan adanya *cytopathic effect* (CPE). *End point* tidak dapat diukur hanya berdasarkan data secara langsung, sehingga digunakan penghitungan secara matematika dengan metode Reed and Muench (1938).

Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui titer KHV pada kultur sel KT-2 dengan menghitung *end point* dari *tissue culture infective dose* (TCID₅₀).

Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini dapat mengetahui titer dosis infektiv KHV sehingga kedepannya menjadi standar dalam pembuatan vaksin .

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

TINJAUAN PUSTAKA

Ikan Koi

Asal usul

Nishikigoi adalah sebutan untuk ikan karper yang diberikan oleh orang Jepang. Koi adalah kata dalam bahasa Jepang berarti ikan mas atau ikan karper. Ikan koi bukan ikan asli dari Jepang, menurut asal usulnya merupakan turunan dari ikan karper liar yang berasal dari Asia Timur, daerah Persia. Karper liar oleh orang Jepang disebut koi, walaupun sekarang kata koi digunakan untuk menyebut semua jenis karper yang berwarna maupun yang liar.

Ikan koi banyak dibudidayakan dan dikembangkan di negara Jepang. Koi mula dikenal oleh masyarakat Jepang khususnya di daerah Nigata sekitar 160 tahun silam. Ikan koi yang asal mulanya berupa ikan karper hitam ini berangsur-angsur terus berkembang biak dengan mutasi alam atau dengan kawin silang, maka seperti sekaranglah ikan koi ini (Effendy dan Hersanto 1993).

Klasifikasi

Klasifikasi ikan koi (*Cyprinus carpio*) menurut Saanin (1984) adalah sebagai berikut:

Phylum	: Chordata
Subphylum	: Vertebrata
Class	: Pisces
Sub Class	: Teleostei
Ordo	: Ostariophysi
Subordo	: Cyprinoidea

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Family : Cyprinidae
 Subfamily : Cyprininae
 Genus : *Cyprinus*
 Species : *Cyprinus carpio*

Ciri-ciri

Ikan koi merupakan raja dari ikan air tawar, mempunyai ukuran tubuh besar dan berwarna sangat bervariasi. Dalam populasi menunjukkan kehidupan yang damai, tidak beringas, mudah berdampingan dengan jenis yang lain apabila berada dalam satu tempat serta mampu menyesuaikan diri dengan lingkungannya. Dengan gerakannya yang sangat simpatik dan pola warna-warni tubuhnya sangat mengagumkan, sehingga memunculkan anggapan bahwa ikan ini membawa keberuntungan bagi si pemiliknya (Effendy dan Hersanto 1993).

Ikan koi memiliki ciri-ciri yaitu badannya yang memanjang, pipih dibagian samping, dan mudah dibedakan antara ikan koi jantan dan betina, terlihat apabila sifat kelamin sekunder sudah terlihat jelas, dapat diamati pada kelamin luarnya. Ikan koi jantan, lubang genital terletak di belakang genital papila dan tidak menonjol letaknya. Ujung papila memiliki lubang untuk pengeluaran urine dan sperma. Sedangkan ikan koi betina memiliki lubang genital di depan genital papila yang terlihat menonjol. Lubang pengeluaran urine dan telur terletak di ujung papila. Tubuh ikan betina lebih gemuk dibandingkan dengan ikan koi jantan pada umur yang sama (Hardjamulia 1978).

- Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Sel dan sel KT-2

Sel merupakan unit dasar makhluk hidup secara struktural maupun fungsional. Semua makhluk hidup (hewan, tumbuhan maupun protista) terdiri atas sel dan sekretanya. Pada makhluk hidup yang bersel tunggal, sel melaksanakan fungsi kehidupan yang setara dengan makhluk hidup bersel banyak dan mampu berkembang biak. Pada makhluk hidup yang bersel banyak setiap sel melaksanakan fungsi kehidupan masing-masing, akan tetapi secara keseluruhan sel-sel berfungsi secara terpadu. Sel-sel tersebut memiliki ukuran, bentuk, komposisi organel serta peranan dan fisiologi yang sangat berbeda (Sugiri 1992).

Sel hewan itu sendiri merupakan struktur yang teratur secara sempurna yang dibungkus oleh membran sel. Dalam sel terdapat sejumlah perangkat yang ditata dengan sempurna antara lain: inti, mitokondria, lisosom, aparatus golgi, badan inklusi, sentriol dan selebihnya adalah sitoplasma (Malole 1990).

Berbagai fase pertumbuhan dan pembelahan sel disebut daur sel. Satu daur sel terjadi dalam satu jangka waktu generasi. Petunjuk utama dari daur sel adalah replikasi DNA nukleus dan penyebarannya (distribusi) dalam sel-sel turunananya. Seluruh daur sel sebagian besar sel hewan maupun tumbuhan berlangsung sekitar 10 sampai 25 jam dan 1 jam dipergunakan untuk fase mitosis. Daur pertumbuhan populasi dapat dibagi menjadi beberapa fase, yaitu fase pertumbuhan lambat, fase pertumbuhan eksponensial, fase pertumbuhan stasioner dan fase kematian.

Fase pertumbuhan lambat, jika sel dibiakkan dalam suatu medium nutrisi yang menguntungkan pertumbuhan dan multiplikasinya, maka pada awal daur pertumbuhan populasi, jumlah sel tidak meningkat. Fase pertumbuhan eksponensial, jika sejumlah sel dibiakkan bersama dalam biakan yang disebut



“batch kultur”, maka masing-masing sel akan terdapat dalam berbagai tahapan daur sel. Peningkatan jumlah sel dalam biakan tersebut sesuai dengan waktu, sebanding dengan jumlah sel yang ada. Fase stasioner, jika sel tumbuh dalam suatu medium dengan ukuran dan isi tertentu, maka pertumbuhan tidak dapat berlangsung secara terus menerus. Pada suatu saat nutrien dalam medium itu habis, dan limbah metabolisme yang merugikan akan terakumulasi dalam konsentrasi yang tinggi dalam medium. Fase kematian, setelah kultur dalam keadaan stasioner, maka kultur tersebut masuk dalam fase kematian atau penurunan. Pada fase ini sel yang lenyap karena mati akan didegradasi jumlahnya lebih besar dibanding dengan penambahan jumlah sel karena pembelahan. Penyebab utama fase kematian ini adalah habisnya media dalam medium (Sugiri 1992).

Pembelahan sel merupakan suatu proses selular yang paling fundamental dan karena itu sangat penting untuk diketahui oleh mereka yang berkecimpung dalam kultur jaringan. Inti yang sebenarnya berperan penting dan pembelahan kemudian diikuti oleh sitoplasma. Ada tiga macam pembelahan inti yaitu amitosis, mitosis, dan meosis. Pada amitosis terjadi pembelahan inti sel tanpa pembentukan kromosom karena proses amitosis tidak umum terjadi maka tidak ada manfaatnya menganalisa proses tersebut dalam hubungannya dengan kultur jaringan. Mitosis dan meosis ditandai dengan terlihatnya kromosom yang terpisah dalam dua kelompok dan masing-masing pergi ke sel anak. Tipe pembelahan mitosis ini berlaku pada sel somatik dan pada sel kultur jaringan. Proses pembelahan sel pada sel somatik terjadi melalui lima tingkat yaitu: fase interfase, fase profase, fase metafase, proses anafase dan fase telofase (Malole 1990).

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Sel KT-2 yang digunakan dalam penelitian ini telah mencapai konfluensi lebih dari 80%. Sel ini dibuat dan dikarakterisasi oleh Antoni (2005), dan diketahui bahwa jenis sel ini termasuk sel fibroblas. Sampai saat ini sel KT-2 telah dipasase sampai 22 kali pasase dengan jarak tiap pasase kurang lebih dua minggu (Sunarto *et al.* 2005c).

Kultur Sel

Kultur sel adalah kultur sel-sel yang berasal dari organ atau jaringan yang telah diuraikan secara mekanis dan atau secara enzimatis menjadi suspensi sel. Suspensi sel tersebut dibiakkan menjadi satu lapisan jaringan (*monolayer*) diatas permukaan yang keras (botol, tabung dan cawan) atau menjadi suspensi sel dalam media penumbuh. Teknik ini disebut sub kultur atau pasase. Apa bila di pasase terus menerus maka di hasilkan sel lestari (*cell line*). Dengan demikian kultur jaringan hewan berarti pertumbuhan atau pemeliharaan sel, jaringan atau organ *in vitro* yang berasal dari hewan. Tetapi kultur sel secara definitive berarti pertumbuhan atau pemeliharaan sel secara *in vitro* yang berasal dari hewan (Malole 1990).

Pada dasarnya ada 2 tipe kultur sel yaitu kultur sel primer dan kultur sel sekunder. Kultur sel primer adalah kultur sel pertama kali *in vitro* dimana sel masih mempunyai karyotipe yang sama dengan jaringan asal (*parent*) yang normal atau abnormal. Jadi, jumlah kromosom masih sama dengan jumlah kromosom jaringan asal dan kromatin sex masih dipertahankan. Kultur sel primer terdiri dari berbagai tipe sel dan dalam beberapa hal hanya mampu di pasase beberapa kali. Pertumbuhan sel secara *in vitro* membutuhkan sejumlah media untuk pertumbuhannya, sejumlah bahan nutrisi tertentu hanya dapat menunjang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



2. Dilarang mengemukakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

pertumbuhan sejumlah sel tertentu, ini berarti jumlah dan kualitas bahan nutrisi yang tersedia dalam media menentukan jumlah sel yang dapat ditumbuhkan dalam media tersebut (Sugiri 1992).

Media penumbuh dalam kultur harus menyediakan semua kondisi lingkungan yang sama dengan keadaan sel secara *in vivo* agar sel dapat bertahan hidup berkembang biak dan berdiferensiasi. Medium ekstraseluler tersebut harus memenuhi kebutuhan esensial untuk hidup dan berkembang biak yaitu bahan nutrisi, hormon dan unsur lainnya. Diantara cairan sel yang terbukti dapat memenuhi kebutuhan sel diluar tubuh adalah serum. Walaupun kebutuhan nutrisi untuk pertumbuhan secara optimum telah terpenuhi oleh media buatan, serum masih diperlukan sebanyak 5-20% dalam medium. Serum merupakan campuran yang kompleks dari berbagai biomolekul yang kecil maupun yang besar yang memiliki berbagai aktivitas pendorong dan penghambat pertumbuhan yang berada dalam keseimbangan fisiologis. Sejumlah komponen serum diketahui telah mendukung daya hidup dan pertumbuhan beberapa sel mamalia dalam kultur. Fungsi utama serum adalah sebagai faktor hormonal yang menstimulasi pertumbuhan dan aktivitas sel, faktor pembantu terjadinya perlekatan sel dan penyebarannya serta sebagai protein pembawa hormon, mineral, lemak dan lainnya (Malole 1990).

Pada pengkulturan sel, teknik aseptik harus selalu diterapkan untuk menghindari adanya kontaminasi. Penggunaan antibiotik saja tidak cukup untuk mengeliminasi mikroorganisme yang ada, karena banyaknya sumber kontaminan yang tidak terjangkau oleh antibiotik seperti pekerja, lingkungan dan udara yang terkontaminasi oleh bakteri, kapang dan spora. Oleh karena itu semua peralatan



dan bahan yang berhubungan dengan kultur sel harus steril dan semua kegiatan diatur sedemikian rupa sehingga tidak terjadi kontak antara kultur sel dengan lingkungan yang tidak steril.

Virus Herpes

Klasifikasi

Virus herpes tersebar luas dialam, selain anggotanya yang menyerang manusia, banyak pula ditemukan virus herpes yang menyerang hewan. Dari sekitar 100 spesies anggota virus herpes saat ini, delapan diantaranya menyerang manusia dan beberapa lainnya bersifat zoonosis (Daili dan Makes 2002).

Menurut Fenner *et al.* (1993), klasifikasi dari *Herpesviridae* (Herpesvirus) yaitu

Famili : *Alphaherpesvirus*

Genus : *Simplexvirus*

Genus : *Varicellovirus*

Famili : *Betaherpesvirus*

Genus : *Cytomegalovirus*

Genus : *Murocytomegalovirus*

Famili : *Gammaherpesvirus*

Genus : *Lymphocryptovirus*

Genus : *Rhadionovirus*

Struktur dan komposisi

Virus herpes merupakan virus yang berukuran besar dibandingkan dengan virus yang lain. Secara morfologik, anggota virus herpes mempunyai struktur

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



yang serupa. Morfologik struktur virus herpes dari arah dalam ke luar terdiri dari genom DNA untai ganda linear berbentuk *toroid*, kapsid, lapisan *tegumen* dan selubung. Kapsid terdiri atas protein yang tersusun dalam simetri *ikosaedral*.

Tegumen yang terdapat diantara kapsid dan selubung merupakan massa fibrous dengan ketebalan bervariasi dan seringkali asimetrik. Selubung, jika dilihat dibawah mikroskop elektron tampak seperti susunan tiga lapis. Sebagian selubung berasal dari membran sel yang diinfeksi, karena dalam selubung terkandung unsur lipid, virus herpes menjadi sensitif terhadap pengaruh detergen dan pelarut lipid lainnya (Daili dan Makes 2002).

Dari selubung keluar tonjolan-tonjolan yang disebut *spike* yang jumlahnya lebih banyak dibandingkan dengan virus yang berselubung lainnya. Tonjolan tersebut tersusun atas glikoprotein dengan panjang tonjolan berkisar antara 8 nm. Jumlah dan jenis glikoprotein selubung virus herpes bervariasi (Daili dan Makes 2002).

Virion herpesvirus beramplop dan berdiameter sekitar 150 nm. Genom DNA dibungkus oleh infibrosa serupa kumparan yang berbentuk busur dan tampak dikelilingi oleh serabut yang berpangkal pada bagian dalam dari kapsid yang mengelilinginya dan melewati lubang dari busur. Kapsidnya merupakan ikosaedron, berdiameter 100 nm, terdiri dari 12 kapsomer. Disekeliling kapsid terdapat lapisan materi globuler, dikenal sebagai pelindung yang dibungkus oleh amplop lipoprotein (Fenner *et al.* 1993).

Replikasi

Virus herpes bereplikasi dalam metabolisme sel inang dengan menggunakan asam nukleatnya. Virus yang menempel pada induk semang akan

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



masuk ke metabolisme induk semang dan keluar dari sel induk semang dengan merusak membran plasma (Sugiri 1992).

Virus masuk ke dalam sel melalui fusi antara glikoprotein selubung virus dengan reseptornya yang terdapat di membran plasma. Reseptor dari *cytomegalovirus* dapat berupa *heparan sulfate*, amino peptidase dan glikoprotein membran plasma lainnya. Selanjutnya, nukleokapsid pindah dari sitoplasma ke inti sel. Setelah kapsid rusak, genom virus kemudian dilepas di dalam inti sel. Genom DNA yang tadinya linear segera berubah menjadi sirkuler. Sebagian gen langsung ditranskripsikan dan produk RNA-nya dipindahkan ke sitoplasma untuk bersama ribosom sel ditranslasikan membentuk kelompok protein alfa. Kelompok protein ini kemudian pindah lagi ke inti sel untuk memfasilitasi transkripsi gen penyandi protein beta, terjadi transkripsi dan translasi *latenes* menjadi protein gamma. Jumlah jenis protein yang disandi lebih dari 50, banyak diantara protein alfa dan beta merupakan enzim dan protein lain yang akan berikatan dengan DNA genom virus (Daili dan Makes 2002).

Transkripsi DNA virus terjadi sepanjang siklus replikasi di dalam sel dengan bantuan enzim RNA polimerase sel dan protein virus lain. Transkripsi dalam bentuk DNA virus selanjutnya dirakit menjadi virion pada membran inti sel. Pelepasan virion dari sitoplasma keluar inti sel terjadi melalui struktur tubuler atau melalui proses eksositosis vakuola yang berisi virion (Sugiri 1992).

Diluar sel yang peka, partikel virus atau virion tidak bisa melakukan metabolisme, itu merupakan fase transmisi dari virus. Fase transmisi diluar sel ini disebabkan oleh fase reproduksi di dalam sel, ketika itu virus terdiri atas gen virus aktif yang dengan menggunakan sistem metabolisme inangnya menghasilkan

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumpukan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



genom turunan dan protein virus yang baru. Disamping itu tidak seperti mikroorganisme bersel tunggal lain, virus hanya bisa berbiak jika hanya asam nukleat dari genom virus yang masuk ke dalam sel, berarti asam nukleatnya saja juga infeksi. Sebaliknya pada semua tingkatan siklus hidup organisme non virus terdiri atas sel yang dikelilingi oleh membran sel dan mempunyai sistem metabolisme lengkap dan mandiri yang mencakup mitokondria dan ribosom (Fenner *et al.* 1993).

Koi Herpesvirus (KHV)

Sejarah

KHV (*Koi herpesvirus*) merupakan salah satu penyakit infeksius yang menyerang spesies *Cyprinus carpio* yaitu ikan mas dan ikan koi yang disebabkan oleh DNA virus. Penyakit ini pertama kali dilaporkan tahun 1998 dan telah dikonfirmasi terjadi di Israel tahun 1999. Sejak itu kejadian kasus dilaporkan berlanjut di Amerika Serikat, Eropa dan Asia. Kerugian ekonomi yang dialami akibat kematian ikan yang disebabkan oleh penyakit ini di Israel mencapai empat juta dollar Amerika (OATA 2001).

Di Indonesia, penyakit KHV pertama kali terjadi pada ikan koi di Blitar, Jawa Timur pada bulan Maret 2002 (Sunarto *et al.* 2005a). Ikan koi yang berasal dari China ini masuk ke Surabaya melalui Hongkong pada bulan Desember 2001 dan Januari 2002. Dari Surabaya, ikan ini selanjutnya dibawa ke Blitar dan mulailah terjadi kematian masal (80-95%). Sekitar akhir April 2002, terjadi kematian pada *common carp* di Subang serta bulan Mei 2002 wabah KHV terjadi di semua budidaya ikan mas di daerah Cirata, Jawa Barat (Sunarto *et al.* 2005a).



Wabah KHV terjadi di daerah Lubuk Linggau, Sumatera Selatan pada bulan Februari 2003 dengan gejala yang di timbulkan sama seperti yang diobservasi pada *commom carp* di pulau Jawa. Kemudian wabah terus menyebar di propinsi sekitarnya termasuk Bengkulu dan Jambi (Sunarto *et al.* 2005). Wabah KHV di Indonesia sampai saat ini telah menyebar sampai ke Bali (Denpasar), Jawa Timur (Banyuwangi, Tulungagung, Blitar, Malang, Kediri, Surabaya), Jawa Tengah (Semarang, Brebes), Jawa Barat (Subang, Bogor, Bandung, Purwakarta, Cianjur, Bekasi), Banten, Sumatera (Lampung, Bengkulu dan Sumatera Selatan) (Rukyan dan Sunarto 2003).

Penyebaran yang cepat oleh KHV diduga berhubungan dengan adanya perdagangan ikan koi antara negara, pameran atau pertunjukan ikan koi internasional. Sejak meluasnya wabah KHV, mulai diberlakukan uji kesehatan dan sertifikasi ikan. Inspeksi ikan sebelum pengiriman atau di farm koi dapat mencegah penyebaran yang meluas.

Infeksi oleh KHV

Koi Herpesvirus yang menyerang golongan jenis ikan mas dan koi dengan tingkat kematian mencapai 80-90%. Penyebaran penyakit ini adalah melalui kontak langsung antara ikan yang sehat dengan ikan yang sakit, kontaminasi air dan peralatan. Virus ini bersifat laten dan aktif pada keadaan tertentu seperti stres dari transportasi dan penanganan serta pergantian lingkungan dan fluktuasi temperatur (Sunarto *et al.* 2005a).

Virus KHV ini berbeda dengan virus herpes yang di temukan terlebih dahulu pada ikan mas yaitu *Cyprinid Herpesvirus* (CHV). Ciri-ciri CHV telah di observasi oleh Schubert (1996) dengan menggunakan mikroskop elektron

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



kemudian diisolasi dan karakteristik secara menyeluruh dilaporkan oleh Sano *et al.* (1985). CHV menyebabkan papiloma pada kulit atau lesio cacar pada ikan yang lebih tua dan bersifat sistemik serta menimbulkan infeksi yang mematikan pada ikan koi dan ikan mas kurang dari umur 2 minggu (Sano *et al.* 1991).

Secara morfologi KHV termasuk golongan Herpes virus yaitu virus yang berbentuk *Hexagonal* dengan diameter 110 nm. Karena termasuk virus Herpes, virus ini dapat sebagai *carrier* yang timbul kembali disaat kondisi ikan stres. Studi komparatif menunjukkan bahwa KHV dari Indonesia mempunyai persamaan 99,65% sekuen DNA dengan KHV dari Amerika Serikat (Sunarto *et al.* 2005a).

KHV umumnya dapat hidup dan berkembang biak pada suhu antara 18-30°C. Oleh karena itu serangan penyakit KHV akan mereda bila ikan dipelihara di luar suhu tersebut. Kematian terjadi sangat cepat karena virus ini masa inkubasinya antara 5-7 hari dengan tingkat kematian mencapai 80-95% dalam waktu satu minggu sejak gejala klinis muncul (Davenport 2001).

Pada kultur sel, virus KHV dapat tumbuh pada penyimpanan suhu 20, 25 dan 30°C. Virulensi tertinggi terlihat pada penyimpanan virus KHV pada suhu 25°C yang ditandai dengan kemunculan *cytophatic effect* (CPE) yang cepat dan menyeluruh pada setiap sel dalam kultur sel KT-2 (Fitrianis 2005).

Menurut Gilad *et al.* (2003), pertumbuhan optimal virus KHV pada sel kultur antara 15-25°C. Kematian yang tinggi pada ikan terjadi pada temperatur 18-25°C. Kematian ikan dan replikasi virus KHV terlihat berkurang pada temperatur rendah.



Viabilitas KHV di luar sel inang pada waktu 0, 1, 2, 4, 18, 24, 48, 96 dan 192 jam menunjukkan bahwa KHV antara 0-8 jam memiliki pertumbuhan yang sangat cepat pada sel kultur KT-2 dengan gejala CPE berupa vakuolisasi. Pada inokulasi virus KHV 0 jam memiliki pertumbuhan virus yang paling cepat, sedangkan inokulasi virus 24, 48, 96 jam menunjukkan pertumbuhan virus yang lambat (Arasyi 2005).

Gejala klinis

Menurut Departemen Kelautan dan Perikanan (2004), ikan yang terserang virus ini akan memperlihatkan gejala penurunan nafsu makan, lemah, penurunan muka pada kulit dan insang sehingga kulit tampak kering, *hemorrhage* pada sirip dan kulit, nekrosa sel insang atau insang gripis pada ujung lamela dan akhirnya membusuk. Ikan yang terserang penyakit ini akan mengalami perubahan tingkah laku antara lain berenang pada permukaan air, berkumpul dekat air mancur, gerakan yang tidak terkontrol dan megap-megap pada permukaan air (gangguan pernafasan). Secara histopatologis di temukan nekrosa pada insang, ekor, sirip, ginjal, limpa dan hati. Pada insang terjadi hiperplasia dan hipertrophy sel epitel (Sunatrto *et al.* 2005a).

Pengobatan

Sampai saat ini tidak terdapat obat untuk mengobati penyakit KHV, tetapi pengobatan dengan Chloramites T atau Potassium permanganat dapat digunakan untuk mengobati penyakit sekunder yang diakibatkan oleh infeksi bakteri, fungi dan parasit pada insang, garam tidak beriodium untuk dehidrasi, vitamin C untuk meningkatkan sistim kekebalan, tetapi hal ini bukan berarti ikan tersebut sembuh dari penyakit KHV.



Diagnosa

Salah satu diagnosa yang dipakai dalam penelitian ini adalah isolasi virus pada kultur sel. Sel yang digunakan adalah sel fibroblas dari KT-2 (Koi Tail No. 2). Supernatan homogenat dari sampel ikan sakit diinokulasikan ke dalam sel KT-2 berumur 24 jam kemudian diinkubasi selama 0,5-1 jam pada suhu 25⁰C agar virus menempel pada permukaan sel KT-2. Setelah diinokulasi, virus dapat dideteksi dengan terlihatnya efek sitopatik (*Cytopathic effect*, CPE) yang cepat dalam kultur sel.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



MATERI DAN METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2005 sampai dengan Februari 2006 di Unit Virologi, Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar, Departemen Kelautan dan Perikanan, Jl Sempur No. 1, Bogor.

Bahan dan Alat

Penelitian ini menggunakan kultur yang berasal dari sel KT-2 (Koi Tail No.2) dengan konfluensi lebih dari 80%. Kultur sel yang digunakan berasal dari hasil pasase ke-21 (KT-2 P-21). Isolat virus yang digunakan adalah isolat virus KHV hasil pasase virus pertama (KHV SP-1). Media pertumbuhan sel adalah *Leibovitz's L-15 medium* (Gibco USA) ditambah dengan Penicillin, Streptomycin, Kanamisin, L-Glutamin 200 mM, dan larutan FBS (*fetal bovine serum*) 10%. Pencucian media menggunakan PBS (*phospate buffered saline*) dan Tripsin 0,25%. Bahan kimia lain yang digunakan adalah *chlorine* dan alkohol 70% sebagai desinfektan.

Alat yang digunakan antara lain *tissue culture microplete* (96-wells), mikropipet, pipet 1 ml dan pipet 10 ml, *tissue*, Erlenmeyer 25 ml, *biological safety cabinet*, *inverted microscope*, kamera digital, inkubator dan *refrigerator*.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumpukan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University



Metodologi

Penyiapan dan pembuatan media

Persiapan pertama yang dilakukan adalah *thawing* Kanamicin, Penicillin dan Streptomycin serta L-Glutamin hingga cair, kemudian dilakukan pencampuran media dengan komposisi Leibovitz's L-15 medium 500 ml, Penicillin-Streptomycin 5 ml, Kanamicin 5 ml, L-Glutamin 5 ml, FBS 50 ml, sehingga didapatkan konsentrasi akhir Kanamicin 250 µg/ml, Penicillin 250 IU dan Streptomycin 250 µg/ml serta L-Glutamin 200 mM. Pembuatan media dilakukan dalam *biological safety cabinet*.

Penanaman sel pada mikroplate

Sel KT-2 yang ditanam pada sumur *tissue culture microplate* adalah sel hasil pasase ke-21. Penanaman sel dilakukan dengan cara sebagai berikut: dengan menggunakan mikropipet, sebanyak 75µL suspensi sel dipipet lalu dimasukan pada tiap sumur *microplate*, serta dilakukan penambahan media sebanyak 150µL dengan mikropipet yang baru. *Microplate* diinkubasi pada suhu 25°C sampai konfluensi mencapai 80%.

Penyiapan isolat virus

Isolat virus KHV di dapat dari organ ginjal, limpa dan insang (3:1:1 w/w) ikan koi yang terinfeksi dari Jawa Barat pada bulan Februari 2005 (Sunarto et al. 2005). Isolat virus KHV merupakan hasil pasase virus pertama (KHV SP-1). Cara menyiapkan isolat virus adalah dengan sentrifugasi sel pada *flask* yang terinfeksi virus KHV. Sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 1500 rpm pada suhu 4°C. Dari hasil sentrifugasi, supernatannya diambil menggunakan pipet



lalu dimasukkan ke dalam *microtube* dan diberi label. Prosedur ini dilakukan secara hati-hati jangan sampai pelet ikut terbawa dalam supernatan. Semua proses pemanenan virus dilakukan di dalam *biological safety cabinet* untuk menghindari adanya kontaminan dari luar.

Pengenceran virus

Persiapan pertama yang dilakukan dalam pengenceran virus adalah menyiapkan isolat virus dan tabung pengencer sebanyak 8 buah yang disusun pada rak plastik (Sano 1991). Cara pengenceran virus adalah sebagai berikut:

1. Dengan menggunakan pipet 1 ml, media sebanyak 0,9 ml dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung ke-2 sampai tabung ke-8.
2. Virus yang akan dititrasi diambil 0,1 ml dan dimasukkan pada tabung ke-2 dengan menggunakan mikropipet yang baru. Pencampuran virus dengan cara memipet dan mengeluarkan cairan tersebut paling tidak sebanyak 3 kali.
3. Tabung pertama merupakan stok virus, dari tabung ke-2 diambil sebanyak 0,1 ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung ke-3 serta dilakukan pencampuran seperti pada poin 2.
4. Seterusnya, dari tabung ke-3 diambil sebanyak 0,1 ml lalu dimasukkan pada tabung ke-4 serta dilakukan pencampuran. Pemindahan dan pencampuran seperti ini dilakukan sampai tabung ke-7. Pada tabung ke-8 tidak dilakukan pengenceran karena sebagai sel kontrol.

Hasil pengenceran virusnya yaitu, 10^0 (virus stok), 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} dan sel kontrol.





Inokulasi virus

Inokulasi virus dilakukan pada 96 sumur *tissue culture microplate* yang telah terisi dengan suspensi sel sebanyak 75μL dan media sebanyak 150μL dan telah mencapai konfluensi 80%. Inokulasi virus dilakukan dengan cara sebagai berikut :

1. Media pada semua sumur *microplate* dibuang dengan menggunakan *micropipet*.
2. Dengan *micropipet* yang baru, virus hasil pengenceran 10^0 (virus stok) diambil dan dimasukkan masing-masing sebanyak 50μL ke dalam sumur lajur A (A1-A12).
3. Virus hasil pengenceran 10^{-1} diambil dan dimasukkan sebanyak 50μL pada sumur lajur B (B1-B12), virus pengenceran 10^{-2} pada sumur lajur C (C1-C12), seterusnya 10^{-3} pada sumur lajur D, 10^{-4} (E), 10^{-5} (F), 10^{-6} (G) dan lajur H tidak diinokulasi virus karena sebagai sel kontrol. Inokulasi setiap virus dengan pengenceran yang berbeda menggunakan *micropipet* yang berbeda pula.
4. *Microplate* diinkubasikan selama satu jam pada suhu 25°C.
5. Pada semua sumur dimasukkan media yang baru sebanyak 150μL dan diinkubasi pada suhu 25°C.
6. Pengamatan CPE dilakukan selama 7 hari.

Pengamatan CPE dan penghitungan titer virus

Pengamatan dan pencatatan perubahan CPE dilakukan setiap hari terhadap semua sumur dengan *inverted microscope* yang terhubung dengan kamera digital.



Penghitungan titer virus menurut Reed and Manch (1938) dilakukan dengan menghitung *end point* dari TCID₅₀ yaitu pengenceran tertinggi yang dapat menimbulkan kerusakan sebanyak 50% dari sel yang dicirikan adanya pembentukan CPE.

Rumus yang digunakan untuk menentukan TCID₅₀ adalah :

$$\text{Proportional distance} = \frac{50\% - \% \text{ positif pada pengenceran dibawah } 50\%}{\% \text{ positif pengenceran diatas } 50\% - \% \text{ positif pengenceran dibawah } 50\%}$$

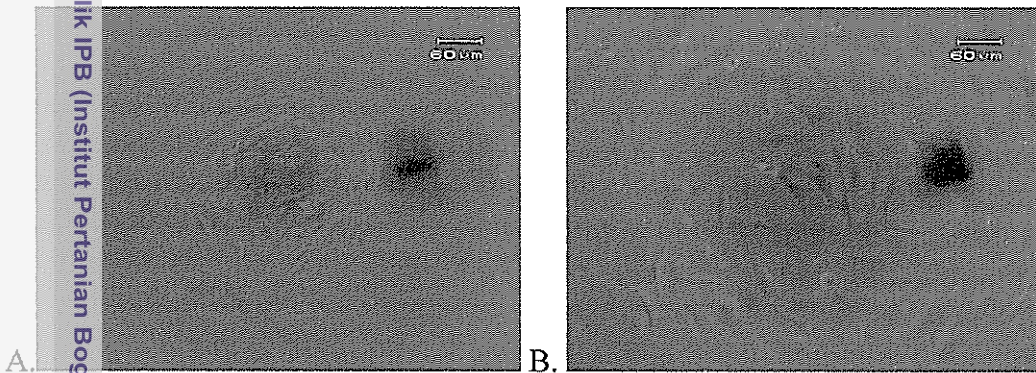
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



HASIL DAN PEMBAHASAN

Sel KT-2 yang digunakan untuk inokulasi virus telah mencapai konfluensi lebih dari 80% dan dari observasi terdahulu telah diketahui bahwa jenis sel ini termasuk sel fibroblast. Hasil penelitian dan pengamatan pada kultur sel KT-2 yang telah di inokulasikan dengan virus KHV adalah sebagai berikut:

Pada hari pertama pasca infeksi, tidak terjadi perubahan pada biakan sel, ditandai dengan keadaan sel yang masih normal (Gambar 1).



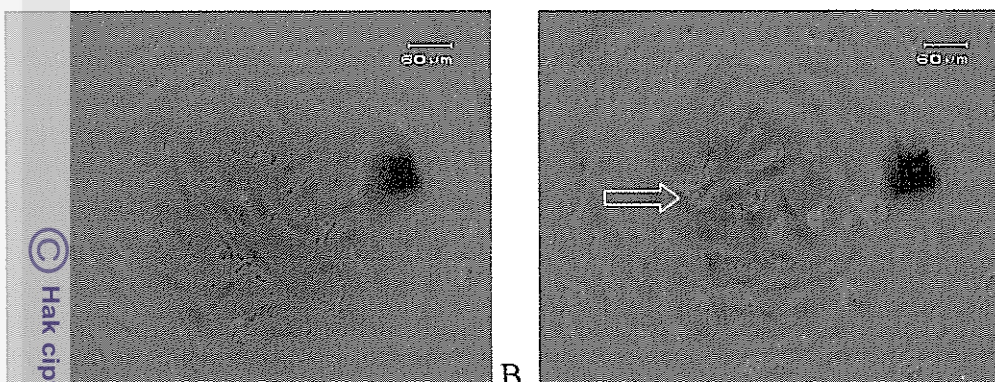
Gambar 1. Foto kultur sel KT-2 hari ke-1 setelah inokulasi KHV. A. Sel kontrol (tidak diinokulasi). B. Sel diinokulasi dengan virus stok. Pembesaran 20x.

Pada hari ke-2 pasca infeksi terjadi perubahan pada biakan sel berupa timbulnya bintik-bintik hitam yang merupakan bakal vakuolisasi. Bakal vakuolisasi ini hanya terjadi pada virus stok di beberapa sumur, sedangkan pada pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} dan sel kontrol tidak menunjukkan perubahan.

Cytopathic effect berupa bulatan kecil baru terlihat setelah hari ke-3. Pada virus stok, vakuolisasi terjadi secara merata, sedangkan pada pengenceran 10^{-1} bakal vakuolisasi baru terjadi di beberapa lubang berupa bintik-bintik hitam.



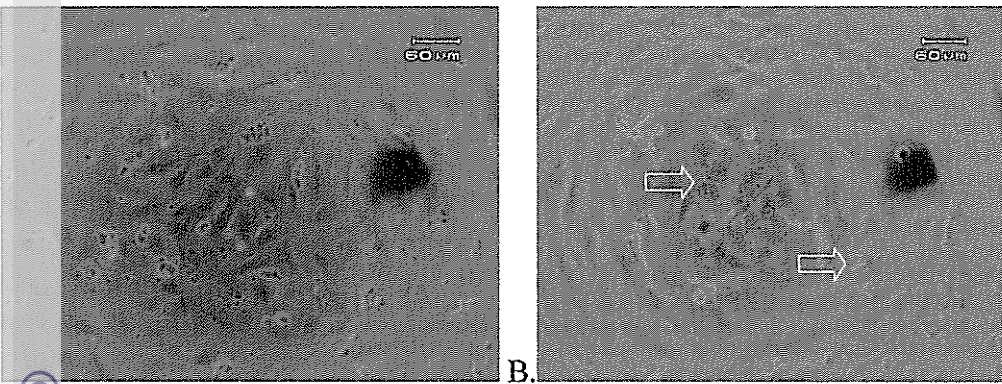
Namun pada pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} serta sel kontrol tidak terlihat perubahan yang nyata (Gambar 2).



2. Foto kultur sel KT-2 hari ke-3 setelah inokulasi KHV. A. Sel kontrol (tidak diinokulasi). B. Sel diinokulasi dengan virus stok. Pembesaran 20x.

Pada hari ke-4 post infeksi, vakuolisasi terus membesar dan merata pada virus stok, hal ini ditandai dengan kerusakan berupa vakuol-vakuol yang berwarna bening tetapi belum disertai dengan pelepasan (*detachment*) sel. Pada pengenceran 10^{-1} vakuolisasi terus bertambah di beberapa lubang, sedangkan pada pengenceran 10^{-2} baru terjadi bakal vakuolisasi berupa bintik-bintik hitam pada biakan sel. Sel masih terlihat normal pada pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} serta sel kontrol.

Kerusakan sel makin banyak dan terus bertambah terjadi di hari ke-5. Pada virus stok vakuolisasi makin membesar, merata dan berwarna bening disertai dengan pelepasan sel. Pada pengenceran 10^{-1} terlihat vakuolisasi yang banyak dan merata tetapi tidak sebanyak vakuolisasi pada virus stok, begitupun pada pengenceran 10^{-2} sudah terjadi vakuolisasi yang belum merata pada tiap selnya. Bakal vakuolisasi baru terjadi pada pengenceran 10^{-3} dan 10^{-4} berupa bintik-bintik hitam, namun pada pengenceran 10^{-5} , 10^{-6} dan sel kontrol tidak terjadi kerusakan oleh virus tetapi oleh faktor fisik dan kimia (Gambar 3).



Gambar 3. Foto kultur sel KT-2 hari ke-5 setelah inoculasi KHV. A. Sel kontrol (tidak diinokulasi). B. Sel diinokulasi dengan virus stok. Pembesaran 20x.

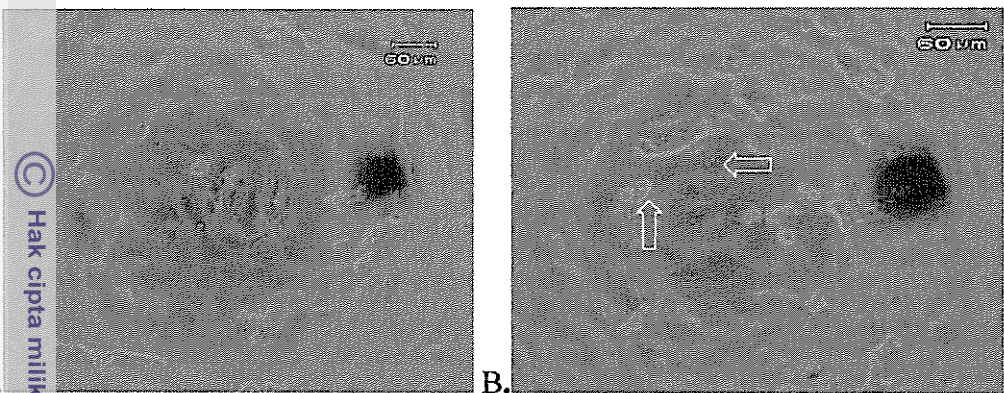
Kerusakan sel berlangsung dengan cepat yang disertai dengan penambahan jumlah vakuolisasi dan pada akhirnya akan terlihat pelepasan sel yang meluas. Pelepasan ini terlihat setelah hari ke-6 pada virus stok, namun pada pengenceran 10^{-1} terlihat vakuolisasi yang banyak dan merata dibandingkan dengan pengenceran 10^{-2} dan 10^{-3} . Kerusakan sel yang lebih lama dan bentuk kerusakan yang berbeda juga terjadi pada pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} dan sel kontrol, ini disebabkan oleh faktor fisik dan kimia dari sel bukan disebabkan oleh virus.

Pada hari ke-7 setelah inoculasi, kerusakan menyeluruh disertai pelepasan terjadi pada virus stok dan pengenceran 10^{-1} , hal ini ditandai dengan banyaknya ruang kosong diantara sel. Demikian juga pada pengenceran 10^{-2} terlihat vakuolisasi yang banyak tetapi tidak merata pada tiap selnya. Kerusakan sel lebih sedikit terjadi pada pengenceran 10^{-3} dan 10^{-4} berupa vakuol-vakuol berukuran kecil dan berwarna bening.

Bakal vakuolisasi tidak berkembang tetapi tetap berupa bintik-bintik pada sel yang semakin banyak jumlahnya dan berbeda dengan vakuolisasi akibat kerusakan sel oleh virus terjadi pada pengenceran 10^{-5} , 10^{-6} serta sel kontrol.



Kerusakan berupa granul-granul ini terjadi di sekeliling inti sel, hal ini disebabkan karena tidak dilakukannya pergantian media sehingga sel menjadi tua (Gambar 4).



Gambar 4. Foto kultur sel KT-2 hari ke-7 setelah inokulasi KHV. A. Sel kontrol (tidak diinokulasi). B. Sel diinokulasi dengan virus stok. Pembesaran 20x.

Kerusakan sel yang disebabkan oleh *Koi herpesvirus* pada sel KT-2 dengan pengenceran berseri berupa pembentukan CPE pada hari ke-7 pasca inokulasi disajikan dalam tabel berikut ini.

Tabel 1. Pembentukan *cytopathic effect* (CPE) pada kultur sel KT-2 hari ke-7 pasca inokulasi

Pengenceran virus	Ulangan											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Virus stok	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
10 ⁻¹	++	++	++	+++	++	++	+++	++	+++	+++	++	+++
10 ⁻²	+	-	++	+	+	-	++	-	-	+	-	+
10 ⁻³	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
10 ⁻⁴	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
10 ⁻⁵	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁻⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sel kontrol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan tabel : (-) tidak ada CPE, (+) CPE <30%, (++) CPE 30-70%, (+++) CPE >70%

Akumulasi kerusakan sel berupa pembentukan CPE yang disebabkan oleh *Koi herpesvirus* pada sel KT-2 hari ke-7 pasca inokulasi disajikan dalam tabel berikut.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumpukan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Tabel 2. Hasil eveluasi *cytopathic effect* (CPE) pada kultur sel KT-2 hari ke-7 pasca inokulasi

Pengenceran virus	Infeksi		Komulatif		Kerusakan Sel (%)	
	+	-	+	-		
Virus stok	12	0	37	0	37/37	100%
10 ⁻¹	12	0	25	0	25/25	100%
10 ⁻²	7	5	13	5	13/18	72%
10 ⁻³	4	8	6	13	6/19	32%
10 ⁻⁴	2	10	2	23	2/25	8%
10 ⁻⁵	0	12	0	35	0/35	0%
10 ⁻⁶	0	12	0	47	0/47	0%
Saluran kontrol	0	12	0	59	0/47	0%

(Metode Reed and Munch 1938)

Dari Tabel 2 diatas dapat diperkirakan pengenceran virus yang menyebabkan kerusakan pada sel sebanyak 50% yaitu antara pengenceran 10⁻² (72%) dan 10⁻³ (32%).

Dengan rumus :

$$PD = \frac{50\% - \% \text{ positif pada pengenceran dibawah } 50\%}{\% \text{ positif pengenceran diatas } 50\% - \% \text{ positif pengenceran dibawah } 50\%}$$

PD = *Proportional distance*

Berdasarkan data diatas diperoleh :

$$PD = \frac{50\% - 32\%}{72\% - 32\%} = \frac{18}{40} = 0,45$$

$$3 - 0,45 = 2,55$$

$$\begin{aligned} \text{antilog } 2,55 &= 354,81 \text{ TCID}_{50}/0,05 \text{ ml} = 7096,2 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}. \\ &= 10^{3,8} \text{TCID}_{50}/\text{ml} \end{aligned}$$

Dengan demikian titer KHV yang digunakan dalam penelitian ini adalah 10^{3,8}TCID₅₀/ml atau 7096,2 TCID₅₀/ml.

Virus yang menginfeksi suatu sel, pertama-tama virus harus berikatan dengan permukaan sel lalu masuk kedalam melalui dinding sel. Didalam sel, virus

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumpukan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



membuka selubungnya untuk memungkinkan selnya keluar dan berbiak. Virus berbiak dengan cepat di dalam sel, terutama pada temperatur tinggi ($39-41^{\circ}\text{C}$) dan akan menghambat proses biosintesis makromolekul inang, merusak lisosom, merubah membran sel inang, kurang merangsang pembentukan interferon menyebabkan kerusakan sel sehingga menimbulkan efek sitopatik (Fenner *et al.* 1997).

Salah satu respon sel terhadap infeksi oleh virus adalah terjadinya efek sitopatik, dimana sel berdegenerasi yang disusul dengan kematian pada sel. Bentuk CPE berbeda-beda pada jenis virus dan selnya, degenerasi dan kematian sel terjadi karena virus menghambat sintesa makromolekul pada sel sehingga sel-sel menjadi bulat, bergerombol atau mengeriput kemudian hancur. *In vivo*, infeksi virus menyebabkan perubahan pada dinding sel yang terinfeksi sebagai akibat terdapatnya antigen virus pada permukaan sel, sehingga menarik antibodi dan komplemen serta sel "T killer" dan makrofag untuk menghancurkan sel. Pada infeksi oleh virus-virus Herpes, terjadi penyatuan atau fusi dinding sel-sel yang berdekatan sehingga terbentuk sel berinti banyak yang disebut sel raksasa (*giant cell*) (Malole 1988).

Mekanisme pertahanan sel hewan terhadap virus secara *in vivo*, dapat berupa imunitas sel itu sendiri, yaitu berupa adanya antibodi dan interferon dari sel yang dapat menghambat invasi virus. Interferon merupakan suatu molekul protein kecil yang diproduksi ketika virus menginfeksi sel. Interferon menstimulasi sel yang belum terinfeksi untuk memproduksi suatu enzim yang memiliki aktivitas antiviral untuk melindungi dari multiplikasi virus (Sigel *et al.* 1969).

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Bila virus berhasil menginfeksi sel maka akan terjadi perubahan-

perubahan pada sel berupa vakuolisasi dan *detachment* sel. Perubahan ini merupakan unsur-unsur CPE yang terjadi pada sel. Perubahan pada sel kultur KF-1 (Koi Fin-1) yang diinokulasikan dengan virus KHV membutuhkan waktu 14 hari untuk terjadi *detachment* sel secara sempurna (Hedrick *et al.* 2000).

Waktu pembentukan CPE berbeda-beda pada tiap pengenceran virus, hal ini disebabkan karena jumlah virus yang diinokulasikan berbeda. CPE baru terlihat pada hari ke-3 setelah diinokulasi pada virus stok, sedangkan pada pengenceran 10^{-1} baru terjadi bakal vakuolisasi berupa bintik-bintik hitam. Sebaliknya, pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} dan kontrol sel tidak terdapat vakuolisasi, hal ini ditandai dengan sel yang masih normal.

Pada virus stok, kerusakan terjadi dengan cepat dan merata, begitupula pada pengenceran 10^{-1} . Pada pengenceran 10^{-5} , 10^{-6} dan sel kontrol tidak terlihatnya perubahan yang nyata menandakan hanya terjadinya infeksi yang lemah, sehingga tidak terjadi kerusakan yang berarti pada biakan sel.

Morfologi sel dapat mengalami perubahan yang menandakan adanya kerusakan sel yang disebabkan tidak dilakukannya pergantian media atau pasase atau oleh sebab lain. Tanda yang terlihat pada sel yang rusak antara lain terdapat granula di sekeliling inti sel, terdapat vakuol dalam sitoplasma, sel menjadi bulat dan terlepas dari substrat (Malole 1990). Perubahan pH juga dapat memicu terjadinya kerusakan pada sel, pH optimum sel berkisar antara 7,2-7,5. Perubahan pH terjadi karena banyaknya sisa metabolisme yang dihasilkan oleh sel ditandai dengan adanya perubahan warna medium dari merah menjadi orange lalu kuning.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumpukan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Sisa-sisa metabolik ini akan menurunkan pH dari medium sehingga mengarah ke kondisi asam.

Kerusakan virus juga dapat disebabkan oleh perubahan pH media. Secara umum sebagian virus akan tetap hidup pada pH 5-9 tetapi cepat rusak atau inaktif pada pH yang terlalu asam atau terlalu basa. Asam kuat dan basa kuat dapat menyebabkan denaturasi protein.

Menurut Hedrick *et al* (2000), pada *flask* yang berukuran 25 cm² CPE muncul pertama kali pada hari 7-10 pasca inokulasi dengan bentuk kerusakan berupa vakuolisasi pada biakan sel. Penggabungan (*fusi*) dari sel terjadi setelah 14 hari pasca inokulasi. Dari hasil penelitian pada ikan koi yang diinfeksi dengan 0,1 ml media kultur yang bertiter 10³TCID₅₀/ml KHV-I (Israel) pada KF-1, terjadi kematiannya mencapai 80-100% dalam waktu 7-10 hari. Sedangkan koi yang diinfeksi dengan KHV-U (USA) dengan titer 10^{2,5}TCID₅₀/ml terjadi kematian mencapai 80-100% dalam waktu 9-10 hari pasca infeksi (Hedrick *et al.* 2000).

Cytopathic effect pada sel FHM (*fathead minnow*) karena infeksi *cytoplasmic virus-like particles* terbentuk setelah hari ke 3-5 post inokulasi, sedangkan kerusakan sel secara menyeluruh terjadi setelah 15 hari post inokulasi dan memiliki titer 10^{3,0} TCID₅₀/ml (Myung *et al.* 2001).

Menurut Lipps (1999) titer virus standar dari HSV-1 (*herpes simplex virus type 1*) dan HSV-2 pada CH (*chang's liver cell*) yaitu antara 10^{2,025}-10^{2,033} TCID₅₀/ml sedangkan pada virus BHV-1 (*bovine herpesvirus*) titer virus normalnya yaitu 10⁵TCID₅₀/ml. Namun, pada *Infectious haematopoietic necrosis virus* (IHNV) diperoleh titer virusnya yaitu 10^{3,19}TCID₅₀/ml (Gregorch *et al.*

2004)

Hak cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumpukan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Hak cipta dilindungi Undang-Undang
IPB Institut Pertanian Bogor

Bogor Agricultural University



Virus KHV yang diinokulasikan pada sel KT-2 mempunyai titer virus yaitu $10^{3,8}$ TCID₅₀/ml dengan bentuk CPE berupa vakuolisasi pada biakan sel. Nilai titer ini merupakan hasil isolasi virus dari target organ yaitu ginjal, limpa dan insang (3:1:1 w/w), sedangkan pada target organ yang lainya sampai saat ini belum dilakukan penghitungan titer virusnya. Pada jenis virus yang lainya seperti HSV-1 dan HSV-2 mempunyai nilai TCID₅₀/ml yang berbeda. Hal ini dapat dikatakan bahwa setiap virus mempunyai nilai TCID₅₀/ml yang berbeda-beda.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



KESIMPULAN

Penghitungan *tissue culture infective dose* (TCID₅₀) KHV dapat dilakukan pada kultur sel KT-2. *Cytopathic effect* terlihat pertama kali pada hari kedua pasca infeksi, sehingga titer virus ini yaitu 10^{3,8}TCID₅₀/ml.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian mengenai TCID₅₀ KHV yang diisolasi dari berbagai target organ yang berbeda.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



DAFTAR PUSTAKA

- Antoni R. 2005. Pembuatan Kultur Sel Primer (*Primary Cell Culture*) Dari Ekor Ikan Koi (*Cyprinus carpio* linn). [Skripsi]. Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.
- Arasyi AR. 2005. Studi viabilitas KHV (*Koi herpesvirus*) di luar sel inang dengan menggunakan kultur sel KT-2. [Skripsi]. Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.
- Daili SF dan Makes WI. 2002. *Infeksi Virus Herpes*. Kelompok Studi Herpes virus. Jakarta: Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.
- Daveport K. 2001. *Koi herpesvirus (KHV)*. United Kingdom: Ornamental Aquatic Trade Association.
- Departemen Kelautan dan Perikanan. 2004. Petunjuk pengendalian penyakit insang membusuk. <http://www.dkp.go.id/content.php?c=1631>. [22 November 2004].
- Effendy dan Hersanto. 1993. *Mengenal Beberapa Jenis Koi (Karper Jepang-Nishikigoi)*. Yogyakarta: Kanisius.
- Fenner FJ, Gibbs EP, Murphy FA, Rott R dan Studdert MJ. 1993. *Virologi veteriner*. Ed ke-2. Semarang: IKIP Semarang. hlm. 89-104.
- Fitrianis Y. 2005. Pengaruh suhu terhadap pertumbuhan KHV (*Koi herpesvirus*) di dalam kultur sel KT-2. [Skripsi]. Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.
- Gregorich A, Bowen D, Jenala V and Hostnik P. 2004. Infectious haematopoietic necrosis virus-induced cell death in fish cell culture. Slovenia: Veterinary Faculty of the University of Ljubljana.
- Hardjamilia A. 1978. Budidaya perikanan, budidaya ikan mas, ikan nila, ikan mola, ikan jambal siam. Bogor: SPP-SUPM.
- Hedrick RP, Gilad O, Yun S, Spananberg JV, Marty GD, Nordhausen RW, Kubus MJ, Berchovier H and Elder 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.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Lipps BV. 1999. Identification of a specific inhibitor to herpes virus type-2 in neuroblastoma cell. www.ophidia.com/NB-H2.pdf. [17 Januari 2006].

Malole MB. 1988. *Virologi*. Bogor: Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor.

Malole MB. 1990. *Kultur Sel dan Jaringan Hewan*. Bogor: Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor. hlm. 74-77.

Myung OJ, Jung SJ, Choi TJ, Kim HR, Rajendran KV, Kim YJ, Park MA and Chun SK. 2001. A viral disease occurring in cultured carp *Cyprinus carpio* in Korea. *J Fish Pathology* 36: 147-151.

OAT. 2001. Koi herpesvirus (KHV). <http://www.ornamental fish.org>.

Oren G, Hedrick RP, Susan Y and Mark AA. 2003. Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, Koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. <http://www.koilib.com/articles/details.php?articleId=17&parented=4>. [9 Desember 2006].

Reed LJ and Munch HA. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoint. *Am J Hygiene* 27: 493-497.

Rukyani A dan Sunarto A. 2003. Mewaspadaai bahaya penyakit koi herpesvirus (KHV). Jakarta: Makalah Seminar Penilaian Kualitas Ikan Koi.

Saanin H. 1984. *Taksonomi dan Kuntji Identifikasi Ikan*. Bogor: Binatjpta.

Sano T, Morita N, Sima N and Akimoto M. 1991. *Herpesvirus cyprini*: lethality and oncogenicity. *Journal Fish Disease* 14: 533-543.

Sano T. 1991. *A Technical Manual of Fish Virus Examination*. Fisheries and Aquaculture International Co., Ltd. hlm. 54-58

Schubert GH. 1996. The infective agent in carp pox. *Bulletin Office International Epizootie* 65: 1011-1022.

Siegel MM and Beasley AR. 1965. *Viruses, Cell and Host*: An introduction to virologi. New York: Holt, Rinehart and Winston.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University



Sugiri N. 1992. *Biologi Sel Volume 1*. Pusat Antar Universitas Ilmu Hayati, Institut Pertanian Bogor.

Sunarto A, Rukyani A dan Itami T. 2005. Indonesian experience on the outbreak of koi herpesvirus in koi and carp (*Cyprinus carpio*). Bulletin of Fisheries Research Agency of Japan. Supplement No. 2.

Sunarto A, Taukhid, Rukyani A, Koesharyani I, Supriyadi H, Gardenia L, Huminto H, Herdikiawan D, Huminto H, Rkmono D, Pasaribu FH, and Widodo. 2005a. Field infestation on a serious disease outbreak among koi and common carp (*Cyprinus carpio*) in Indonesia. Paper presented in 5th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, 24-28 November 2002. Australia: Gold Cost.

Sunarto A, Sumiati T, Koesharyani I, Hyatt A, and Itami T. 2005c. Development of cell line from tail of koi (*Cyprinus carpio*) and isolation of koi herpes virus from Indonesia aquaculture (DAA VI). Programme and Book of Abstracts 6th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture. Aquatic Animal Health: Facing New Challenges. DAAVI. 25-28 October 2005. Sri Lanka: Colombo Plaza Hotel, Colombo. hlm. 74.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

LAMIRAN



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

[illegible]



2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

[illegible]



Hari / tanggal : Minggu/22 Januari 2006

HARI KE-3

Tabel Pengamatan *cytopathic effect* (CPE) dengan menggunakan sel KT-2

Pengenceran virus	Ulangan											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Virus stok	+	+	-	+	-	++	+	-	+	-	+	-
10^{-1}	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
10^{-2}	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
10^{-3}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-4}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-5}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-6}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sel kontrol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

2. Dilarang menguraikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Penguatipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

Hari / tanggal : Senin /23 Januari 2006

HARI KE-4

Tabel Pengamatan *cytopathic effect* (CPE) dengan menggunakan sel KT-2

[illegible]



Hari / tanggal : Selasa/24 Januari 2006

HARI KE-5

Tabel Pengamatan *cytopathic effect* (CPE) dengan menggunakan sel KT-2

Pengenceran virus	Ulangan											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Virus stok	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++
10^{-1}	++	+	++	+	++	+	+++	+	+	++	++	++
10^{-2}	-	+?	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
10^{-3}	-	-	+?	-	+?	-	-	-	-	-	+	-
10^{-4}	-	-	-	-	-	-	-	-	-?	-	-	-
10^{-5}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-6}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sel kontrol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

2. Dilarang menguraikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

Hari / tanggal : Rabu / 25 Januari 2006

HARI KE-6

Tabel Pengamatan *cytopathic effect* (CPE) dengan menggunakan sel KT-2

[illegible]



Hari / tanggal : Kamis /26 Januari 2006

HARI KE-7

Tabel Pengamatan *cytopathic effect* (CPE) dengan menggunakan sel KT-2

Pengenceran virus	Ulangan											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Virus stok	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
10^{-1}	++	++	+++	+++	++	++	+++	++	+++	+++	++	+++
10^{-2}	+	-	++	+	+	-	++	-	-	++	-	+
10^{-3}	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
10^{-4}	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
10^{-5}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-6}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sel kontrol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan : (-) tidak ada CPE, (+) CPE <30%, (++) CPE 30-70%, (+++) CPE >70%