



25JA/12/2006

KERENTANAN DAN GAMBARAN DARAH IKAN MAS (*Cyprinus carpio* L) YANG TERINFEKSI KOI HERPES VIRUS (KHV)

ASPRIN TAMBA



SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2006

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



PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis yang berjudul Kerentanan dan Gambaran Darah Ikan Mas (*Cyprinus Carpio* L.) yang Terinfeksi Koi Herpes Virus (KHV) adalah karya saya sendiri dengan arahan komisi pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka dibagian akhir tesis ini.

Bogor, November 2006

Asprin Tamba
NRP C151040051

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.



ABSTRAK

ASPRIN TAMBA Kerentanan dan Gambaran Darah Ikan Mas (*Cyprinus Carpio* L) yang Terinfeksi Koi Herpes Virus (KHV). Dibimbing oleh **DARNAS DANA** dan **MARTHEN MALOLE**.

Analisis kerentanan dan gambaran darah ikan mas (*Cyprinus carpio* L) terhadap infeksi koi herpes virus (KHV) telah dilakukan untuk mengevaluasi faktor yang mempengaruhi kesehatan ikan mas. Sampel ikan mas diambil dari 10 keramba jaring apung di Waduk Cirata. Status kesehatan ikan dikategorikan menjadi 3 yakni : ikan sakit, carrier-laten dan sehat. Pengamatan gejala klinis, uji PCR dan histologi dilakukan untuk konfirmasi keberadaan KHV. Evaluasi hematologi dilakukan dengan mengukur hematokrit, hemoglobin, jumlah eritroit, jumlah leukosit dan difrensial leukosit. Hasil penelitian memperlihatkan nekrosis insang merupakan gejala utama serangan KHV. Respon nyata tingkat kesehatan ikan diperlihatkan oleh perbedaan parameter kesehatan ikan seperti peningkatan jumlah eritrosit, hemoglobin, hematokrit, dan trombosit dan diikuti dengan penurunan neutrofi, monosit dan limfosit. Virulensi virus memperlihatkan adanya penurunan virulensi.

Kata kunci : *KHV, ikan mas, hematology, virulensi*

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.



ABSTRACT

ASPRIN TAMBA. *Supcectibility and Blood Features of Common Carp (Cyprinus carpio L) waslinfected by Koi Herpes Virus (KHV).* Under direction of: **DARNAS DANA** and **MARTHEN MALOLE.**

An analysis on supcectibility of common carp (Cyprinus carpio L) upon koi herpes virus (KHV) was conducted from february to august 2006. This study was aim at evaluating the factors affecting the degree of healthiness in common carp which was infected naturally by KHV. Fish samples were cultured in ten floating net cages in Cirata Lake. The cages were sampled randomly and fishes were taken purposively. The fish health status was categorized into three : sick, laten-carrier and healthy. Observation on clinical sign, PCR test, and histology were done to confirm the KHV infection. Haematological evaluation were done by measuring haematological parameters such as haematocrit, haemoglobin, erithrocyte count, leucocyte count and leucocyte diffrential. The result showed the gill neckrosis as the main clinical sign. Significants respons in healthiness was detected in fish sampled and this would be accounted for increasing haematocrit, haemoglobin erythrocyte count, as well as decreasing of neutrophyl, leucocyte count, monocyte.

Key words : KHV, common carp, haemathology, virulence

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.



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 literatur 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 milik Institut Pertanian Bogor
Tahun 2006**

Hak Cipta dilindungi

Dilarang mengutip dan memperbanyak tanpa izin tertulis dari
Institut Pertanian Bogor, sebagian atau seluruhnya dalam
bentuk apa pun, baik cetak, fotocopy, mikrofilm, dan sebagainya.



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.

KERENTANAN DAN GAMBARAN DARAH IKAN MAS (*Cyprinus carpio* L) YANG TERINFEKSI KOI HERPES VIRUS (KHV)

ASPRIN TAMBA

Tesis

Sebagai salah satu syarat memperoleh gelar
Magister Sains pada
Manajemen dan Teknologi Budidaya Perairan

**SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2006**



© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

Judul Tesis : Kerentanan dan Gambaran Darah Ikan Mas (*Cyprinus Carpio* L) yang Terinfeksi Koi Herpes Virus (KHV)
Nama Mahasiswa : Asprin Tamba
NRP : C151040051

Disetujui,
Komisi Pembimbing

Dr. Ir. Darnas Dana, M.Sc
Ketua

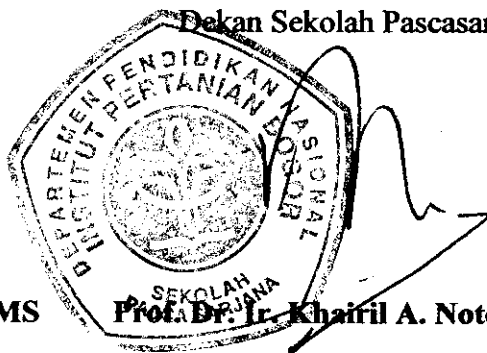
Dr. drh. Marthen Malole
Anggota

Diketahui,

Ketua Program Studi
Ilmu Perairan

Prof. Dr. Ir. Enang Harris, MS

Dekan Sekolah Pascasarjana



Prof. Dr. Ir. Khairil A. Notodiputro, MS

Tanggal Ujian : 16 November 2006.

Tanggal Lulus : 04 DEC 2006

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 kepada Tuhan yang Maha Kuasa, atas berkat dan perlindunganNya, sehingga penulisan tesis yang berjudul ” Kerentanan dan Gambaran Darah Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L) yang terinfeksi Koi Herpes Virus (KHV) ” ini tepat pada waktunya.

Pada kesempatan yang berbahagia ini, penulis dengan kerendahan hati dan sukacita mengucapkan terimakasih banyak kepada semua pihak yang telah mendukung penulis dalam perkuliahan, kehidupan sehari-hari, penelitian dan penulisan tesis ini, karena dengan dukungan dan peransertanya, penulis dapat menyelesaikan studi ini. Oleh karena itu dengan rasa hormat dan kerendahan hati penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. Bapak Dr. Ir. Darnas Dana, MSc dan Dr. Drh. Marthen Malole sebagai ketua dan anggota komisi pembimbing yang telah banyak memberikan didikan, perhatian, arahan dan solusi dalam pelaksanaan penelitian dan penyusunan tesis ini.
2. Dekan Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk menempuh pendidikan S2.
3. Ketua dan seluruh jajaran Program Studi Ilmu Perairan (AIR) IPB yang telah banyak membantu penulis dalam penyediaan sarana dan kelancaran administrasi.
4. Seluruh staff pengajar Institut Pertanian Bogor yang telah memberikan Ilmu dan Pengetahuan kepada penulis selama masa studi.
5. Rektor Universitas Asahan, Dekan Fakultas Pertanian, Ketua Program Studi D-III Perikanan dan Kelautan dan Ketua Yayasan Universitas Asahan yang telah memberikan izin, dukungan moral dan materil kepada penulis untuk melanjutkan studi
6. Pengelola BPPS-DIKTI dan Pimpinan Yayasan Damandiri Sejahtera yang telah memberikan dana beasiswa dan bantuan biaya penelitian, sehingga perkuliahan dan penelitian dapat berlangsung dengan baik.
7. Kepala dan jajaran Balai Pengelolaan Perairan Umum dan Perikanan BBPUP) Jawa Barat di Maleber Kabupaten Cianjur serta masyarakat

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 literatur 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.



pembudidaya ikan mas di Waduk Cirata atas penerimaan, dukungan, kemudahan dan kesediaannya memberikan tempat, informasi, sarana dan prasarana pendukung untuk pelaksanaan penelitian.

8. Kepala dan staff Balai Pengelola Waduk Cirata (BPWC) di Kabupaten Bandung, atas penyediaan data dan informasi yang dibutuhkan untuk kelengkapan tesis ini.
9. Kepala dan staff Laboratorium Kesehatan Ikan (LKI) IPB, atas izin penggunaan sarana dan prasaran laboratorium bagi penulis baik selama perkuliahan maupun pada saat penelitian.
10. Ayahanda M. Tamba dan Ibunda R. Br. Sitohang dan adek-adekku (Lendang, Jalinter, Nelly, Marlan, Nadya, Nurlely, Dina dan Elsi), atas cinta kasih, doa, perhatian, dukungan yang diberikan sehingga penulis dimampukan untuk menjalani masa studi
11. Keluarga Tante Lidia Tamba dan Keluarga Gibson Napitupulu, atas dukungan yang telah diberikan
12. Keluarga besar Ompu Ramsus Tamba dan Ompu Juwita Sitohang, atas semua dukungan dan semangat juang yang diberikan
13. Yang terkasih Netty Natalia Simanjuntak atas doa, dukungan dan perhatian yang terus-menerus diberikan.
14. Teman-teman PAKRI (Kak Ria, Kak Shanty, Lena, Dwi, Galung, Netti, Marlina dan Riady) atas kebersamaan dan dukungan yang diberikan
15. Teman-teman staff pegajar DIII Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Asahan atas bantuan dan dukungan yang selalu diberikan.
16. Teman-teman P12 (Bang Gosen, Dame, Heron, Bung Adrianus, Bung Simon, Alberto, Kaswanto, Bung Max, Bung Yanes, Pak Hengki, Bu Linda dan Pak Toni Ongkers, Degen, Yan, Nona, Amru, Tuah, Ivan, Ednan, Martin, Berry, Yosia, Meis, Meilin, Erika, Jack Mamangkey, dll) atas kebersamaan, sukacita dan team LABO P-12.
17. Teman-teman Program studi Ilmu Perairan (AIR) (Yulisman, Bu Agustina, Muh Amin, Zainal, Hatta, Eva, Linda, Dodi, Harun, Enrico, Asman, Muh Amien, Pak Adi, Pak Ayi, Dian, dll) atas sumbangan pemikiran, dukungan moral dan kebersamaan yang terjalin selama masa studi.

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.



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.

18. Kepada pihak-pihak lain yang belum termuat dalam tulisan ini, atas peransertanya memberikan dukungan kepada penulis.

Akhir kata, penulis menyadari bahwa isi dan cara penulisan tesis ini masih perlu penyempurnaan, oleh karena itu dengan senang hati penulis menerima saran dan kritikan yang membangun demi kesempurnaan tesis ini kedepan. Semoga isi dan ide yang terkandung di dalamnya berguna bagi semua pihak, secara khusus bagi masyarakat pembudidaya ikan di Indonesia. Terimakasih

Bogor, November 2006

Asprin Tamba



RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Sidikalang pada tanggal 05 Februari 1978 dari pasangan berbahagia ayahanda M. Tamba dan ibunda R. Br. Sitohang. Penulis merupakan putera pertama dari sembilan bersaudara.

Tahun 1997 penulis lulus dari SMA Taman Siswa Pematang Siantar dan pada tahun yang sama lulus Ujian Masuk Perguruan Tinggi Negeri (UMPTN) di Universitas Riau. Gelar sarjana (S-1) diperoleh dari program studi Budidaya Perairan pada Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan (MSP) Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau. Pada tahun 2002 penulis bekerja sebagai staff pengajar di Universitas Asahan Sumatera Utara sampai sekarang. Pada tahun 2004, dengan bantuan beasiswa DIKTI, penulis melanjutkan studi pada Sekolah Pascasarjana pada program studi Ilmu Perairan Institut Pertanian Bogor, lulus ujian pada tanggal 16 November 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 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 ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
PENDAHULUAN	
Latar Belakang	1
Perumusan Hipotesis	3
Tujuan dan Manfaat.....	3
TINJAUAN PUSTAKA	
Koi Herpes Virus (KHV)	5
Gejala Klinis.....	7
Polymerase Chain Reaction.....	8
Histologi	9
Hematologi	9
Sistim Pertahanan Tubuh Ikan	12
BAHAN DAN METODE PENELITIAN	
Waktu dan Tempat	15
Bahan dan Alat	15
Rancangan Percobaan.....	16
Prosedur Penelitian.....	16
Karakterisasi Keberadaan Virus Berdasarkan Gejala Klinis	16
Karakterisasi Sistim Pertahanan Tubuh Ikan	17
Karakterisasi Virulensi Virus	18
Kualitas Air	18
Analisa Data	19
HASIL DAN PEMBAHASAN	
Hasil Pengamatan.....	21
Karakterisasi Keberadaan Virus Berdasarkan Gejala Klinis.....	21
Pengamatan Histologi.....	25
Pengamatan PCR.....	27
Karasteristik Hematologi Ikan.....	30
Karakteristik Virulensi Virus	41
Pengukuran Kualitas Air	42
Pembahasan	43
Karasteristik Keberadaan Virus Berdasarkan Gejala Klinis	43
Karasteristik Hematologi Ikan.....	47
Karasteristik Virulensi Virus.....	54
Kualitas Air	55



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 literatur 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.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan.....	56
Saran	56

DAFTAR PUSTAKA	57
-----------------------------	-----------

LAMPIRAN	63
-----------------------	-----------



DAFTAR TABEL

	Halaman
1 Hasil pengamatan PCR pada ikan mas (<i>Cyprinus carpio</i>) sakit	27
2 Hasil pengamatan PCR pada ikan mas (<i>Cyprinus carpio</i>) carrier-laten	28
3 Hasil pengamatan PCR pada ikan mas (<i>Cyprinus carpio</i>) sehat.....	27
4 Pengukuran kualitas air di keramba jaring apung Waduk Cirata.....	42
5 Pengukuran kualitas air di laboratorium	42
6 Pencampuran bahan untuk uji PCR.....	67
7 Komposisi larutan formalin berpenyangga fosfat	74
8 Larutan dan waktu perendaman dehidrasi dan embedding	74

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

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Gambaran patologis insang ikan mas (<i>Cyprinus carpio</i>) yang terinfeksi virus koi herpes	22
2. Gambaran klinis pada berbagai bagian sirip ikan mas yang terinfeksi KHV	23
3. Gambaran klinis pada bagian tubuh ikan mas yang terinfeksi KHV.	24
4. Histopatologi insang ikan mas (<i>Cyprinus carpio</i>) sakit, carrier-laten dan sehat	26
5. Visualisasi hasil elektroforesis pada uji PCR ikan sakit	28
6. Visualisasi hasil elektroforesis pada uji PCR ikan carrier-laten	29
7. Visualisasi hasil elektroforesis pada uji PCR ikan sehat.....	30
8. Rataan hemoglobin ikan setiap status kesehatan ikan mas (<i>Cyprinus carpio</i>)	31
9. Rataan hematokrit ikan pada setiap status kesehatan ikan mas (<i>Cyprinus carpio</i>)	31
10. Bentuk eritrosit ikan mas (<i>Cyprinus carpio</i>).....	32
11. Rataan eritrosit pada setiap status kesehatan ikan mas (<i>Cyprinus carpio</i>)	33
12. Rataan jumlah leukosit pada setiap status kesehatan ikan mas (<i>Cyprinus carpio</i>)	34
13. Bentuk neutrofil ikan yang terinfeksi virus koi herpes.....	35
14. Rataan persentase jumlah neutrofil pada ikan sakit, carrier-laten dan sehat	36
15. Bentuk dan ukuran monosit pada ikan mas yang bersifat sakit, carrier-laten dan sehat	37
16. Rataan persentase monosit pada ikan mas ikan mas (<i>Cyprinus carpio</i>) sakit, carrier-laten dan sehat	38
17. Bentuk dan ukuran limfosit ikan mas (<i>Cyprinus carpio</i>) yang bersifat sakit, carrier-laten dan sehat	39

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.



18 Rataan persentase limfosit ikan mas yang bersifat sakit, carrier-laten dan sehat	39
19 Bentuk dan ukuran trombosit ikan mas.....	40
20 Rataan trombosit pada ikan mas sakit, carrier-laten dan sehat.....	41

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.



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1 Peta Waduk Cirata dan lokasi penelitian.....	64
2 Petak keramba pengambilan sampel	65
3 Prosedur PCR untuk KHV	66
4 Alat dan bahan PCR	69
5 Prosedur pengamatan hematologi ikan.....	70
6 Perhitungan kadar hematokrit (Svobodova and Vykosova 1991).....	72
7 Pembuatan Preparat Ulas (Svobodova and Vykosova 1991).....	73
8 Metode pembuatan preparat histologi (Yuasa <i>et al.</i> 2003)	74
9 Analisis anova one-way total eritrosit pada setiap status kesehatan ikan	76
10 Analisis anova one-way total leukosit pada setiap status kesehatan ikan	78
11 Analisis anova one-way hemoglobin pada setiap status kesehatan ikan	81
12 Analisis anova one-way hematokrit pada setiap status kesehatan ikan	83
13 Analisis anova one-way netrofil pada setiap status kesehatan ikan mas (<i>Cyprinus carpio</i>).....	85
14 Analisis anova one-way limfosit pada setiap status kesehatan ikan	86
15 Analisis anova one-way monosit pada setiap status kesehatan ikan	88
16 Analisis anova one-way monosit pada setiap status kesehatan ikan	90
17 Hasil uji virulensi virus (FID ₅₀ -120 jam).....	92

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.



PENDAHULUAN

Latar Belakang

Kasus kematian ikan mas (*Cyprinus carpio carpio*) dan koi (*Cyprinus carpio koi*) akibat serangan Virus Koi Herpes (KHV) telah menyebar ke beberapa negara di dunia (AOTA 2001, Ronen *et al.* 2003 dan Pokorova *et al.* 2005). Kasus ini pertama kali terjadi di Israel tahun 1997 (Hedrick *et al.* 2005), Eropa (tahun 1997 di Jerman; tahun 1998 di Inggris; tahun 1999 di Belgia; tahun 2001 di Belanda; tahun 2002 di Denmark; tahun 2003 di Austria, Italia, Luxemburg, Swiss dan Polandia (Pokorova *et al.* 2005) dan Amerika Serikat serta Asia.

Di benua Asia KHV telah menyebar di Korea tahun 1998 (Cho *et al.* 2005); tahun 2003 di Jepang (Ikuta *et al.* 2005), tahun 2002 di Indonesia (Sunarto *et al.* 2005) dan tahun 2003 di Taiwan (Englesma and Heanen 2005). Di Indonesia, KHV menyebar mulai dari Blitar, Subang dan Waduk Cirata pada tahun 2002, Lubuk Lingau Sumatera Barat pada Februari 2003 (Sunarto *et al.* 2005). Kasus serangan KHV telah terjadi berulang kali di Waduk Cirata, Waduk Jatiluhur Jawa Barat, Danau Toba Sumatera Utara dan Danau Singkarak Sumatera Barat

Kematian ikan mas akibat serangan KHV secara alami dapat mencapai 80 % (Hartman 2004), bahkan pada infeksi buatan, mortalitas mencapai 82 % dalam waktu 15 hari (Ronen *et al.* 2003) serta mencapai 80 – 95 % (Sunarto *et al.* 2005). Kasus kematian ikan mas ini sangat merugikan dan mengancam kelangsungan usaha budidaya di sentra-sentra produksi ikan mas. Kematian ikan yang mencapai 80-95 % terjadi sebagai akibat serangan KHV yang sangat menular dan virulen (Gilad *et al.* 2002) dan diikuti rendahnya kemampuan sistem imun yang dimiliki ikan mas. Kematian ini terutama terjadi ketika suhu perairan rendah yaitu 22-27 °C (AOTA 2001).

Setelah terjadi kematian ikan mas secara massal karena serangan KHV, sebagian kecil ikan masih mampu bertahan hidup. Individu yang bertahan hidup (survivors) sekitar 20 % dan akan menjadi tahan terhadap infeksi berikutnya (Tauhid *et al.* 2004). Informasi dari pembudidaya ikan di Waduk Cirata menyatakan bahwa belakangan ini mortalitas akibat KHV di keramba budidaya ikan mulai mengalami penurunan mencapai 60-70 %. Anderson (1974) menyatakan bahwa ketika ikan terpapar pada patogen ada 3 kemungkinan yang

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.

dapat terjadi yakni : 1) mortalitas ikan, dimana proliferasi patogen menyebabkan kematian inang; 2) penyembuhan ikan, dimana sistem pertahanan tubuh mampu mengeliminasi patogen dan 3) terjadinya carrier, dimana terjadi keseimbangan antara ikan dengan penyebab penyakit. Penurunan mortalitas ini merupakan hasil interaksi antara ikan, patogen dan lingkungan, dimana ikan sebagai inang (*host*) kemungkinan telah terbentuk ketahanan atau kekebalan ikan terhadap KHV, sedangkan pada virus, kemungkinan telah terjadi penurunan virulensi KHV.

Ikan yang terpapar organisme penyebab penyakit seperti virus dapat dapat menyebabkan ikan bersifat rentan, laten dan resisten. Plumb (1994) menyatakan "diantara populasi, strain dan individu ikan tidak selalu peka terhadap beberapa infeksi penyakit". Ini menunjukkan adanya tingkat resistensi alami terhadap infeksi penyakit. Ketahanan alami (*natural resistance*) menunjukkan kemampuan inang secara hereditas untuk mengalahkan patogen sehingga tidak muncul penyakit. Daya tahan alami ikan ini merupakan salah satu faktor penting untuk menghalangi infeksi penyakit. Daya tahan alami dapat diperlihatkan dengan kemampuan fagositik oleh leukosit, makrofag dan komponen serum non spesifik (interferon, komplemen dan lainnya).

Sejalan dengan penyebaran serangan KHV di beberapa negara, para peneliti telah melakukan berbagai kajian baik berupa karakterisasi virus KHV, informasi penyebaran maupun upaya pengendalian. Parelberg *et al.* (2003) mengemukakan bahwa infeksi KHV melalui kohabitasi, carp mengalami kematian mencapai 68 % dan sisanya sebagai ikan tahan (*resisten*) dan carrier. Ronen *et al.* (2003) mengemukakan bahwa ketahanan alami carp akan berkembang setelah terpapar virus KHV 3-5 hari pada suhu 23°C dan ditambahkan bahwa, vaksin dari virus KHV yang dilemahkan (*attenuated*) bersifat non patogen dapat digunakan sebagai vaksin hidup untuk menginduksi ketahanan carp terhadap KHV. Amrullah (2004) menyatakan bahwa penambahan *Spirulina platensis* dalam pakan dengan dosis 4 %. kg⁻¹ dengan periode pemberian diskontinu dan lama pemberian 28 hari dapat meningkatkan ketahanan koi terhadap virus KHV dengan persentase ikan terinfeksi 20 %. Shapira *et al.* (2005) telah menemukan bahwa ikan carp hasil persilangan antara jenis dor-70 yang rentan KHV dengan sasan liar yang lebih tahan memperoleh tingkat ketahanan mencapai 60,7 % setelah diinfeksi secara

kohabitasi. Parelberg *et al.* (2005) menyatakan bahwa vaksin yang aman dan sesuai dapat dikembangkan dari virus KHV yang dilemahkan. Umumnya kajian ini dilakukan sebagai upaya untuk memperoleh ikan yang memiliki ketahanan alami dan menginduksi kinerja sistim imun ikan.

Informasi hematologi seperti jumlah, jenis, struktur, morfologi sel darah dan kandungan biokimia darah telah banyak digunakan sebagai protokol diagnosa kesehatan ikan. Svobodova and Vykusova (1991) menyatakan bahwa analisis darah berguna untuk tujuan diagnosis, sebagian dari tujuan ini meliputi evaluasi keberadaan substansi toxic pada ikan, evaluasi kondisi ikan, evaluasi ketahanan non-spesifik ikan, evaluasi pengaruh stres dan evaluasi kemampuan memanfaatkan makanan pada ikan. Blaxhall (1973) metode hematologi membantu menyediakan bukti dan identifikasi abnormalitas dan proses terjadinya penyakit.

Kajian hubungan KHV dengan ikan mas berdasarkan karakter keberadaan virus, hematologi dan virulensi KHV di lapangan masih sedikit yang diteliti, secara khusus karakter tersebut berdasarkan perbedaan status kesehatan ikan belum diteliti. Informasi imunitas ikan mas dan virulensi KHV ini diharapkan dapat membantu menunjukkan peluang-peluang pengembangan proteksi, penanganan dan pengendalian serangan KHV terhadap ikan mas.

Perumusan Hipotesis

Penurunan tingkat mortalitas ikan mas dari serangan KHV terjadi akibat peningkatan kemampuan sistim imun ikan dan atau terjadinya penurunan virulensi virus KHV

Tujuan dan Manfaat

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Untuk melakukan konfirmasi keberadaan virus KHV pada ikan yang menunjukkan gejala klinis dan tidak menunjukkan gejala klinis (bersifat carrier-laten).
2. Mengetahui karakter hematologi ikan mas pada ikan sakit, carrier-laten dan sehat.
3. Mengetahui karakter virulensi virus baik yang bersifat virulen, penurunan virulensi atau kemungkinan munculnya virus yang bersifat avirulen.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi awal karakter ikan mas yang memungkinkan dapat digunakan sebagai calon induk dan benih-benih tahan KHV melalui program pengembangbiakan ikan (*breeding program*) serta virus yang bersifat avirulen yang memungkinkan digunakan sebagai calon vaksin.

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

TINJAUAN PUSTAKA

Koi Herpes Virus (KHV)

Virus herpes merupakan salah satu virus yang berbiak dalam inti sel inang dan membentuk badan inklusi yang disebut cowdry type A. Penyebaran virus dari sel ke sel melalui jembatan antar sel karena bersatunya sel-sel (*cell fusion*), dengan demikian tidak ada kontak antara virus dengan lingkungan di luar sel. Apabila virus herpes telah menginfeksi inang, maka sejumlah virus ini akan tetap tinggal dalam bentuk laten seumur hidup inangnya (Malole 1987). Virus herpes merupakan virus yang berukuran besar dibandingkan dengan virus lain. Secara morfologi, anggota virus herpes mempunyai bentuk yang serupa. Morfologi, struktur virus herpes dari arah dalam keluar terdiri dari genom DNA untai ganda linear, kapsid, lapisan tegumen dan selubung (Daili dan Makes 2002)

KHV adalah virus dsDNA *herpesvirus-like patogen* yang terdiri atas 31 polipeptida virion dan sedikitnya 8 glikosilat protein, 12 dari polipeptidanya memiliki berat yang sama dengan molekul dari semua *herpesvirus cyprinid* (CHV) dan 10 peptidanya mirip dengan *channel catfish virus* (CCV) (Pokorova *et al.* 2005 dan Gilad *et al.* 2002). Virion mengandung kapsid bagian dalam dengan bentuk isohedral simetri berdiameter sekitar 100-110 nm. Virion matang mengandung amplop, sehingga diameter keseluruhan 170-230 nm. Komponen utama amplop adalah lipoprotein berlapis ganda. Secara morfologi dan ukuran sama dengan virus famili *herpesviridea*. Ukuran genom KHV diperkirakan sekitar 277 kbp. Sekitar 250 kbp yang diketahui adalah anggota herpesviridea (Ronen *et al.* 2003).

Replikasi paling baik KHV terjadi pada kultur sel sirip koi (KF-1) yaitu pada suhu 20-25 °C namun pada suhu 30 °C atau 4 °C tidak menunjukkan pertumbuhan dan pada suhu 10 °C hanya terjadi pertumbuhan minimal (Gilad *et al.* 2003 dalam Hedrick 2005). Engelsma and Haenen (2005) menyatakan umumnya KHV dideteksi dengan menggunakan PCR, baik disertai dengan atau tanpa pengamatan histopatologi insang sebagai metode konfirmasi. Di beberapa kasus KHV telah sukses dikultur pada sel epitel carp (EPC) atau sirip koi (KF-1). Hedrick *et al.* (2000) dengan metode *fluorescent antibody test* (FAT)

menemukan reaksi serum anti-CHV (*cyprinus herpes virus*) terhadap antigen pada sel terinfeksi CHV. Antigen virus ditemukan pada nukleus dan sitoplasma, tetapi belum ada bukti perlekatan (*binding*) antar antibodi anti CHV terhadap antigen.

Pada suhu rendah aktivitas sistim imun tubuh ikan menurun, namun aktivitas imun akan meningkat bersama peningkatan suhu. Temperatur optimum untuk virus KHV berada antara 18-27° C. Sebagian besar mortalitas terjadi pada suhu 22-27°C dan tidak ada kejadian pada suhu 30°C atau di atasnya. Jadi perubahan suhu yang besar antara 18-27° C, maka serangan terjadi jika ada virus KHV (OATA 2001). Ronen *et al.* (2003) menyatakan meskipun penyakit sangat menular dan virulen, namun morbiditas dan mortalitas terbatas pada koi dan common carp

Diagnosa virologis terhadap KHV dilakukan melalui 2 pendekatan yaitu secara langsung dan tidak langsung (Tauhid *et al.* 2004). Pendekatan langsung dilakukan untuk melihat keberadaan virus atau partikel virus, meliputi isolasi dan identifikasi virus secara *in vitro* pada kultur jaringan dengan pengamatan *cytopathic effect* (CPE), penggunaan mikroskop elektron untuk pengamatan partikel virus dan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) untuk mendeteksi DNA virus. Sedangkan secara tidak langsung dilakukan dengan mendeteksi respon dari inang akibat infeksi virus (misalnya antibodi). Diagnosa tidak langsung dilakukan dengan metode *enzim linked immunosorbent assay test* (uji ELISA) dan *fluorescent antibody technique* (FAT)

Karakter ikan mas dan koi yang terinfeksi KHV telah dilakukan melalui 3 level diagnosa. Metode diagnosa ini didasarkan pada FAO/NACA/OIE (Sunarto *et al.* 2005) yakni : pengamatan lapangan dan gejala klinis (level 1), perubahan histopatologi (level 2) dan biologi molekuler (level 3). Karakter kematian ikan mas dan koi yang tinggi dalam 7 hari dengan menunjukkan kerusakan insang (level 1), secara histopatologi adanya penemuan amphophilik intranuklear badan inklusi dengan marginasi kromatin periperal pada sel epitel insang (diagnostik level 2) dan deteksi PCR menggunakan primer spesifik (diagnostik level 3). Karakter gejala klinis (level 1) yang telah umum dikenal yaitu munculnya warna pucat pada insang dan terdapat bercak putih (Tauhid *et al.* 2004 dan Hedrick *et al.* 2005)

Gejala Klinis

Menurut Hedrick *et al.* (2000) penyakit KHV menyebabkan kematian yang besar dan bersifat sporadis pada ikan koi dan mas. Hasil penelitian menggunakan mikroskop menunjukkan bahwa ikan mas yang terinfeksi memperlihatkan adanya kelainan pada insang dan organ internal seperti ginjal, limpa, jantung dan saluran pencernaan. Pada insang terjadi hipertropi, hiperplasia dan fusi pada lamela sekunder insang. Selanjutnya Sunarto *et al.* (2005) menyatakan gejala klinis ikan terinfeksi adalah latergik, hilangnya keseimbangan dan megap-megap. Gejala umum meliputi epitel terkelupas dengan kehilangan mukus dan kulit tampak kasar atau lesi mirip melepuh pada kulit, pendarahan (*haemorages*) pada operkulum, sirip, ekor dan perut dan beberapa kerusakan insang. Pengamatan menggunakan mikroskop elektron, menunjukkan adanya hipertropi dan perpindahan kromatin sel dan ditemukan nucleokapsid virus berbentuk hexagonal dengan diameter 110 nm. Melalui mikroskop elektron virion herpesviridea memiliki inner kapsid dengan simetri isosadektahedron berdiameter 100-110 nm (Hedrick *et al.* 2005).

Gejala eksternal serangan KHV tampak pada ikan sakit seperti pembengkakan dan nekrosis filamen insang, produksi mukus berlebihan atau adanya bercak warna pada kulit dan eksoptalmus. Secara internal terjadi pembesaran ginjal dan limpa ikan (Hedrick *et al.* 2005).

Menurut Tauhid *et al.* (2004) bahwa serangan koi herpes virus menunjukkan gejala-gejala 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 (sebenarnya adalah kematian sel-sel insang atau nekrosis insang), selanjutnya menjadi rusak, geripis pada ujung tapis insang dan akhirnya membusuk. Secara makroskopis menunjukkan adanya kerusakanaringan yang serius serta kematian sel yang berat, 3) pendarahan (*haemorage*) di sekitar pangkal dan ujung sirip serta permukaan tubuh lainnya, 4) adanya kulit melepuh, 5) hati berwarna pucat selanjutnya menjadi rusak, 6) ginjal (anterior dan posterior) berwarna pucat.

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.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR adalah reaksi memperbanyak DNA secara *in vitro* dengan memanfaatkan cara replikasi DNA dengan bantuan enzim DNA polimerase dan perubahan sifat fisik DNA terhadap suhu (Lisdiyanti 1997). Muladno (2002) menyatakan bahwa PCR merupakan suatu reaksi *in vitro* untuk menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang komplemen dengan molekul DNA target tersebut dengan bantuan enzim dan oligonukleotida sebagai primer dalam suatu thermocycler.

DNA murni virus dengan jumlah memadai dapat diperoleh dengan cara mengisolasi DNA dari inang kemudian mengamplifikasinya. Erlich (1989) menyatakan bahwa PCR adalah sebuah metode *in vitro* yang digunakan untuk mensintesa DNA tertentu secara enzimatik dengan menggunakan dua primer oligonukleotida yang menghibridisasi pita yang berlawanan dan mengapit daerah target DNA

Tiga tahapan utama dalam teknik PCR yakni : denaturasi (*denaturation*) utas ganda DNA (*dsDNA*) menjadi utas tunggal (*ssDNA*) sehingga suatu primer pertama yang merupakan titik awal dari penggandaan DNA akan menempel pada utas tunggal template komplementernya (*annealing or hybrisation*) yang kemudian mengalami pemanjangan (*elongation or extended*) yang dimulai dari ujung 5' kearah ujung 3' dengan menambahkan basa-basa nukleotida berpasangan dengan basa-basa komplementer yang terletak pada *ssDNA* (Solihin 2006).

Yuasa *et al.* (2003) menyatakan bahwa metode PCR umumnya digunakan untuk mendeteksi virus. Dibandingkan dengan kultur sel, PCR dapat memperjelas hanya bagian dari DNA/RNA virus, sehingga virus dapat dideteksi meskipun pada kondisi yang tidak murni. Shariff *et al.* (2000) menyatakan bahwa PCR merupakan teknik diagnostik molekuler terkini, yang memiliki sensitifitas yang mampu untuk mengamplifikasi bahkan dari molekul tunggal DNA, juga sangat spesifik sesuai dengan oligonukleotida primer yang dibutuhkan untuk proses amplifikasi. PCR juga cepat dan hanya dalam hitungan menit jutaan copi segmen DNA tunggal diproduksi.

Optimalisasi parameter uji PCR diperoleh melalui sekuensing DNA target dari virus yang dimurnikan dari hasil pengujian atau yang secara alami menyerang koi. Kondisi amflifikasi yang terbaik pada fragmen spesifik 484 bp dengan

pencampuran 2mM MgCl₂, 1 x buffer, 400 µM deoxynukleotida triposfat, 30 pmol primer, 1 U Taq polymerase, template 70 sampai 100 mg DNA; kondisi siklus suhu awal 95 °C selama 5 menit, siklus suhu 35 kali, denaturasi 94 °C selama 1 menit, annealing 68 °C selama 1 menit, elongase 72°C selama 30 detik, dan akhir siklus 72 °C selama 7 menit. Primer forward KHV9/5F : 5'-GACGACGCCGGAGACCTTGTG-3' dan primer reverse 5'-CACAAGTTCAGTCTGTTCTAAC-3' (Gilad *et al.* 2002).

Histopatologi

Histologi merupakan teknik yang digunakan untuk mempelajari jaringan normal, sedangkan untuk pengamatan kelainan-kelainan pada jaringan disebut teknik histopatologi. Preparasi jaringan meliputi beberapa langkah termasuk fiksasi jaringan, dehidrasi, embedding sampel, preparasi sektion, pewarnaan dan mounting jaringan (OIE 2003).

Penemuan secara histopatologi mengungkapkan masa proliferasi pada epitel insang dengan perubahan degenerasi dan nekrosis, badan inklusi intranuklear pada sel terinfeksi. Pengujian mikroskopik hati, ginjal dan limpa dan saluran pencernaan menunjukkan nekrosis sel parenkim serta sejumlah makropag pada sel bekas peninggalan virus (Pokorova *et al.* 2005).

Tauhid *et al.* (2004) menyatakan bahwa pengamatan terhadap beberapa irisan organ ikan sakit adalah ditemukannya intranuklear badan inklusi, pembesaran (*hipertropi*) pada filamen insang dan nekrosis tahap lanjut. Selain itu ditemukan adanya *eosinofilik inclusion bodies* (EICIB-like) serta *intranuclear inclusion bodies* di area yang mengalami nekrosis.

Hematologi

Darah ikan tersusun atas sel-sel darah yang tersuspensi dalam plasma dan beredar ke seluruh tubuh melalui sistem sirkulasi tertutup, terdiri atas sel darah merah dan sel darah putih. Sel dan plasma darah mempunyai peran fisiologis yang sangat penting. Perubahan gambaran darah dan kimia (secara kualitatif maupun kuantitatif), dapat menentukan kondisi kesehatan ikan. Affandi dan Tang (2002) menyatakan bahwa ulasan darah perifer dari ikan sehat menunjukkan jumlah sel

darah merah yang lebih besar dibandingkan sel darah lainnya seperti limfosit, neutrofil, monosit dan trombosit.

Anderson (1974) menyatakan bahwa pengetahuan tentang hematologi sangat penting, karena menunjukkan morfologi, fisiologi dan biokimia darah serta jaringan pembentuk darah. Melalui analisis karakteristik sel darah menjadi petunjuk diagnosa dan prognosis situasi penyakit ikan. Ketika sampel darah diambil dengan tabung kapilari dari ikan dan disentrifus untuk memisahkan sel dengan serum, maka rasio fraksi selular terhadap total volume darah disebut hematokrit. Tes hematologi lain meliputi test hemoglobin untuk kalibrasi jumlah pigmen sel darah merah, perhitungan difrensial sel untuk memberikan informasi perbandingan jumlah dan perbedaan jenis sel darah, serta ulas darah untuk mempelajari morfologi seluler.

Teknik hematologi termasuk pengukuran hematokrit, jumlah eritrosit, jumlah leukosit, telah terbukti bernilai untuk biologi perikanan dalam menduga kesehatan ikan (Blaxhall 1972), monitoring respon stress, jaringan darah ikan menunjukkan tanda kondisi lingkungan dan fisiologi ikan. Akhir-akhir ini, parameter darah secara umum digunakan untuk mengamati kesehatan ikan (Orun *et al.* 2003), evaluasi efektivitas penggunaan pengaruh pengobatan (Ispir and Dorucu 2005), evaluasi resiko ekotoksikologi yang disebabkan oleh pestisida terhadap lingkungan dan organisme (Svobodova *et al.* 2003), evaluasi pengaruh infeksi parasit seperti *Geozia leporini* (Martins *et al.* 2004), pengamatan kemampuan aktifitas fagositik and bakterisidal trombosit darah pada carp (*Cyprinus carpio*) (Stoksit *et al.* 2002). Svobodova and Vykosova (1991) menyatakan bahwa analisis darah periperal berguna untuk berbagai tujuan, sebagiannya untuk pengujian pengaruh substansi toksit pada ikan, evaluasi kondisi ikan, evaluasi pertahanan non spesifik dan evaluasi pengaruh kondisi stress.

Affandi dan Tang (2002) menyatakan bahwa eritrosit yang sudah matang adalah berbentuk ellips berukuran panjang 13-16 mikron dan lebar 7-10 mikron dan mempunyai sitoplasma yang homogen. Inti terletak di tengah, berbentuk ellips dan memiliki kromatin yang kompak. Sel darah putih ikan tidak berwarna, jumlahnya setiap mm³ berkisar 20.000 – 150.000 butir. Svobodova and Vykosova (1991) menyatakan bahwa leukosit meliputi agranulosit dan granulosit. Perbedaan

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

utama ditandai oleh ada tidaknya perbedaan warna granula pada sitoplasma. Agranulosit terdiri dari limfosit dan monosit dengan sitoplasma yang tidak bergranula. Ukuran limfosit antara 7 – 9 μ , monosit 15 - 18 μ , granulosit antara 5 - 10 μ , eosinofil 8 -12 μ dan basofil sekitar 10 μ .

Iwama dan Nakanishi (1996) menyatakan bahwa granulosit dibagi menjadi sub divisi yakni neutrofil, eosinofil dan basofil. Neutrofil dan basofil merupakan bentuk umum, namun basofil sering tidak ada pada ikan. Makropag dapat diisolasi dengan mudah dari bermacam sumber termasuk saluran darah, organ limfoid dan jantung. Makropag secara fungsional merupakan perangkat sel untuk respon limfosit umumnya untuk fagositik, dapat mengekspresikan oksigen dan nitrogen radikal bebas dan dapat membunuh patogen (bakteri dan larva cacing).

Sel-sel fagositik mononuklear mempunyai 2 fungsi, yaitu pertama sebagai fagosit dengan fungsi utama menghancurkan antigen dalam fagolisosom serta melepaskan berbagai enzim dan isi granula ke luar sel yang bersama-sama dengan sitokin seperti *tumor necrosis factor* (TNF) dapat menyebabkan kerusakan sitotoksik pada berbagai sel sasaran dan kedua sebagai *antigen presenting cells* (APC) yang fungsinya menyajikan antigen kepada limfosit (Kresno 2001). Anderson (1974) menyatakan bahwa produksi antibodi merupakan fungsi utama limfosit.

Penelitian Orun *et al.* (2003) menunjukkan parameter hematologi ikan berdasarkan musim pada ikan *Cyprinus macrotomus* pada lingkungan alami yakni persentase neutrofil $7,6 \pm 0,44$ %, limfosit $82 \pm 2,16$ %, monosit $9,12 \pm 0,8$ %, hemoglobin $7,96 \pm 0,28$, hematokrit $26,40 \pm 1,12$ %. Pada carp sehat ditemukan hematokrit 28 – 40 %, total limfosit mencapai 76-97,5 %, monosit 3-5 %, neutrofil 2-10 % dan eosinofil 0-1 % serta basofil 0 % (Svobodova and Vykosova, 1991).

Orun *et al.* (2003) menyatakan bahwa peningkatan tingkat parameter darah terjadi untuk memenuhi kebutuhan energi, sedangkan jumlah eritrosit, hemoglobin, hematokrit disebabkan oleh tingginya aktivitas metabolisme.

Sistim Pertahanan Tubuh Ikan

Fenner *et al.* (1995) menyatakan bahwa sebagai respon terhadap infeksi yang terus-menerus akibat serangan mikroorganisme dan virus, maka vertebrata membentuk sistim pertahanan tubuh yang disebut sistim imun. Menurut Baratawidjaja (2002) sistim pertahanan tubuh terbagi atas pertahanan non spesifik dan spesifik. Selama virus masuk ke dalam tubuh, maka sistim imun akan mempengaruhi makromolekul virus tertentu (protein atau karbohidrat) sebagai benda asing yang disebut antigen.

Pertahanan non spesifik merupakan pertahanan tubuh terdepan menghadapi serangan berbagai mikroorganisme, oleh karena itu dapat memberikan respon langsung terhadap antigen, sedangkan sistem pertahanan spesifik membutuhkan waktu untuk mengenal antigen terlebih dahulu sebelum dapat memberikan responnya. Disebut pertahanan non spesifik karena tidak ditunjukkan terhadap mikroorganisme tertentu dan telah ada sejak lahir. Komponen non spesifik seperti imunitas natural atau bawaan (*innate*) yang prinsipnya memiliki mekanisme fagositosis yang berkaitan dengan makrofag dan leukosit bergranula seperti neutrofil yang dirangsang untuk menyerang mikroorganisme yang menginvasi kulit ikan dan mukus. Tambahan fagositik adalah faktor pelarut seperti lysozim dan komplemen yang menghancurkan patogen penyerang (Halver 2002).

Kresno (2001) menyatakan bahwa pertahanan non spesifik meliputi pertahanan fisik dan kimiawi seperti epitel dan substansi antimikrobal yang diproduksi pada permukaan tubuh, berbagai sitokin dan sel-sel fagosit yaitu polinuklear dan makropag serta natural killer. Mukus, sisik, epidermis dan dermis tergolong pertahanan non spesifik pada ikan (Anderson 1974); komponen imunitas bawaan teleostei meliputi leukosit (monosit, granulosit, jaringan makropag), komplemen (C3), prose inflamasi, non-fagositik cytotoksik sel (NCC) (Traver *et al.* 2003); kulit dan mukus merupakan pertahanan pertama pada carp, pertahanan kedua adalah sel (termasuk makropag dan granulosit) dan faktor humoral sistim imun bawaan (Huttenhuis 2005). Respon imun spesifik memiliki ciri utama yakni 1) spesifitas terhadap komponen antigen; 2) diversitas terhadap berbagai antigen yang berbeda; 3) memori untuk mengingat antigen yang pernah menginfeksi, spesialisasi sebagai respon imun dengan cara yang berbeda terhadap

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.

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.

antigen yang berbeda; 4) membatasi diri (*self limitation*) sebagai kemampuan untuk mereda kembali setelah rangsangan terhadap antigen; 5) membedakan sel dan non-self. Sel limfosit merupakan sistim imun spesifik (Kresno 2001)

Sistim fagositik-mononuklear merupakan turunan terdekat dari sel monosit yang masuk aliran darah selama beberapa hari, selanjutnya masuk ke dalam jaringan dan berkembang menjadi makrofag. Makropag pertama kali muncul pada umur 48 jam setelah fertilisasi pada ikan mas (Huttenhuis 2005). Fungsi utama sel sistim fagositik mononuklear adalah melakukan fagositosis dan menghancurkan partikel asing dan jaringan mati atau mengolah bahan asing sehingga bahan tersebut dapat membangkitkan tanggap kebal. Disamping itu, makrofag juga dapat mengatur reaksi kebal, membuat protein dari sistem komplemen dan mengeluarkan bahan yang mempengaruhi proses pendarahan (Tizard 1988).

Respon humoral merupakan respon yang bersifat spesifik dilakukan oleh substansi yang dikenal sebagai antibodi atau imunoglobulin (Anderson 1974). Sistim imun adaptif pada carp mulai berkembang usia 4 hari setelah menetas dan secara fungsional mulai bekerja antara 1 dan 2 minggu (Huttenhuis 2005). Komponen spesifik sistim imun terdiri atas respon humoral dan yang diperantarai sel (*immediate-sel*) yang menyediakan memori spesifik imunologi, meskipun imun memori pada ikan umumnya kurang berkembang daripada manusia. Pada respon imun spesifik, makrofag berperan sebagai sel *antigen-presenting*. T limfosit terlibat dalam imunitas *mediated-sel* dengan merangsang diferensiasi dan proliferasi limfosit B. Ketika antibodi diproduksi terhadap patogen spesifik yang mengikat patogen sehingga dapat menghancurkannya melalui aktivasi sistim komplemen (Halver 2002). Ellis (1988) memperlihatkan bahwa kemampuan antibodi akan meningkat setelah terjadi infeksi lanjutan atau seperti booster pada vaksinasi ikan.

Untuk melawan organisme intraseluler diperlukan respon imun seluler yang merupakan fungsi limfosit T. Sub populasi sel T yang disebut sel T penolong (*T-helper*) akan mengenali mikroorganisme atau antigen bersangkutan melalui MHC (*major histocompatibility complex*) kelas II yang terdapat pada permukaan sel makrofag. Sinyal ini menginduksi limfosit untuk memproduksi berbagai jenis limfokin, termasuk diantaranya interferon yang dapat membantu makrofag menghancurkan mikroorganisme tersebut. Sub populasi limfosit T yang lain

disebut *T-sitotoksit*, berfungsi untuk menghancurkan mikroorganisme intrasel yang disajikan melalui MHC kelas I secara langsung (sel ke sel). Selain itu, juga menghasilkan gamma interferon yang mencegah penyebaran mikroorganisme ke dalam sel lain (Kresno 2001).

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 kritikan 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.



BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat.

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium UPT Balai Pelestarian Perairan Umum dan Perikanan (BPPUP) Jawa Barat-Cirata, keramba jaring apung Waduk Cirata (Lampiran 1 dan 2), dan Laboratorium Kesehatan Ikan FPIK-IPB. Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari sampai Agustus 2006.

Bahan dan Alat

Alat-alat yang digunakan meliputi : autoclaf, oven, lemari es, mikro tube, thermal cycler, sentrifuse, trans-illuminator, mikropipet ukuran 0,1-10 μ l, 10-100 μ l, 27 buah akuarium ukuran 80 x 60 x 40 cm³ dan perlengkapannya, botol film, haemocytometer, alat suntik, objek glass, cover glass, mikroskop, mikrotom, water bath, satu set sahlimeter, alat bedah, kamera digital, perahu, pH meter, sechi disk, thermometer dan mortar.

Bahan-bahan yang digunakan yakni : ikan mas dengan ukuran panjang total $12,4 \pm 1,01$ cm pada pengamatan lapangan dan ukuran $8,11 \pm 0,55$ cm untuk uji virulensi, pakan ikan. Kid isolasi DNA ikan menggunakan genomic prep cells & tissue DNA isolation kit yang terdiri atas larutan sel lisis, RNase, larutan pengendap protein, isopropanol, dan pelarut DNA, akuabides. Untuk PCR digunakan bahan primer mix KHV 398 (100 pmol/ μ l), DNA template kontrol negatif, primer mix KHV 398 (100 pmol/ μ l), DNA template kontrol negatif, DNA template, kontrol positif KHV, ddH₂O PCR-grade, pureTag Ready-To-Go PCR beads merek Amersham Biosciences, 10 x sample loading buffer dye, ethidium bromida, agarose DNA. Sekuen primer untuk PCR yakni F290 5'-GACACCACATCTGCAAGGAG-3' dan R290 5'-GACACATGTTACAATGGTGGC-3'. Pengamatan darah menggunakan bahan Na-citrat, hayem, turk, gyemsa, metanol, alkohol dan akuades. Bahan untuk pembuatan preparat histologi meliputi alkohol absolut, alkohol 95 %, alkohol 80 %, xylel, hematoksin, eosin, buffer formalin dan akuades. Pada uji virulensi, bahan

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.

yang digunakan meliputi insang ikan, larutan fisiologis, es batu, antibiotik penecilin dan streptomycin, methilen blue serta kalium permanganat

Rancangan Percobaan

Metode yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah metode survey lapangan dan eksperimental laboratorium. Survey lapangan meliputi pengamatan lapangan, penentuan petak sampling, pelaksanaan sampling, seleksi ikan berdasarkan status kesehatan ikan, karakterisasi hematologi ikan sedangkan eksperimental laboratorium yakni karakterisasi virus melalui uji virulensi. Keramba-keramba dijadikan sebagai unit percobaan yang dipilih secara acak sebanyak 10 unit petak keramba dari 6 kepemilikan keramba, sedangkan ikan-ikan yang terdapat di dalamnya dijadikan sebagai satuan percobaan yang disampling secara purposif. Total ikan yang akan diambil sebanyak 400 ekor. Variabel yang akan ditera dan diukur meliputi, gejala klinis, hematologi (hemoglobin, hematokrit, jumlah eritrosit, jumlah leukosit, difrensial leukosit (neutrofil, limfosit, monosit dan trombosit), hasil uji PCR, histologi, virulensi virus dan kualitas air.

Prosedur Penelitian

Karakterisasi Keberdaan KHV Berdasarkan Gejala Klinis

Air yang digunakan untuk pengamatan di lapangan bersumber dari sumur tanah yang disedot dengan pompa air. Kemudian air ditampung dalam bak penampungan awal. Pengendapan selama 3 tahap. Pengendapan pada petak penampungan awal dan kedua dilakukan selama 10 hari, selanjutnya pada penampungan ke-3 (sebelum digunakan) diendapkan selama 4 hari. Selama pengendapan dilakukan aerasi. Sedangkan untuk pengamatan laboratorium, air diendapkan 48 jam dan diberi methilen blue sebagai treatment.

Pengambilan sampel ikan dilakukan pada 10 petak keramba jaring apung Waduk Cirata. Dari semua keramba diambil total sampel sebanyak 400 ekor ikan berukuran panjang total $12,4 \pm 1,01$ cm. Pada saat pengambilan sampel, ikan dipisahkan berdasarkan munculnya gejala klinis seperti insang robek, antar lamella

insang terpisah, bagian ujung lamella insang putus, insang memutih, insang pucat, dan adanya perubahan warna, munculnya pendarahan, permukaan tubuh melepuh (Hedrick *et al.* 2000, Tauhid *et al.* 2004 dan Sunarto 2005). Ikan yang menunjukkan gejala klinis dikategorikan sebagai ikan sakit, selanjutnya ikan yang tidak menunjukkan gejala klinis dikategorikan sebagai ikan carrier-laten dan sehat. Sebanyak 300 ekor ikan yang tidak menunjukkan gejala klinis dimasukkan ke 5 unit akuarium berukuran 80 x 60 x 40 cm³ (30 ekor/wadah), selanjutnya dilakukan uji stressor dengan perlakuan fluktuasi suhu yaitu dari 28 °C menjadi 24 °C (AOTA 2001) selama 16 hari. Ikan yang tidak menunjukkan gejala klinis dikategorikan sebagai ikan sehat

Untuk memastikan status kesehatan ikan baik sakit, carrier-laten dan sehat maka dilakukan uji PCR. Sebanyak 10 ekor dari masing-masing kategori kesehatan ikan diambil secara acak, kemudian dilakukan uji PCR. Pelaksanaan uji PCR meliputi ekstraksi DNA ikan, siklus suhu (mencakup denaturasi, annealing dan extension), elektroforesis dan visualisasi pada sinar ultraviolet (UV) (Protokol Sentra Biosains 2004) sesuai Lampiran 3. Kemudian dari setiap status kesehatan ikan, disampling secara acak 1 ekor yang digunakan untuk pengamatan histologi (Yuasa *et al.* 2003) sesuai Lampiran 8

Karakterisasi Sistem Pertahanan Tubuh Ikan

Pada setiap kategori status kesehatan ikan yaitu karakter ikan sehat, carrier-laten dan sakit dilakukan melalui karakterisasi hematologi. Karakterisasi ketahanan ikan dilakukan melalui pengamatan kondisi hematologi. Parameter hematologi yang akan diukur meliputi kadar hematokrit (Anderson dan Swicki 1993), hemoglobin (Wedemeyer and Yusutake 1977), total eritrosit (Blaxhall and Daisley 1973), total leukosit (Blaxhall and Daisley 1973), difrensial leukosit (Svobodova and Vykusova 1991). Dari masing-masing kelompok ikan diambil sampel 30 ekor. Prosedur pengamatan parameter hematologi dan ketahanan sesuai Lampiran 5, 6 dan 7.

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.

Karakterisasi Virulensi Virus

Karakterisasi virulensi virus bertujuan untuk melihat tingkat virulensi virus yakni kemungkinan KHV virulen, penurunan virulensi atau munculnya virus avirulen. Untuk memperoleh informasi tersebut, maka sebanyak 3 ekor ikan mas sakit dan 3 ekor yang carrier-laten yang positif pada pengujian PCR, diambil organ insangnya untuk diekstraksi.

Preparasi inokulum virus dilakukan dengan cara : 1) insang ikan yang positif terserang KHV dipisahkan dari tubuh dan dicuci dengan larutan fisiologis (NaCl 0,85 %), kemudian dicincang dan dihaluskan dengan mortar, setelah itu ditambahkan NaCl 0,85 % dengan pengenceran 10 % (w/v). 2) larutan tersebut disentrifuse selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm, kemudian diambil supernatant dan dipindahkan ke tabung lain. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi 10.000 rpm selama 15 menit dan ditambahkan dengan antibiotik (streptomycin sebanyak 10.000 IU/ml sampel dan ampicilin sebanyak 10.000 µg/ml sampel) untuk menghindari kontaminasi bakteri; 3) supernatant hasil sentrifugasi merupakan larutan baku virus KHV sebagai sumber virus. Preparasi ini dilakukan pada suhu dingin.

Sebanyak 60 ekor ikan bebas KHV berukuran $8,11 \pm 0,55$ cm diaklimatisasikan selama 2 hari di dalam akuarium pemeliharaan. Untuk memastikan bebas KHV, dilakukan dengan stessor fluktuasi suhu mencapai 24°C . Kemudian sebanyak 5 ekor ikan dengan 3 ulangan disuntik dengan KHV yakni pada pengenceran ke 10^{-5} , 10^{-6} dan 10^{-7} sebanyak 0,1 ml dibawah titer FID_{50-120} jam (Amrullah, 2004). Data FID_{50-120} jam, diperoleh setelah mengamati munculnya gejala klinis selama 5 hari dan dianalisis berdasarkan Reed dan Munich (dalam Amrullah 2004). Selanjutnya pengamatan gejala klinis dan mortalitas diamati 1-14 hari (Tauhid *et al.* 2004).

Kualitas Air

Pengukuran kualitas air dilakukan di keramba, media penampungan dan akuarium pengamatan laboratorium. Data paramater kualitas air di keramba diperoleh dari hasil pengukuran Badan Pengelola Waduk Cirata (BPWC) pada bulan yang sama.

Sedangkan parameter kualitas air yang diukur di media penampungan meliputi, kecerahan, suhu, kekeruhan, pH, oksigen terlarut, total alkalinitas, total hardeness, total klorin, klorin bebas dan warna air. Parameter kualitas air yang diukur di media uji virulensi virus meliputi oksigen terlarut pH dan suhu.

Pengukuran pH, total alkalinitas dan total hardeness dilakukan dengan cara mencelupkan kertas indikator *aguacheck* ke dalam air selama 1 detik (tanpa goncangan), kemudian diangkat dan dibandingkan dengan ketentuan indikator warna, kemudian dicelupkan kembali selama 5-10 detik, hasil yang diperoleh dibandingkan dengan warna indikator untuk menentukan konsentrasi total klorin dan klorin bebas.

Analisa Data

Variabel–variabel yang diamati, selanjutnya diuji secara statistik dengan anova one-way menggunakan program Minitab. Variabel yang dianalisa meliputi, kadar hematokrit, jumlah eritrosit, kadar hemoglobin, jumlah leukosit dan difrensial leukosit.

Pengamatan FID₅₀-120 jam dianalisa menggunakan rumus Reed and Munch dalam Amrullah (2004) yakni :

$$FID_{50} = \frac{< 50 \% - 50 \%}{< 50 \% - < 50 \%}$$

Keterangan : FID₅₀ : Fish infected dosis 50

>50 : Persentase pengamatan diatas 50 %

<50 : Persentase pengamatan dibawah 50 %

Sedangkan variabel kualitas air, gejala klinis ikan, hasil PCR, dianalisa secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Pengamatan

Karakteristik Keberadaan KHV Berdasarkan Gejala Klinis

Kehadiran virus di dalam sel inang dapat diketahui dengan munculnya gejala klinis atau kelainan-kelainan pada organ inang yang terinfeksi. Kelainan tersebut dapat merupakan perubahan warna, bentuk maupun perubahan tingkah laku ikan yang terinfeksi. Sebagian infeksi dapat menunjukkan gejala spesifik yang disebabkan oleh patogen tertentu atau munculnya gejala sekunder yang merupakan pengaruh tidak langsung yang sifatnya tidak konsisten.

Berdasarkan pengamatan lapangan di keramba jaring apung Waduk Cirata, bahwa ikan mas yang terinfeksi virus KHV menunjukkan gejala klinis utama yaitu insang memutih (nekrosis), warna pucat dan badan kurus. Pada visualisasi hasil PCR, ikan yang menunjukkan gejala ini selalu positif KHV. Gejala-gejala lain yang sering kelihatan sangat bervariasi seperti permukaan tubuh melepuh, sirip rusak/robek, pendarahan pada bagian permukaan tubuh atau sirip, warna pucat, namun gejala klinis ini tidak konsisten (tidak selalu muncul). Pada ikan yang tergolong sakit, umumnya menunjukkan kelainan pada organ insang baik warna maupun bentuk. Dari segi warna, insang pucat dan terdapat gumpalan darah pada pangkal sirip (menghitam) serta insang memutih secara sebagian atau menyeluruh. Hal senada dinyatakan Gilad *et al.* (2002) bahwa insang dan kulit ikan terinfeksi menjadi pucat dan warna tidak beraturan, Miyazaki *et al.* (2000) menambahkan bahwa ikan sakit menunjukkan erosi dan ulkus panjang dan pendarahan pada permukaan tubuh, sirip dan hidung, selanjutnya Hedrick *et al.* (2005) menyatakan bahwa gejala eksternal pada ikan sakit diperlihatkan dengan insang pucat, dan nekrosis filamen insang, produksi mucus yang berlebihan dan warna pucat pada permukaan kulit. Ikan dengan gejala klinis memutih pada insang umumnya sensitif sehingga lebih mudah stres dan mati. Berikut pada gambar 1 merupakan gambaran kelainan insang, gambar 2 merupakan kelainan klinis pada sirip, dan gambar 3 merupakan gambaran klinis pada permukaan tubuh ikan mas yang terinfeksi KHV.

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.

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.



Gambar 1 Gambaran patologis insang ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang terserang virus koi herpes

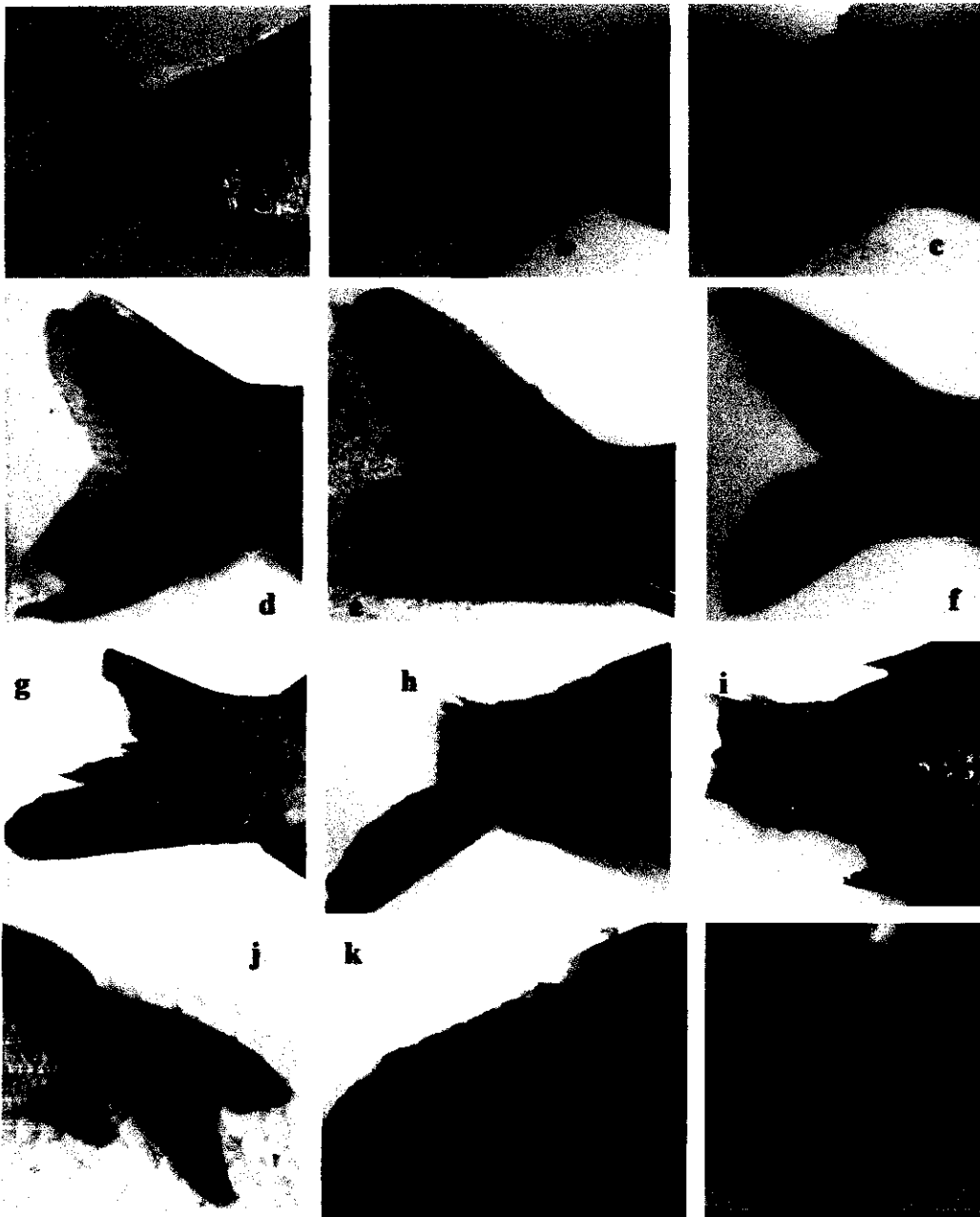
Keterangan : a. insang sehat, b, c dan d terdapat gumpalan (darah) menghitam pada lamella insang, e, f, g, h, i, j, k, m, n dan o menunjukkan permukaan insang yang memutih, pucat dan terjadinya nekrosis insang

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.



Gambar 2 Gambaran klinis pada berbagai bagian sirip ikan mas yang terserang KHV

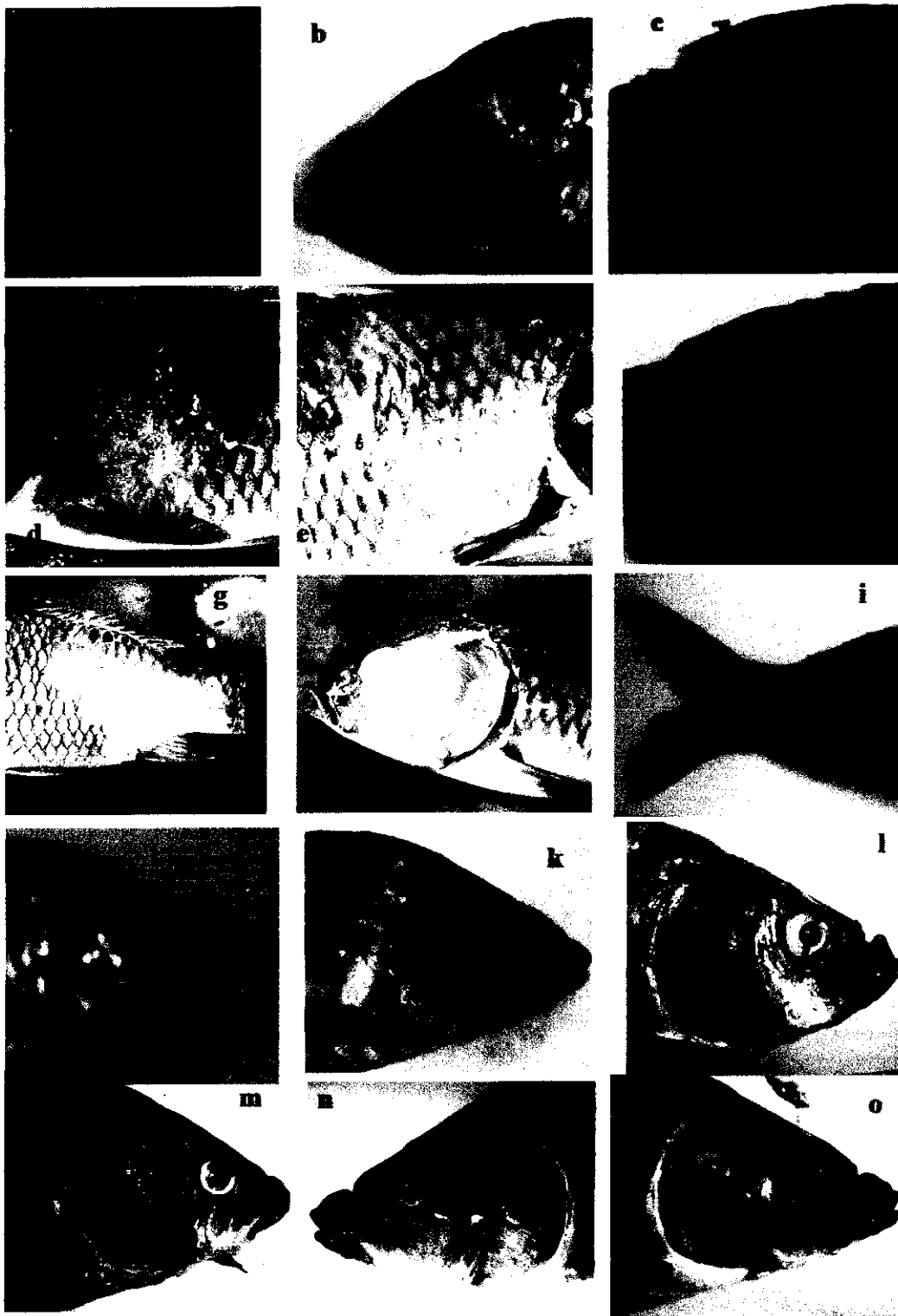
Keterangan : a. sirip normal, b. sirip ekor ikan mulai memucat, c. haemorage ringan pada ujung sirip ekor, d. terjadi haaemorage sedang pada ujung sirip ikan, e dan f. terjadi haemorage berat, sirip mengalami nekrosis, g, h dan i sirip mengalami kepuntungan, j. sirip anus terjadi haemorage, k. sirip punggung rusak, l. sirip perut robek.

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.



Gambar 3 Gambaran klinis pada bagian tubuh ikan mas yang terserang KHV

Keterangan : a. mata memutih (buta), b, c, d, e, f, g dan h terjadi melepuh pada bagian permukaan tubuh, i dan j. haemorage pada bagian tubuh dan insang, k, l, m, n dan o memutih nekrosis pada bagian insang.

Berdasarkan pengamatan tingkah laku ikan yang berada di keramba, ikan-ikan yang terserang KHV memperlihatkan pergerakan yang lambat, ikan-ikan ini sangat bervariasi berdasarkan tingkat infeksi. Ikan-ikan yang terinfeksi ringan kecenderungan bergerak aktif (agresif), berespon baik terhadap rangsangan dan pakan serta hidup berkelompok. Sedangkan ikan sekarat (*moribund*) bergerak sangat lemah, bukaan operkulum lambat, kecenderungan mengumpul di pinggir keramba, tidak berespon baik terhadap pakan maupun rangsangan dari luar. Ikan *moribund* tersebut biasanya akan mengalami kematian setelah 2 hari.

Di dalam akuarium penampungan, ikan-ikan yang menunjukkan gejala klinis insang memutih yang masih ringan kecenderungan sering melompat, pergerakan tidak terkoordinasi dan kecenderungan menyendiri di pinggir akuarium atau dekat sumber aerasi.

Pengamatan Histologi

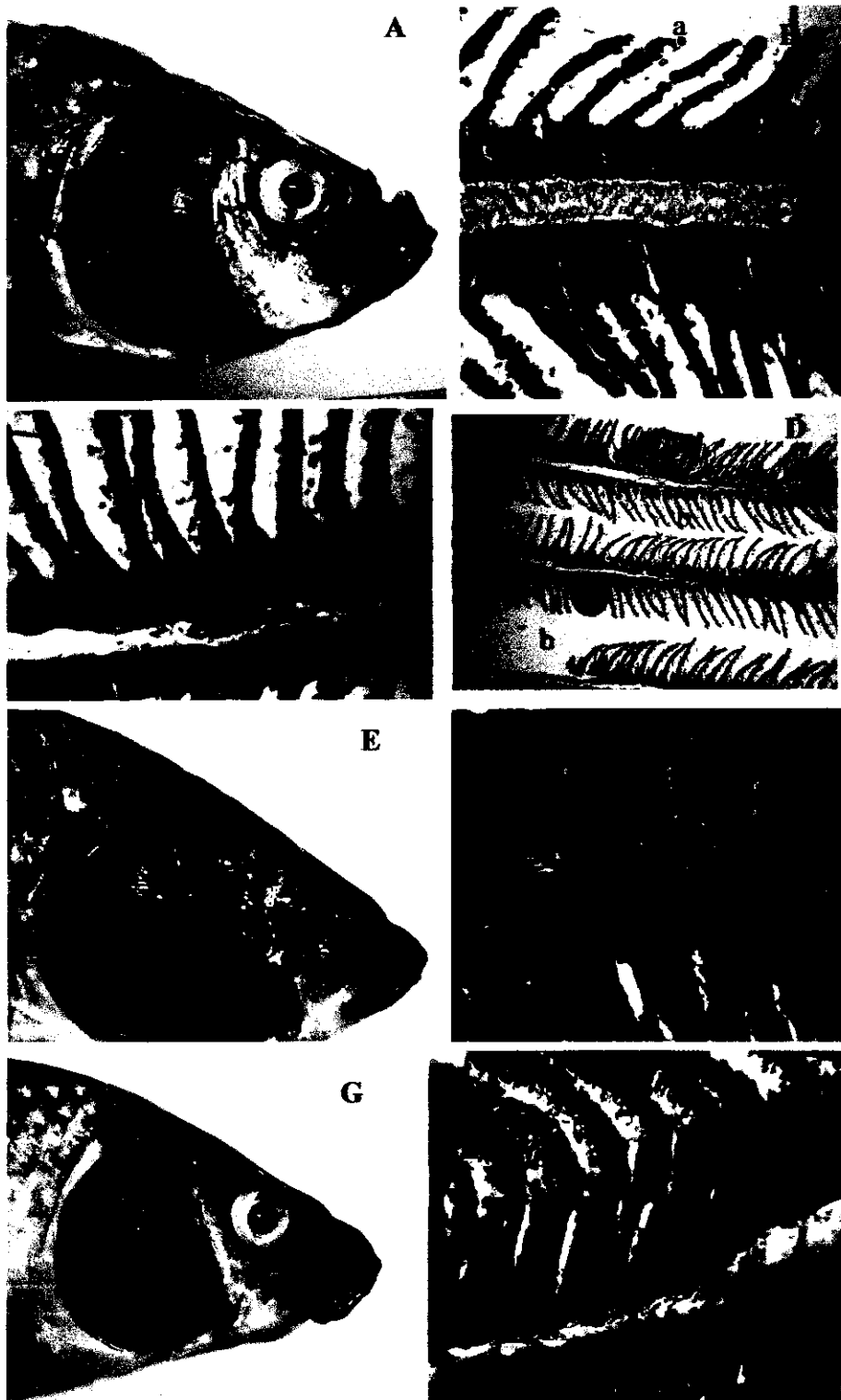
Berdasarkan pengamatan histologi insang pada ikan mas yang terserang KHV (sakit dan carrier-laten) dan sehat, terdapat beberapa perbedaan morfologis insang ikan. Pada ikan terserang KHV terjadi kerusakan insang (nekrosis), kerusakan lemella sekunder insang, munculnya hipertropi dan adanya badan inklusi. Sano *et al.* (2005) menyatakan bahwa sering terjadi hiperplasia pada epitelium insang dimana terjadi nekrosis atau infiltrasi limfosit. Berikut gambar 4 merupakan histopatologi insang ikan mas sehat, carrier-laten dan sakit. Pada gambar 4 jelas terlihat perbedaan insang ikan mas sehat, carrier-laten dan sakit baik dari warna maupun morfologinya. Pada insang ikan sehat warna cerah dan putih, sedangkan ikan sakit warna pucat dan muncul nekrosis.

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.



Gambar 4 Histopatologi insang ikan mas (*Cyprinus carpio*) sakit, carrier-laten dan sehat

Keterangan : A. insang ikan sakit; B, C, D. histologi ikan sakit, E insang ikan sehat, F histologi ikan sehat; G. insang ikan sehat, H. histologi insang ikan sehat, a. nekrosis, b. hiperplasia

Pengamatan PCR

Virus merupakan obligat intraseluler yang sulit dideteksi keberadaannya secara visual maupun mikroskopik. Metode diagnosa yang paling andal adalah melalui deteksi DNA spesifik sebagai unsur penyusun struktur virus dengan menggunakan metode pengamatan *polymerase chain reaction* (PCR).

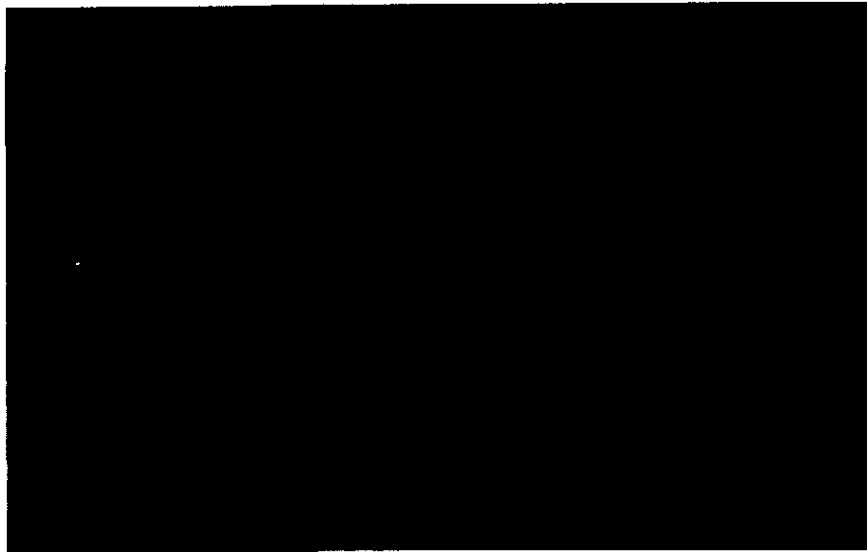
Untuk memastikan (konfirmasi) keberadaan KHV pada setiap status kesehatan ikan (sakit, carrier-laten dan sehat) maka dilakukan uji PCR. Masing-masing 10 sampel diambil untuk mewakili setiap status kesehatan ikan selanjutnya diuji secara PCR dan diikuti pengujian template kontrol positif virus, template negatif virus dan template netral (dH₂O). Berdasarkan hasil PCR diperoleh hasil sebagai berikut.

Ikan sakit

Tabel 1 Hasil pengamatan PCR pada ikan mas (*Cyprinus carpio*) sakit

Kode	Organ	Gejala Klinis	Hasil
A1	Insang	Memutih pada insang, insang rusak parah, tidak ada gejala pada permukaan tubuh, ikan moribund	Positif
A2	Insang	memutih pada insang, insang rusak parah, moribund, sirip rusak dan melepuh	positif
A3	Insang	Memutih pada insang, tidak terdapat gejala pada permukaan tubuh	Positif
A4	Insang	Memutih pada insang, tidak terdapat gejala pada permukaan tubuh	Positif
A5	Insang	Insang memutih	Positif
A6	Insang	Melepuh pada tubuh, ikan lemah, mendekati moribund, terdapat bercak putih pada insang	Positif
A7	Insang	Insang memutih, melepuh pada permukaan tubuh, moribund	Positif
A8	Insang	Memutih pada bagian insang	Positif
A9	Insang	Ikan moribund, bagian punggung melepuh, terdapat haemorage pada ekor ikan	Positif
A10	Insang	Ikan moribund dan memutih pada insang	Positif

Hasil visualisasi PCR menunjukkan bahwa semua ikan mas yang menunjukkan gejala klinis memutih pada insang 100 % positif terserang KHV. Di bawah ini merupakan gambar visualisasi hasil elektroforesis uji PCR ikan sakit.



Gambar 5 Visualisasi hasil elektroforesis pada uji PCR ikan sakit

Ikan Carrier-laten

Pada ikan-ikan yang tidak menunjukkan gejala klinis ditemukan adanya ikan-ikan yang positif terserang virus dengan persentase mencapai 80 %. Sunarto *et al.* (2004) menyatakan bahwa kelompok herpesvirus umumnya memiliki karakter yang unik, yaitu memiliki kemampuan untuk carrier-laten dalam sel inang dalam jangka waktu yang lama, dan akan menjadi aktif kembali apabila ada pemicu seperti perubahan lingkungan atau stres yang terjadi pada inang

Tabel 2 Hasil pengamatan PCR pada ikan mas (*Cyprinus carpio*) carrier-laten

Kode	Organ	Gejala Klinis	Hasil
B1	Insang	Insang cerah, terdapat haemorage pada insang	Positif
B2	Insang	Insang normal	Positif
B3	Insang	Insang normal	Positif
B4	Insang	Insang normal	Negatif
B5	Insang	Insang normal	Negatif
B6	Insang	insang normal	Positif
B7	Insang	Insang normal	Positif
B8	Insang	Insang normal	Positif
B9	Insang	Insang normal	Positif
B10	Insang	Insang normal	Positif

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

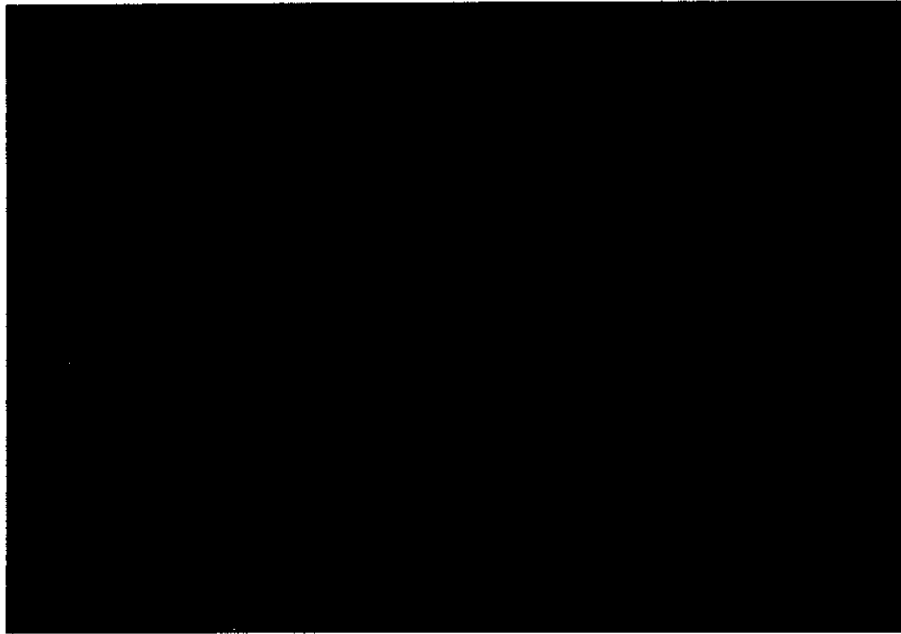
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

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.

Di bawah ini merupakan gambar visualisasi hasil elektroforesis uji PCR ikan sakit.



Gambar 6 Visualisasi hasil elektroforesis pada uji PCR ikan carrier-laten

Pada ikan carrier-laten yang diamati, ditemukan 2 ekor ikan yang negatif KHV, ini menunjukkan bahwa sampel ikan carrier-laten ini 80 % positif KHV.

Ikan Sehat

Dari 10 sampel ikan mas yang digolongkan sehat, menunjukkan bahwa 90 % dinyatakan bebas KHV, namun 10 % masih positif terinfeksi KHV seperti pada Tabel 3 berikut

Tabel 3 Hasil pengamatan PCR pada ikan mas (*Cyprinus carpio*) sehat

Kode	Organ	Gejala Klinis	Hasil
C1	Insang	Insang normal	Negatif
C2	Insang	Insang normal	Positif
C3	Insang	Insang normal	Negatif
C4	Insang	Insang normal	Negatif
C5	Insang	Insang normal	Negatif
C6	Insang	Insang normal	Negatif
C7	Insang	Insang normal	Negatif
C8	Insang	Insang normal	Negatif
C9	Insang	Insang normal	Negatif
C10	Insang	Insang normal	Negatif

Di bawah ini merupakan gambar visualisasi hasil elektroforesis uji PCR ikan sakit.



Gambar 7 Visualisasi hasil elektroforesis pada uji PCR ikan sehat

Karakteristik Hematologi Ikan

Kadar Hemoglobin

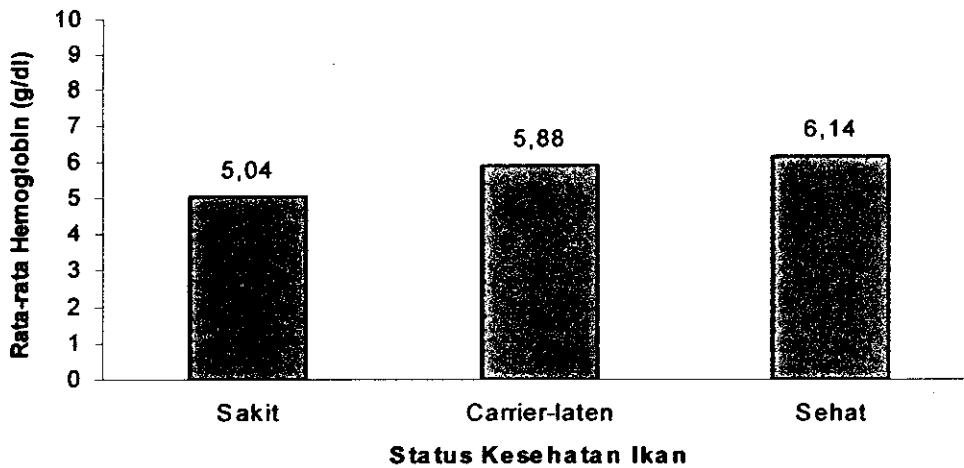
Hemoglobin merupakan pigmen pada sel darah merah yang mengandung zat besi untuk pengangkutan oksigen ke seluruh jaringan. Kadar hemoglobin ditentukan berdasarkan warna/kepekatan inti sel darah merah. Semakin tua sel darah merah maka kadar hemoglobinnya semakin tinggi. Tingginya kadar hemoglobin dikarenakan sel darah merah yang ada dalam tubuh ikan merupakan sel darah merah tua dan sel darah merah muda yang baru dibentuk oleh jaringan hematopoetik yakni pada ginjal dan hati.

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.

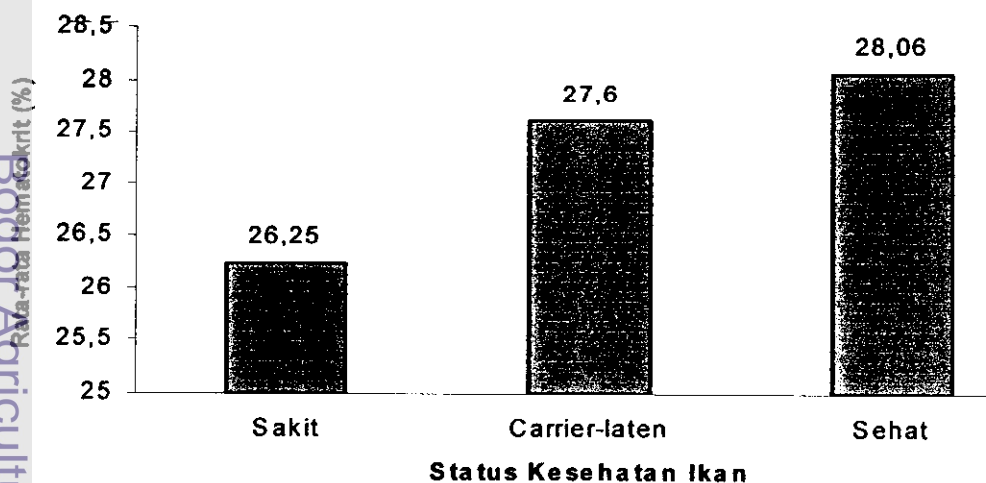


Gambar 8 Rataan hemoglobin ikan setiap status kesehatan ikan mas (*Cyprinus carpio*)

Gambar 8 memperlihatkan perbedaan status kesehatan ikan diikuti oleh perbedaan kadar hemoglobin. Rataan hemoglobin ikan sakit $5,04 \pm 1,7$ g/dl; ikan carrier-laten $5,88 \pm 1,1$ g/dl dan pada ikan sehat $6,14 \pm 0,8$ g/dl. Perbedaan hemoglobin ikan sehat dan carier-laten mencapai 16 % dan 21,8 % terhadap ikan sakit. Hasil pengamatan ini memperlihatkan perbedaan hemoglobin, meskipun berdasarkan analisis anova one-way ($P > 0,05$) tidak nyata.

Hematokrit

Hematokrit merupakan perbandingan fraksi seluler terhadap total volume darah setelah dipisahkan melalui sentrifugasi.

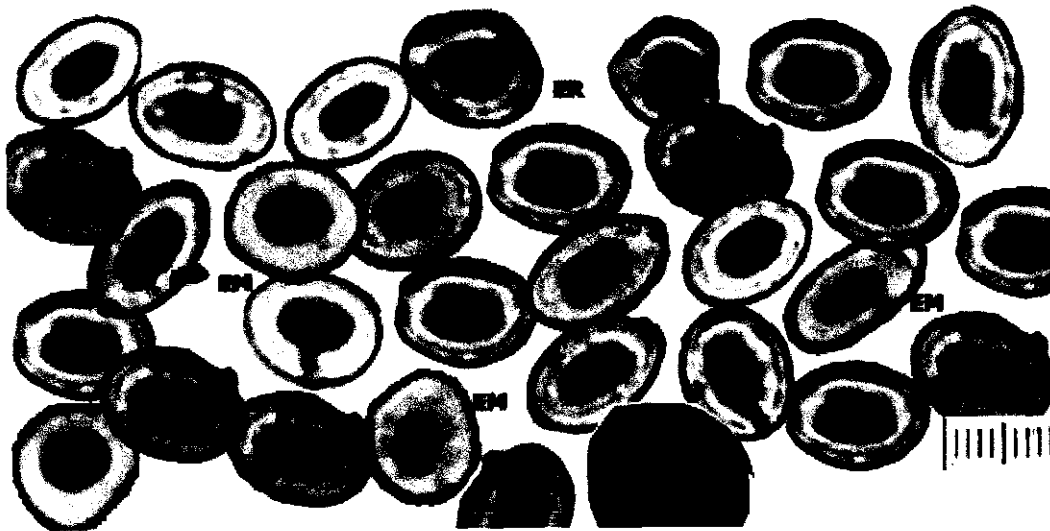


Gambar 9 Rataan hematokrit ikan pada setiap status kesehatan ikan mas (*Cyprinus carpio*)

Gambar 9 menunjukkan kadar hematokrit darah ikan berbeda pada setiap status kesehatan ikan yakni sakit, carrier-laten dan sehat masing-masing dengan nilai $26,25 \pm 4,71 \%$; $27,6 \pm 4,7 \%$ dan $28,06 \pm 3,5 \%$. Perbedaan kadar hemoglobin antara ikan sehat dan carrier-laten mencapai $1,6 \%$ dan sekitar $6,4 \%$ dengan ikan sakit, meskipun berdasarkan uji anova one-way ($P > 0,05$) tidak menunjukkan perbedaan yang cukup nyata.

Eritrosit

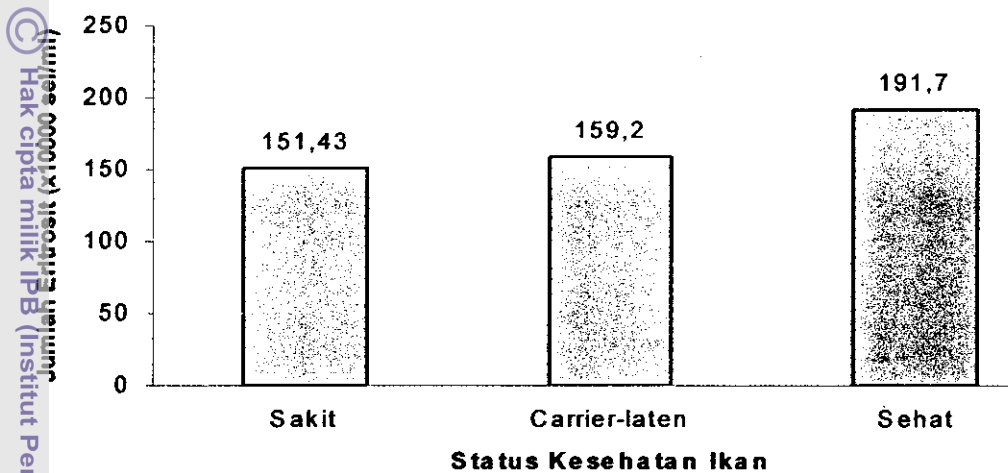
Eritrosit berperan dalam pengangkutan dan distribusi energi, oksigen ke seluruh jaringan tubuh, sekaligus sebagai sarana pengangkutan karbondioksida dari tubuh. Kenaikan maupun penurunan jumlah eritrosit dapat merupakan suatu petunjuk adanya kelainan pada ikan. Rendahnya jumlah eritrosit menunjukkan ikan menderita anemia atau terjadi kerusakan ginjal (Wedemeyer and Yusatake 1977). Di bawah ini merupakan gambaran dan bentuk eritrosit yang ditemukan pada ikan mas sakit, carrier-laten dan sehat.



Gambar 10 Bentuk eritrosit ikan mas (*Cyprinus carpio*)

Gambar 10 merupakan gambaran variasi ukuran dan bentuk sel darah merah ikan mas dengan pewarnaan gyemsa. Eritrosit ikan mas ini terdiri atas eritrosit muda (EM) berbentuk bulat dan eritrosit tua (ER) berbentuk bulat lonjong. Eritrosit ikan mas yang ditemukan berukuran panjang diameter $6,7-10,5 \mu\text{m}$, dengan ukuran paling banyak $8,71 \mu\text{m}$ sedangkan lebar diameter yakni $6,7-$

7,3 μm dengan ukuran paling banyak 7,37 μm . Jumlah eritrosit muda pada ikan sakit lebih besar daripada pada ikan sehat. Tripathi *et al.* (2004) menyatakan bahwa eritrosit berbentuk bulat dan oval berukuran panjang 10-12 μm dan lebar 3,0-4,0 μm . Berikut merupakan grafik rata-rata eritrosit ikan mas sakit, carrier-laten dan sehat



Gambar 11 Rataan eritrosit pada setiap status kesehatan ikan mas (*Cyprinus carpio*)

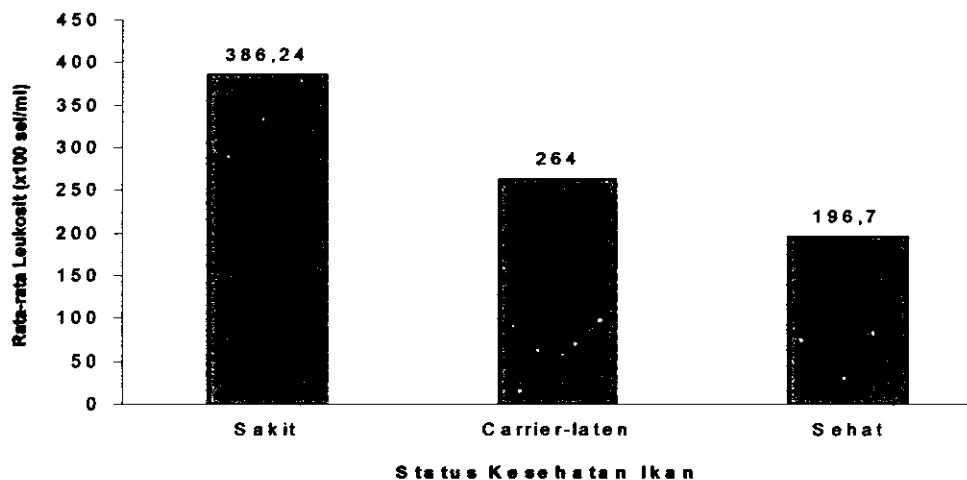
Gambar 11 menunjukkan perbedaan rata-rata eritrosit pada ikan mas. Eritrosit terendah berada pada ikan sakit, lebih tinggi pada ikan laten dan tertinggi pada ikan sehat yakni ikan sakit berkisar $1,5143 \pm 9,1$ ($\times 10^6$ sel/ μl); ikan carrier-laten berkisar $1,67 \pm 65,4$ ($\times 10^6$ sel/ μl) dan ikan sehat $1,735 \pm 56,8$ ($\times 10^6$ sel/ μl). Perbedaan eritrosit ikan sehat dengan carrier laten mencapai 17 % dan 21,4 % terhadap ikan sakit, meskipun berdasarkan uji statistik anova one-way ($P > 0,05$) tidak menunjukkan perbedaan nyata pada setiap status kesehatan ikan. Pada pengamatan Tripathi *et al.* (2004) diketahui eritrosit ikan koi sehat sebanyak $1,81 \pm 0,2$ ($\times 10^6$ sel/ μl)

Jumlah darah pada ikan sakit lebih rendah (anemia) daripada ikan carrier-laten dan carrier laten lebih rendah daripada ikan sehat diduga terjadi sebagai akibat pendarahan pada insang dan permukaan tubuh ikan mas terinfeksi KHV. Rendahnya sel darah juga diperlihatkan melalui gejala klinis seperti insang dan permukaan tubuh pucat, pendarahan pada insang dan permukaan tubuh, gumpalan

hitam pada insang. Gayton and Hall (1997) menyatakan bahwa kekurangan darah (anemia) dapat terjadi akibat kehilangan darah.

Total Leukosit

Pada vertebrata, sel darah putih (leukosit) merupakan sel utama sistim pertahanan tubuh, sehingga salah satu cara menduga sistim imun adalah dengan menyelidiki perubahan jumlah atau gambaran 4 (empat) jenis leukosit pada sirkulasi darah (limfosit, trombosit, granulosit dan monosit) (Tierney *et al.* 2004). Gambar dibawah merupakan rata-rata jumlah eritrosit ikan mas sakit, carrier-laten dan sehat.



Gambar 12 Rataan jumlah leukosit pada setiap status kesehatan ikan mas (*Cyprinus carpio*)

Gambar 12 memperlihatkan bahwa rata-rata leukosit pada ikan sakit akan mengalami penurunan setelah ikan bersifat carrier-laten dan mengalami penurunan pada ikan sehat. Rataan leukosit pada ikan sakit $386,24 \pm 63,90$ ($\times 10^4$ sel/ μ l) ; ikan carrier carrier-laten $264 \pm 38,39$ ($\times 10^4$ sel/ μ l) dan pada ikan sehat $196,7 \pm 51,22$ ($\times 10^4$ sel/ μ l). Gambar 12 memperlihatkan kenaikan jumlah leukosit ikan sehat menjadi carrier-laten mencapai 34 % dan 94 % pada ikan sakit. Analisis anova one-way memperlihatkan bahwa terdapat perbedaan nyata jumlah leukosit pada setiap status kesehatan ikan. Ini memperlihatkan ketika ikan terserang KHV, maka tubuh akan terangsang untuk memproduksi leukosit lebih

banyak lagi. Pada ikan sakit, tubuh memproduksi lebih banyak leukosit untuk melawan infeksi virus. Fenomena ini disebut *leucocytosis*.

Difrensial Leukosit

Pengamatan difrensial leukosit menunjukkan sel netrofil, eosinofil, basofil, limfosit, monosit dan trombosit. Setiap sel leukosit memiliki ukuran dan bentuk yang bervariasi.

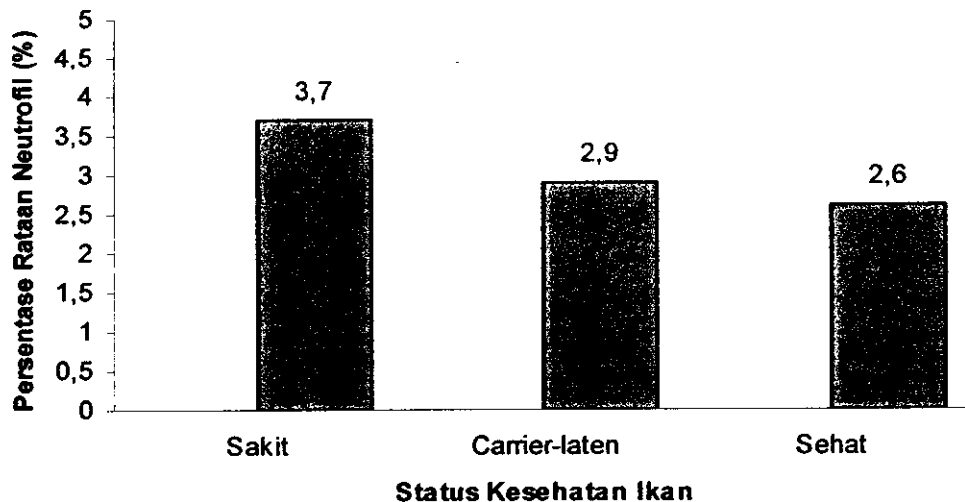
Persentase Netrofil

Fungsi netrofil adalah menghancurkan bahan asing melalui proses fagositosis. Mekanisme ini terjadi melalui beberapa tingkatan yaitu kemotaksis, perlekatan, penelanan dan pencernaan (Tizard 1987). Pada penelitian ini, diketahui bentuk netrofil seperti gambar 13 berikut ini.



Gambar 13 Bentuk netrofil ikan yang terserang virus koi herpes

Tizard (1982) menyatakan bahwa netrofil merupakan garis pertahanan pertama, yang memiliki sediaan cadangan energi yang sangat terbatas, yang tidak dapat diisi kembali. Jadi meskipun netrofil cepat dilepas, namun akan cepat lelah. Netrofil yang rusak juga akan berfungsi untuk merangsang mengumpulkan makrofag untuk fagositosis selanjutnya. Kresno (2001) menambahkan bahwa masa hidup netrofil dalam aliran darah adalah 4-8 jam. Berikut ini merupakan rata-rata persentase neutrofil pada ikan sakit, carrier-laten dan sehat.



Gambar 14 Rataan persentase jumlah neutrofil pada ikan mas (*Cyprinus carpio*) sakit, carrier-laten dan sehat

Gambar 14 menunjukkan bahwa persentase neutrofil pada ikan sakit, carrier-laten dan sehat berada di bawah 10 %. Rataan persentase neutrofil pada ikan sakit $3,7 \pm 2,215$ %; ikan carrier-laten $2,9 \pm 2,6$ % dan ikan sehat $2,6 \pm 2,0$ %. Gambar ini memperlihatkan kenaikan sel neutrofil sebesar 11,5 % dari ikan sehat ke carrier-laten dan sebesar 42 % pada ikan sakit, meskipun analisis anova one-way ($P > 0,05$) tidak menunjukkan perbedaan nyata pada setiap status kesehatan ikan. Jumlah neutrofil lebih rendah daripada sel leukosit lainnya dikarenakan fungsi neutrofil yang cenderung untuk melakukan fagositosis bakteri.

Monosit Ikan

Makropag memiliki bentuk yang sangat bervariasi, tetapi umumnya berdiameter antara 14 sampai 20 μm . Sitoplasmanya mengandung mitokondria, badan golgi dan sejumlah lisosom dan beberapa retikulum endoplasma kasar. Tizard (1982) menyatakan bahwa makropag berfungsi untuk melakukan fagositosis dan menghancurkan partikel asing dan jaringan mati dan mengolah bahan asing untuk membangkitkan respons kebal. Anderson (1987) menyatakan bahwa makropag merupakan sel fagositik pada sistem pertahanan. Kebanyakan ditemukan pada ginjal anterior. Diameter sel berkisar 9-25 μm . Pada penelitian ini diameter monosit berkisar 4,02 – 10,72 μm .

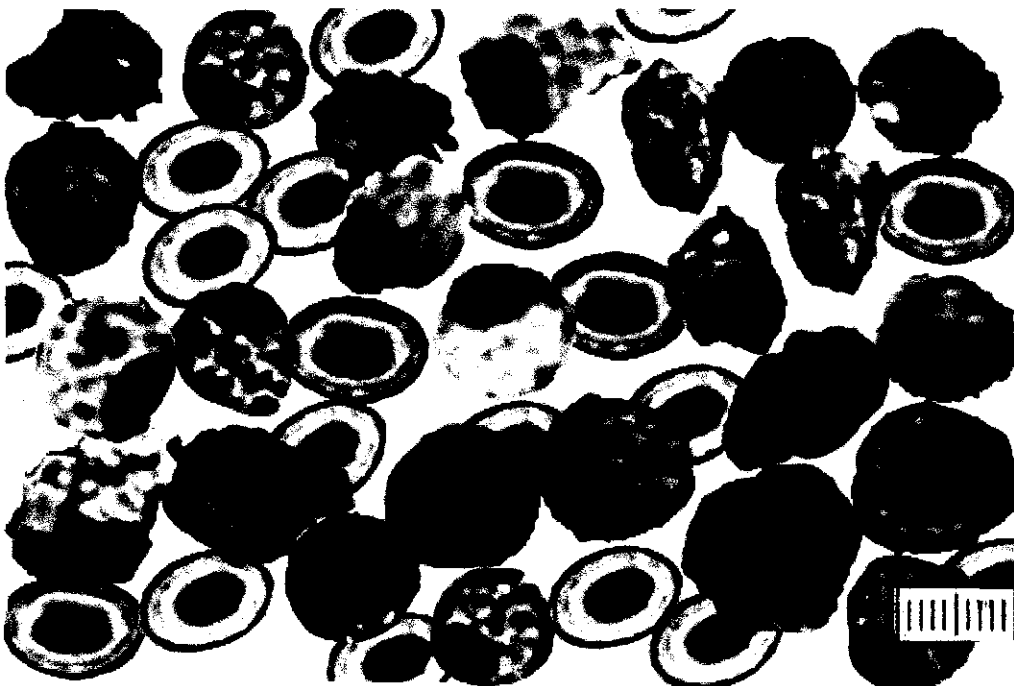
Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

© 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.

Ukuran monosit pada ikan sakit, khususnya ikan sekarat (*moribun*) mengalami pembesaran. Secara umum ukuran lebih besar dan bentuk yang tidak teratur. Hal ini senada dengan Tizart (1982) bahwa struktur makropag dapat berubah secara dramatik setelah terjadi tanggap kebal berperantara sel terhadap mikroorganisme tertentu. Secara khusus makropag membesar dan lisosomnya sangat bertambah jumlahnya. Dalam kondisi bahan asing bertahan dalam tubuh, maka makropaga berkumpul dalam jumlah besar di sekitar bahan asing tersebut. Makropag ini relatif berumur panjang, mengganti diri dengan kecepatan sekitar 1 % per hari kecuali jika diperlukan untuk menelan benda asing. Di bawah ini merupakan gambaran berbagai bentuk monosit yang ditemukan pada ikan sakit, carrier-laten dan sehat.



Gambar 15 Bentuk dan ukuran monosit pada ikan mas yang bersifat sakit, carrier-laten dan sehat

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

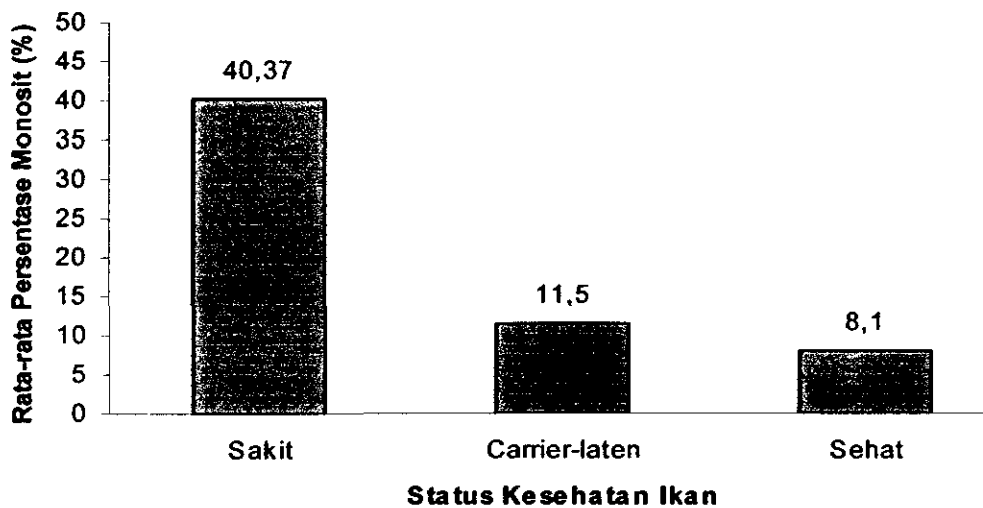
Bogor Agricultural University

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

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

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

Respon leukosit berdasarkan persentase monosit digambarkan pada grafik berikut ini.



Gambar 16 Rataan persentase monosit pada ikan mas (*Cyprinus carpio*) sakit, carrier-laten dan sehat.

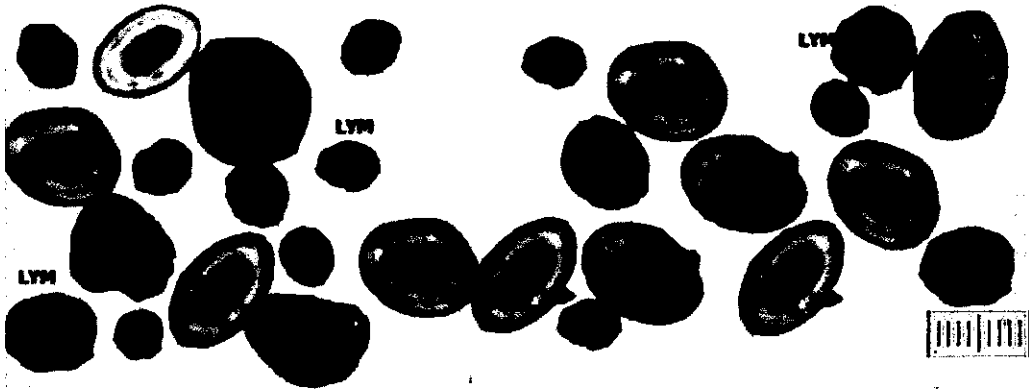
Gambar 16 menunjukkan pola peningkatan jumlah monosit secara drastis pada ikan mas yang terserang KHV. Analisis chi-kwadrat ($P > 0,05$) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nyata jumlah monosit pada setiap kesehatan ikan.

Gambar 19 memperlihatkan jumlah monosit ikan sakit sekitar $40 \pm 16,31$ %; ikan carrier-laten $11,5 \pm 5,94$ % dan pada ikan sehat $8,10 \pm 6,05$ %. Peningkatan monosit dari ikan sehat mencapai 42 % dibandingkan ikan carrier-laten dan 398 % pada ikan sakit. Kemampuan tubuh untuk merangsang produksi monosit yang besar mengindikasikan peningkatan kemampuan sistim imun ikan melawan serangan KHV. Roitt (1988) menyatakan bahwa kemampuan untuk membunuh obligat intraseluler hanya terjadi ketika sel imun merangsang produksi makropag yang diperantarai *makropag activating faktor* seperti pelepasan interferon. Makropag dapat mengenal virus dengan cepat dan membunuhnya.

Limfosit

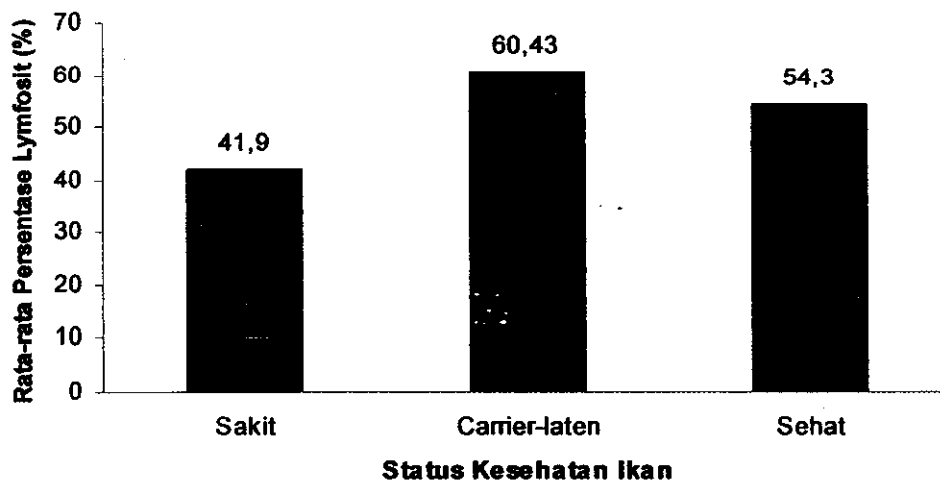
Tierney *et al.* (2004) menyatakan ada dua kelas limfosit yaitu berukuran besar dan kecil. Anderson (1987) menyatakan bahwa limfosit berbentuk bulat, dengan diameter sekitar 8 mikron. Limfosit memiliki jumlah sitoplasma yang

besar, produksi antibodi tampaknya menjadi fungsi utama limfosit. Berikut ini merupakan gambar bentuk dan ukuran limfosit yang ditemukan pada ikan mas sakit, carrier-laten dan sehat.



Gambar 17 Bentuk dan ukuran limfosit ikan mas (*C. carpio*) yang bersifat sakit, carrier-laten dan sehat

Ukuran limfosit ikan mas bervariasi tergantung pada status kesehatan ikan. Ikan yang bersifat sakit, memiliki limfosit berukuran besar lebih banyak dibandingkan dengan ikan yang bersifat carrier-laten dan sehat. Limfosit pada penelitian ini berdiameter 3.67 – 8.04 μm , serta didominasi limfosit berdiameter 4.02 - 4.7 μm . Gambar 18 menunjukkan berapa bentuk dan ukuran sel limfosit. Sel ini memiliki nukelus yang cukup besar berwarna agak lebih gelap. Berikut merupakan grafik rata-rata persentase limfosit ikan mas sakit, carrier-laten dan sehat

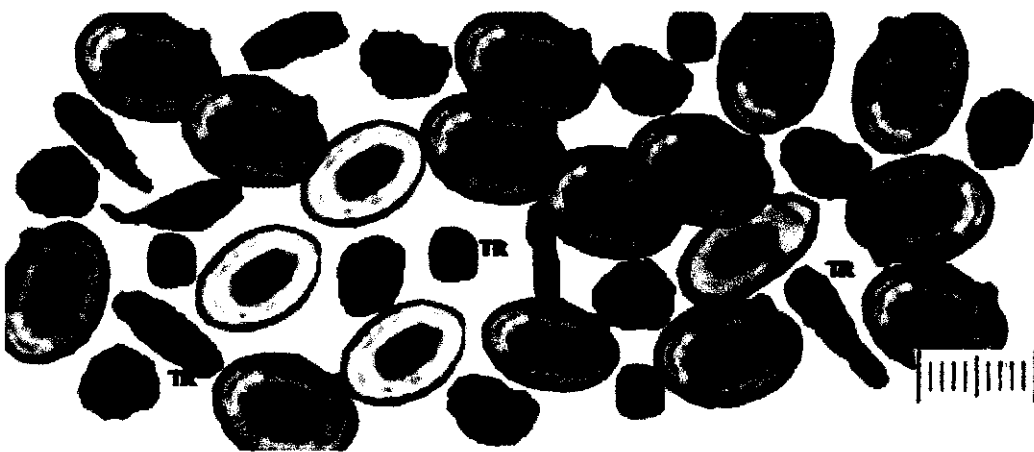


Gambar 18 Rataan persentase limfosit ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang bersifat sakit, carrier-laten dan sehat

Gambar 18 menunjukkan bahwa persentase limfosit pada ikan carrier-laten ($60,43 \pm 8,61 \%$) lebih tinggi daripada ikan sehat ($54,36 \pm 6,89 \%$) dan sakit ($41,9 \pm 15,12 \%$). Jumlah limfosit ikan carrier-laten naik sebesar 11 % dari ikan sehat dan mengalami penurunan 22,8 % pada ikan sakit. Berdasarkan analisis statistik anova one-way tidak menunjukkan perbedaan nyata.

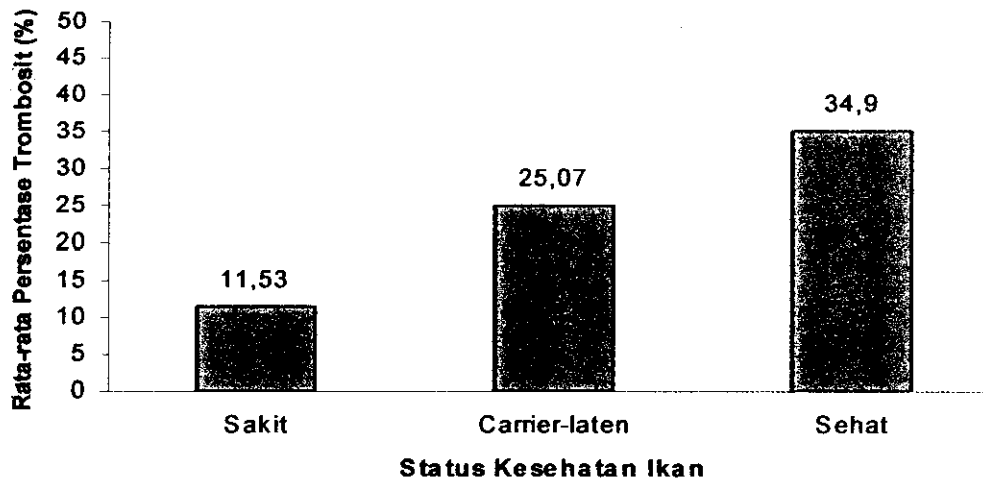
Trombosit Ikan

Trombosit berperan penting dalam proses pembekuan darah dan juga berfungsi mencegah kehilangan cairan tubuh pada kerusakan-kerusakan di permukaan (Nabib dan Pasaribu 1989). Anderson (1987) menyatakan bahwa trombosit ikan berukuran kecil dengan diameter sekitar 8 mikron. Secara morfologi sama dengan nukleus eritrosit. Berikut merupakan gambaran bentuk dan ukuran trombosit yang ditemukan pada ikan mas sakit, carrier-laten dan sehat.



Gambar 19 Bentuk dan ukuran trombosit ikan mas

Gambar 19 memperlihatkan 2 bentuk trombosit yang ditemukan pada ikan mas baik bentuk bulat dan bentuk memanjang. Berikut merupakan grafik rata-ran persentase trombosit ikan mas sakit, carrier-laten dan sehat.



Gambar 20 Rataan persentase trombosit pada ikan mas sakit, carrier-laten dan sehat.

Gambar 20 menunjukkan adanya kenaikan jumlah trombosit pada ikan mas seiring dengan perubahan status kesehatan ikan. Analisis anova one-way ($P > 0,05$) memperlihatkan adanya perbedaan nyata jumlah trombosit pada setiap status kesehatan ikan. Rataan trombosit pada ikan sakit $11,53 \pm 6,77$ %; ikan carrier-laten $25,07 \pm 9,58$ % dan pada ikan sehat mencapai $34,90 \pm 7,08$ %. Serangan KHV pada ikan carrier-laten menyebabkan trombosit turun 29 % dari ikan sehat, dan penurunan 67 % ketika ikan sakit.

Karakteristik Virulensi Virus

Virulensi virus berkaitan erat dengan kerentanan maupun ketahanan tubuh ikan. Pengujian virulensi virus menunjukkan bahwa virus yang diperoleh dari ikan sakit menunjukkan FID_{50-120} jam mencapai titer $10^{6,7}/ml$. Sedangkan virulensi virus yang diperoleh pada ikan carrier-laten mencapai titer $10^{5,6}$. Pengamatan virulensi ini didasarkan pada gejala klinis yang terlihat pada ikan secara eksternal dan insang. Gejala umum yang muncul setelah penyuntikan virus adalah pergerakan yang sangat lemah, kemudian insang pucat, terdapat bintik warna putih. Selanjutnya pada hari ke-5 dan ke-6 terjadi kematian ikan dengan gejala awal yakni memutih pada insang, tubuh pucat dan pergerakan sangat lemah..

Pengamatan ini menunjukkan bahwa terjadi penurunan virulensi virus meliputi : 1) pada ikan yang menunjukkan gejala klinis terjadi penurunan virulensi menjadi titer $10^{6.7}$ /ml dari pengamatan Amrullah (2004) yakni titer $10^{7.26}$ /ml. 2) penurunan virulensi pada ikan sakit yang menunjukkan gejala yakni $10^{6.7}$ titer menjadi $10^{5.6}$ /ml pada ikan carrier-laten.

Terjadinya penurunan mortalitas ikan mas yang dipelihara di keramba juga disebabkan terjadinya penurunan virulensi virus yang menginfeksi ikan tersebut meskipun penurunannya relatif kecil.

Pengukuran Kualitas Air

Kualitas Air Keramba

Kualitas air keramba, diukur pada saat sampling ikan sampel. Nilai parameter kualitas air terdiri atas :

Tabel 4 Pengukuran kualitas air di keramba jaring apung Waduk Cirata

No	Parameter	Satuan	Alat Ukur	LOKASI	
				A	B
1	Warna Air	-	Visual	Coklat kehijauan	Hijau kecoklatan
2	Cuaca	-	Visual	Cerah	Cerah
3	DO	ppm	DO meter	4,8-5,0	4,8-5,0
4	pH	-	pH meter	7,8	7,8
5	Kecerahan	Cm	Secchi disc	60	130

Tabel 5 Pengukuran kualitas air di laboratorium kesehatan ikan FPIK IPB

Parameter	Satuan	Alat Ukur	Kode Wadah			
			Stok Air	Ikan Sakit	Ikan carrier-laten	Ikan Sehat
pH	-	pH pen	7.9	7.89	8.14	7.96
DO	ppm	DO meter	6.31	6.50	6.54	6.81
Suhu	$^{\circ}\text{C}$	Thermometer	27.4	26.8	27.1	27.0

Pembahasan

Karakteristik Keberadaan Virus berdasarkan Gejala Klinis

Gejala klinis muncul sebagai ekspresi perubahan dan abnormalitas organ akibat serangan KHV melalui tahapan yang panjang dalam menginfeksi jaringan dan sel-sel ikan mas. Awal infeksi dimulai dari perlekatan virus pada permukaan tubuh maupun insang. Pada permukaan tubuh diduga virus mampu melewati pertahanan awal tubuh ikan mas berupa mukus, sisik dan epitel tubuh, sedangkan di insang virus KHV mampu melewati mukus dan epitel insang. Nat (2001) menyatakan bahwa untuk proteksi ikan terhadap invasi patogen, permukaan epitel (kulit dan insang) penting sebagai pertahanan awal. Virus juga mampu melewati komponen berbagai substansi pertahanan pada mukus. Magnadottir (2006) menyatakan bahwa mukus ikan mengandung parameter imun seperti lectin, pentraxin, lysozym, protein komplemen, peptida antibakterial dan IgM. Virus yang menempel dan masuk ke organ tubuh bisa berasal dari virus yang terdapat pada feces ikan atau perpindahan virus akibat kontak langsung (*kohabitasi*) dengan ikan terinfeksi (Hartman *et al.* 2004). Kemudian virus akan masuk ke jaringan pada ruang antar sel. Ligan pada permukaan molekul khusus virion mengikat reseptor pada membran plasma sel (Fenner *et al.* 1995). Virus masuk ke dalam sel melalui fusi antara glikoprotein selubung virus dengan reseptornya yang terdapat di membran plasma (Daily dan Makes 2002), proses masuknya virus terjadi dengan cara endositosis (endositosis diperantarai sel) (Fenner *et al.* 1995). Selanjutnya nukleokapsid virus pindah dari sitoplasma ke inti sel, setelah kapsid rusak, genom virus dilepas ke dalam inti sel. Genom DNA yang awalnya linear segera berubah menjadi sirkuler (Daily dan Makes 2002).

DNA virus yang masuk ke inti sel, akan merubah peranan DNA sel untuk kepentingan virus khususnya untuk replikasi. Di sel insang virus memperbanyak diri (Pokorova *et al.* 2005). Efek awal yang tampak berupa pembesaran nukleolus dan pergeseran letaknya menuju membran inti sel, terjadi marginasi kromatin dan intinya terdistorsi menjadi beberapa lobus. Marginasi kromosom dapat diikuti oleh pecahnya kromosom tersebut (Daily dan Makes 2002). Perubahan-perubahan sel khususnya sel insang akan memunculkan adanya badan inklusi. Tizart (1989) menyatakan bahwa virus adalah obligat intraseluler yang

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.

menyerang dan mengubah sifat-sifat sel. Perubahan sel yang terinfeksi dapat meluas dan mengakibatkan lisisnya sel atau terjadinya transformasi malignan. Kerusakan sel yang meluas, menyebabkan kerusakan jaringan dan organ insang hingga mengalami kematian jaringan. Kerusakan jaringan diperlihatkan dengan adanya nekrosis atau memutih pada lamella primer maupun lamella sekunder insang.

Virus KHV mengambil alih peranan sel insang yang seharusnya berfungsi untuk metabolisme insang menjadi metabolime untuk keperluan virus. Sel insang yang terinfeksi akan mengalami lisis. Sel insang yang lisis akan menyebabkan terganggunya fungsi sel, yang menyebabkan terjadinya pendarahan (*haemorage*) sebagai akibat rusak dan terputusnya saluran darah, terjadinya penumpukan darah (menghitam) pada pangkal sel terinfeksi. Kerusakan sel secara terus menerus akan menyebabkan rusaknya jaringan insang, sehingga nekrosis semakin meluas, hal ini ditandai dengan insang memutih mencapai 80 %.

Kerusakan insang akan mengganggu mekanisme pertukaran gas di insang baik pengikatan oksigen dari luar maupun pelepasan karbondioksida dari dalam darah yang merupakan fungsi utama insang. Untuk mengimbangi suplai oksigen maka ikan akan meningkatkan frekwensi pergerakan operkulum. Gejala yang lebih konsisten ikan pucat dan peningkatan frekwensi pernafasan (Gray *et al.* 2002), pembengkakan insang, pucat pada insang dan lesi pada kulit (Oh *et al.* 2000). Infeksi virus yang menyebabkan nekrosis insang, awalnya dapat terjadi pada ujung dan pangkal insang. Ketika infeksi dimulai dari pangkal insang, akan menyebabkan tersumbatnya aliran darah, sehingga distribusi darah pada jaringan insang terganggu, hal ini ditandai dengan menumpuknya darah pada bagian tertentu dan pucat pada bagian insang. Pada kondisi sekarat yang ditandai oleh kerusakan (nekrosis) yang semakin meluas, insang pucat akan diikuti dengan penurunan produksi mukus insang dan penurunan frekwensi pergerakan operkulum. Kerusakan insang dan kurangnya suplai oksigen akan menyebabkan kematian ikan mas terinfeksi.

Pada umumnya ikan terinfeksi akan memperlihatkan perubahan warna maupun bentuk insang, meskipun gejala-gejala lain tidak muncul. Insang terlihat pucat dan memutih. Noga (2000) menyatakan bahwa pigmentasi melanin pada

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.

kulit dan insang ikan diberada di bawah kontrol neuroendokrin dan dipengaruhi oleh hormon. Ketika ikan mengalami sakit, pola pemeliharaan pigmentasi secara normal mengalami penurunan yang disebabkan respon haemostase terhadap fungsi organ-organ vital ikan. Kelainan-kelainan yang terjadi pada insang, memperlihatkan bahwa insang merupakan salah satu organ target serangan KHV. Preparat histologi (pewarnaan hematoxilin dan eosin) menunjukkan ciri infeksi virus herpes, yakni terjadinya hipertropi, hiperplasia dan adanya badan inklusi (*inclusion body*) dalam inti sel (*intranuklear inclusion*). Pokorova *et al*, (2005) mengungkapkan bahwa pengamatan secara histologi memperlihatkan epitel insang dengan perubahan degenerasi dan nekrosis dan munculnya badan inklusi pada sel terinfeksi. (Noga 2000) menambahkan respon paling umum kerusakan insang adalah terjadinya hiperplasia atau hipertropi pada epitel sel, yang akhirnya dapat menyebabkan fusi diantara lamella sekunder atau bahkan pada lamella primer. Kondisi ini akan menyebabkan penurunan pertukaran gas dan gangguan respirasi.

Nekrosis yang meluas pada insang sangat mengganggu dalam mekanisme fisiologis pada ikan. Noga (2000) menyatakan bahwa insang merupakan organ multifungsi, dengan fungsi utama sebagai organ respirasi, merupakan bagian penting dalam ekskresi amoniak beracun serta berperan menjaga keseimbangan ionik, pertukaran gas, transpost (mono dan divalen) ion, ekskresi sisa nitrogen (amonia dan urea), pengambilan dan ekskresi beberapa xenobiotik (Lawrence and Hemingway 2003). Kajian biopsi insang menjadi alat diagnosa penyakit ikan, Noga (2000) menyatakan bahwa insang sehat berwarna merah cerah, sedangkan pucat kemungkinan anemia atau kelainan pada methemoglobin.

Beberapa gejala klinis lain yang mungkin secara langsung dan tidak langsung berkaitan dengan serangan KHV yakni terjadi pendarahan pada bagian sirip atau permukaan tubuh, melepuh pada sirip maupun permukaan tubuh, mata ikan cekung dan buta, badan kurus. Hal yang sama telah diperoleh Hedrick *et al*. (2000), Englesma and Heanen (2005) dan Amrullah (2004).

Kelainan lain ikan yang terinfeksi KHV memperlihatkan pergerakan ikan yang tidak teratur, berkumpul pada pinggir keramba atau akuarium, tidak ada nafsu makan dan tidak berespon terhadap rangsangan dari luar. Hal senada

diungkapkan Sunarto *et al.* (2004) bahwa tingkah laku ikan terserang KHV memperlihatkan : 1) ikan terlihat megap-megap dan berenang di permukaan atau ke arah aliran air masuk, selanjutnya menjadi lemah dan berkumpul di saluran pengeluaran, dan 2) pergerakan tidak terkoordinasi, sangat lamban dan terpisah dari kelompok ikan yang sehat. Sedangkan pada ikan sehat dan carrier-laten umumnya lebih lincah dan sangat berespon terhadap rangsangan seperti cahaya dan gerakan. Pokorova *et al.* (2005) menyatakan bahwa menunjukkan pergerakan yang tidak menentu sampai kematian.

Ikan-ikan yang terinfeksi berat, umumnya tidak mempunyai nafsu makan. Kekurangan suplai energi dan material penyusun sel tubuh merupakan faktor yang mempercepat terjadinya kerusakan organ dan kematian ikan. Kekurangan suplai makanan ini diperlihatkan dengan tubuh ikan kurus dan mata cekung. Dengan kondisi kekurangan energi dan tubuh yang lemah akan memberi peluang lebih besar masuknya infeksi lain atau terjadinya kerusakan organ lainnya seperti mukus habis, sisik terkelupas dan epeitel terkelupas. Dengan demikian akumulasi gejala klinis ini akan mempercepat terjadinya kematian pada ikan.

Penggolongan status kesehatan ikan menjadi sakit, carrier-laten dan sehat ditentukan berdasarkan munculnya gejala klinis. Penggolongan ikan menjadi ikan sakit, didasarkan pada munculnya gejala klinis atau ketidaknormalan ikan secara morfologi, warna tubuh dan tingkah laku. Ikan-ikan yang tidak menunjukkan gejala klinis digolongkan sebagai ikan carrier-laten yang pada tubuhnya mengandung virus, namun tidak mengekspresikan gejala klinis atau ketidaknormalan ikan. Ikan sehat digolongkan sebagai ikan bebas KHV dan perubahan gejala klinis setelah dilakukan uji stres untuk menggertak virus berekspresi.

Kumpulan ikan mas yang menunjukkan gejala klinis terutama insang memutih secara menyeluruh (100 %) positif terserang KHV setelah diuji menggunakan PCR. Dengan penggunaan PCR, sekuen DNA spesifik virus KHV dapat dideteksi. PCR merupakan metode selektif untuk menggandakan segmen spesifik DNA (Karunasagar *et al.* 1999). Hasil pengamatan ini merupakan salah satu indikasi kuat bahwa gejala klinis yang spesifik dari serangan KHV adalah kerusakan insang sampai memutih atau nekrosis. Pengujian dengan menggunakan

PCR terhadap ikan yang digolongkan sebagai ikan carrier-laten memperlihatkan 80 % positif KHV. Seleksi ikan tanpa gejala klinis setelah uji stres melalui penurunan dari suhu 28°C menjadi 24°C menghasilkan 90 % ikan bebas KHV yang digolongkan sebagai ikan sehat. Pada ikan sehat ternyata terdapat 10 % yang masih positif KHV. Hasil pengamatan ini memungkinkan terjadi karena 1) fluktuasi suhu yang digunakan belum tepat sehingga virus belum tergertak untuk bereplikasi, 2) pada ikan sehat terdapat untaian DNA virus yang tidak aktif tetapi masih teramplifikasi dengan PCR, namun dengan uji stres tidak dapat mengekspresikan gejala klinis.

Sensitivitas PCR yang tinggi untuk mendeteksi keberadaan virus merupakan metode terbaik untuk diagnosa keberadaan KHV. Deteksi KHV pada ikan carrier-laten, memperlihatkan PCR memiliki sensitivitas 80 % yang dapat digunakan sebagai acuan untuk deteksi dini keberadaan KHV pada benih-benih baru di lokasi budidaya yang baru.

Karakteristik Hematologi Ikan.

Kajian hematologi telah umum dilakukan sebagai acuan diagnosa kesehatan manusia. Metode ini juga telah diterapkan untuk mendiagnosa kesehatan ikan. Pada penelitian ini kajian hematologi ikan meliputi hemoglobin, hematokrit, total eritrosit, total leukosit, dan difrensial leukosit. Berdasarkan informasi ini, diharapkan dapat diketahui respon hematologi ikan terhadap KHV dan respon ketahanan ikan terhadap serangan KHV.

Hemoglobin sangat penting karena memiliki berbagai fungsi dalam tubuh (Negal 1972), seperti transpor dan penyimpanan oksigen (Fujaya 2004), proteksi sel terhadap oksigen toksik (katalase dan peroksidase), transpor elektron, sintesis ATP, metabolisme mikrosomal asam lemak, steroid dan xenosiotik. Hasil pengamatan memperlihatkan bahwa rata-rata kadar hemoglobin ikan pada penelitian ini memperlihatkan bervariasi yakni pada ikan sakit $5,04 \pm 1,7$ g/dl, pada ikan carrier-laten $5,88 \pm 1,1$ g/dl dan pada ikan sehat $6,14 \pm 0,83$ g/dl. Tripathi *et al.* (2004) menyatakan bahwa hemoglobin common carp berkisar 6,94 g/dl. Hasil pengamatan memperlihatkan bahwa hemoglobin ikan sakit lebih kecil,

sedangkan Hb ikan carrier-laten agak mendekati Hb ikan sehat. Penurunan ini dapat terjadi sebagai akibat menurunnya viskositas eritrosit ikan (Hall 1972).

Hemoglobin ikan sakit lebih rendah daripada lainnya, hal ini sangat relevan dengan jumlah eritrosit yang lebih rendah pada ikan sakit, sehingga hemoglobin yang terikat pada sel juga rendah. Bukti lain pada ulas darah menunjukkan bahwa eritrosit muda banyak ditemukan pada ikan sakit daripada ikan sehat dan carrier-laten. Pendarahan yang terjadi merupakan penyebab terjadinya penurunan hemoglobin. Gejala klinis ikan terinfeksi KHV memperlihatkan nekrosis dan haemorage pada insang.

Kandungan oksigen air berkisar antara 4,8 – 5,8 ppm. Konsentrasi ini berada pada kisaran toleransi ikan mas, namun rendahnya hemoglobin menyebabkan pengikatan dan suplai oksigen ke tubuh menurun, hal ini ditandai dengan gejala klinis pucat pada insang dan permukaan tubuh. Untuk memenuhi kebutuhan oksigen, ikan mas meningkatkan frekwensi bukaan operkulum, sehingga difusi oksigen dari lingkungan ke insang terjadi secara terus-menerus dan dapat memenuhi kebutuhan oksigen. Gejala frekwensi gerakan operkulum jelas terlihat pada ikan sakit khususnya infeksi ringan. Sejalan dengan meningkatnya infeksi dan kerusakan insang, kemampuan ikan bertahan menurun termasuk aktivitas pernafasan, hal ini ditandai dengan bukaan operkulum yang sangat lambat dan lemah.

Perbandingan antara plasma dan sel darah dikenal sebagai hematokrit. Data ini sangat berguna untuk menentukan apakah ikan mengalami anemia atau normal. Kadar hematokrit memperlihatkan perbedaan pada setiap status kesehatan ikan. Hematokrit ikan sakit mencapai $26,25 \pm 4,71$ %, ikan carrier-laten $27,61 \pm 4,73$ % dan ikan sehat mencapai $28,05 \pm 3,5$ %. Moyle dan Cech (1988) menyatakan bahwa kadar hematokrit common carp (*Cyprinus carpio*) mencapai 27,1 %. Faktor yang menyebabkan penurunan hemoglobin, diduga juga berkaitan dengan penurunan parameter hematokrit. Perubahan jumlah sel darah akan merubah persentase sel darah dibandingkan dengan plasma. Rendahnya jumlah eritrosit pada ikan sakit menyebabkan persentase hematokrit mengalami penurunan. Penurunan ini tidak terlepas dari terjadinya haemorage pada insang

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

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

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

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

Dinamika perubahan paramater hematologi ikan seiring dengan dinamika yang perubahan lingkungan atau tekanan yang dialami oleh ikan. Perubahan ini merupakan reaksi normal tubuh untuk menjaga keseimbangan haemostase ikan terhadap lingkungan. Fluktuasi hematokrit ikan mas dapat dipengaruhi oleh musim (Orun *et al.* 2003), kenaikan karena umur ikan sebesar 26 % pada umur 4 minggu menjadi 35 % pada usia 15 minggu (Hrubec *et al.* 2001), kenaikan karena rangsangan levamisol dari 30 % menjadi 33 % pada ikan rainbow trout (Ispir and Dorocu 2005), penurunan yang disebabkan toksisitas delmaterina dari 42 % menjadi 36 % (PCV) (Svobodova *et al.* 2003), Fujaya (2004) menyatakan bahwa ada korelasi yang kuat antara hematokrit dan jumlah hemoglobin darah, semakin rendah jumlah sel-sel darah merah, maka semakin rendah pula kandungan hemoglobin dalam darah. Hematokrit atlantik salmon (*Salmo salar*) adalah 47 % dan hemoglobinnnya 9,6 g/dl, sedangkan pada nototheniid, hematokrit 21 % dengan kandungan hemoglobin 2,5 g/dl. Beberapa kajian lain memperlihatkan bahwa tekanan terhadap ikan akan mempengaruhi hemoglobin dan hematokrit.

Hasil pengamatan total eritrosit memperlihatkan adanya variasi jumlah pada setiap status kesehatan ikan. Jumlah eritrosit pada ikan sakit mencapai $1,514 \pm 0,691 \times 10^6$ sel/ μ l; ikan carrier-laten $1,673 \pm 0,654 \times 10^6$ sel/ μ l dan ikan sehat $1,917 \pm 0,568 \times 10^6$ sel/ μ l. Tripathi *et al.* (2004) menyatakan bahwa sel darah common carp (*Cyprinus carpio*) $1,86 \times 10^6$ sel/ μ l. Rendahnya jumlah eritrosit pada ikan merupakan konsekwensi dari serangan KHV yang dapat menyebabkan terjadinya kerusakan maupun pendarahan pada permukaan tubuh dan insang, yang merupakan penyebab menurunnya status kesehatan ikan. Di dalam sistim sirkulasi darah, organ hematopoetik khususnya ginjal akan bekerja secara terus-menerus untuk mengganti sel darah merah tua dan membentuk sel darah merah baru. Pada kondisi ikan sakit, terjadi pendarahan terus-menerus tanpa adanya fungsi pembeku yang efektif yang diperlihatkan oleh rendahnya persentase trombosit sebesar 67 % dibandingkan dengan ikan sehat. Pembentukan eritrosit tetap berlangsung, namun eritrosit muda ini juga diduga turut keluar dari saluran darah sehingga jumlah eritrosit normal tidak tercapai. Di sisi lain, pemulihan dan pembentukan eritrosit tetap berlangsung namun tidak diikuti oleh suplai energi dan material pembentuk darah yang memadai. Hal ini diperlihatkan oleh tingkah

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.

laku ikan yang tidak memiliki nafsu makan. Pada ikan carrier-laten pembentukan dan pemulihan eritrosit tetap berlangsung serta diikuti suplai energi karena ikan memiliki respon yang baik terhadap makanan.

Leukosit sebagai komponen sistim pertahanan tubuh, dapat mengalami fluktuasi jumlah maupun persentase (neutrofil, limfosit, monosit dan trombosit) oleh adanya rangsangan benda-benda asing dalam tubuh. Baratawidjaja (2002) menyatakan bahwa komponen sistim imun yang berperan terhadap infeksi virus yakni antibodi, fagosit, interferon, natural killer dan Tc. Total leukosit pada ikan sakit mencapai $3,862 \pm 0,639 \cdot 10^4$ sel/ μ l, ikan carrier-laten $2,6435 \pm 0,3839 \cdot 10^4$ sel/ μ l dan ikan sehat $1,967 \pm 0,5122 \cdot 10^4$ sel/ μ l. Hasil pengamatan ini memperlihatkan bahwa terdapat penurunan jumlah leukosit seiring dengan perubahan status kesehatan ikan. Tingginya total leukosit pada ikan sakit sangat wajar terjadi karena peranannya sebagai pertahanan tubuh. Untuk mengimbangi tingkat virulensi virus yang menginfeksi ikan, maka sistim imun ikan berespon dengan memproduksi sejumlah leukosit. Pada ikan carrier-laten masih memperlihatkan jumlah leukosit yang besar, hal ini merupakan upaya tubuh untuk mengurangi pengaruh virus dan mempertahankan *haemostase* tubuh. Tripathi *et al.* (2004) menyatakan bahwa jumlah leukosit ikan normal mencapai $2,4 \times 10^4$ sel/ μ l

Persentase neutrofil ikan mas sakit, carrier-laten dan sehat relatif kecil yakni 2,6-3,7 %. Data ini sangat relevan dengan fungsi neutrofil sebagai fagositik bakteri dan unsur imunogenik lain non-virus. Neutrofil berbentuk sel bundar dengan diameter mencapai 12 μ m, memiliki sitoplasma yang bergranula halus dan ditengahnya terdapat nukleus bersegmen. Fungsi utama neutrofil adalah penghancuran bahan asing melalui proses fagositosis. Neutrofil tertarik oleh berbagai produk bakteri (Tizart 1985). Stoksit *et al.* (2001) menambahkan bahwa terjadi peningkatan secara nyata kemampuan memakan (ingesti) dan aktivitas myeloperoxidase (MPO) neutrofil ikan carp (*Cyprinus carpio* L) yang diinfeksi secara alami terhadap bakteri *erythodrmalitis* untuk memperoleh ikan carp resisten.

Sel monosit memiliki persentase yang cukup besar dibandingkan sel lainnya. Hasil pengamatan menunjukkan monosit ikan sehat mencapai $40,37 \pm$

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.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

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

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

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

16,31 % pada ikan sakit, $11,50 \pm 5,94$ % pada ikan carrier-laten dan $8,10 \pm 6,05$ % pada ikan sehat. Terdapat penurunan nyata jumlah monosit seiring dengan perbaikan kesehatan ikan. Makropag (monosit) memiliki aktivitas fagositik yang lama, mengolah antigen untuk memberi tanggap kebal dan secara langsung memperbaiki jaringan rusak dengan membuang sel-sel rusak. Pada kondisi sehat makropag ditemukan dengan persentase 5 % dari seluruh leukosit. Persentase monosit pada ikan sakit relatif lebih tinggi dari yang lainnya, hal ini dikarenakan peranan monosit untuk melakukan fagositosis benda asing berupa virus maupun sisa-sisa kerusakan sel. Fenner *et al.* (1995) menyatakan bahwa makropag memiliki peran utama sebagai penentu kekebalan, karena perannya dalam mengolah dan menyajikan antigen dan kerentanan intrinsiknya tidak tergantung antibodi atau aksi limfokin

Pada gambar sel monosit, memperlihatkan adanya perubahan ukuran, hal ini merupakan difrensiasi monosit untuk mengeliminasi virus dan sel yang dirusak oleh virus, maka sistim imun ikan memproduksi monosit dalam jumlah besar yang diikuti pembesaran ukuran monosit ($4,02 - 10,72 \mu m$) sehingga kemampuan aktivitas fagositiknya tercapai. Tahap akhir pada kerja makropag adalah penelanan, pencernaan dan menyingkirkan material antigenik (Anderson 1974). Peningkatan jumlah monosit pada ikan sakit merupakan sinkronisasi makropag dan limfosit. Makropag sebagai *antigen presenting cell* (APC) melakukan pagositosis untuk memecah dan menghancurkan bagian-bagian antigen ke permukaan, kemudian diikuti oleh respon imun spesifik yakni limfosit untuk mengalami proliferasi dan difresiasi sel (Kresno 2001). Baratawidjaja (2002) menambahkan bahwa mikroba intraselluler akan dipecah oleh APC menjadi peptida kecil-kecil yang imunogenik untuk dikenal limfosit T. Selanjutnya makropag akan melakukan pagositosis terhadap antigen yang telah mengalami opsonisasi oleh antibodi yang diproduksi oleh sel limfosit B. Selanjutnya makropag memiliki kemampuan melepaskan interferon. Baratawidjaja (2002) menyatakan bahwa interferon merupakan sitokin berupa glikoprotein yang dihasilkan oleh berbagai sel tubuh yang mengandung nukleus dan dilepas sebagai respon terhadap infeksi untuk resisten terhadap infeksi virus. Interferon

mempunyai sifat antiviral, yang dapat menginduksi sel-sel sekitar yang terinfeksi untuk resisten terhadap virus dan juga turut mengaktifkan natural killer.

Sel limfosit memiliki persentase yang cukup besar pada setiap kondisi ikan, yakni ikan sakit $41,9 \pm 15,12$ %, ikan carrier-laten $60,43 \pm 8,61$ % dan ikan sehat $54,37 \pm 6,89$ %. Kresno (2001) menyatakan bahwa untuk membatasi penyebaran virus dan mencegah re-infeksi, sistim imun harus mampu menghambat virion masuk ke dalam sel dan memusnahkan sel yang terinfeksi. Fujaya (2004) menyatakan bahwa limfosit tidak bersifat fagositik, tetapi memegang peranan penting dalam pembentukan antibodi. Kekurangan limfosit dapat menurunkan konsentrasi antibodi dan menyebabkan meningkatnya serangan penyakit. Limfosit mengalami peningkatan jumlah terjadi sebagai hasil proliferasi dan difrensiasi sel. Kresno (2001) menyatakan untuk melawan mikroorganisme intraseluler seperti virus diperlukan respon imun seluler yang merupakan fungsi limfosit T dengan cara membunuh sel terinfeksi menggunakan sel T sitotoksik atau mengaktifasi sel terinfeksi untuk mampu membunuh mikroorganisme yang menginfeksi.

Secara nyata persentase trombosit mengalami peningkatan. Pada ikan sakit ditemukan $11,53 \pm 6,77$ %, ikan carrier-laten $25,03 \pm 9,58$ % dan pada ikan sehat mencapai $34,90 \pm 7,08$ %. Persentase trombosit lebih rendah pada ikan sakit, terjadi karena pneranan trombosit untuk menutup jaringan-jaringan yang mengalami nekrosis dan haemorage. Penurunan ini diduga terjadi akibat rendahnya pembentukan trombosit baru dan yang akan telah digunakan. Selain itu kemungkinan lain, bahwa sebagian besar trombosit telah bermigrasi ke daerah-daerah yang mengalami kerusakan, sehingga persentasenya di dalam aliran darah mengalami penurunan. Fujaya (2004) menyatakan bahwa trombosit penting dalam hemostatis karena menjaga kebocoran pembuluh darah.

Penurunan mortalitas pada ikan yang terinfeksi di Waduk Cirata merupakan bukti keberhasilan aktivitas (kemampuan) sistim imun ikan mas yang telah tepapar virus KHV beberapa kali. (Fenner *et al.* 1995) menyatakan pada spesies yang rentan, ketahanan tiap hewan beragam tidak hanya ditentukan genetik inang (yang dapat kemampuan untuk menimbulkan respon kekebalan), umur, status nutrisi dan lainnya. Faktor genetik dan fisiologi secara bersama-sama

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

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

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

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

menentukan ketahanan non spesifik atau alami yang timbul sebagai akibat beroperasinya sistem kekebalan terhadap infeksi ulang.

Setelah ditelusuri, berdasarkan siklus pengembangan budidaya ikan mas di Waduk Cirata, ternyata secara tidak langsung dan tidak disadari, masyarakat telah membantu ikan mas baik induk maupun benih untuk mampu bertahan terhadap infeksi KHV. Kebiasaan masyarakat pada saat untuk melakukan seleksi ikan yang berukuran lebih besar dan dipelihara sebagai calon induk. Kegiatan ini telah berlangsung cukup lama bahkan sebelum ada kasus serangan KHV di Waduk Cirata, bahkan ketika terjadi kematian karena serangan KHV. Ikan hidup berukuran besar dari sisa serangan KHV akan dipelihara sebagai calon induk. Ketika induk matang gonad dan dipijahkan, maka benih-benih yang dihasilkan akan dipelihara kembali di keramba Waduk Cirata, dan demikian selanjutnya, setiap masa panen akan dilakukan seleksi seperti sebelumnya untuk mendapatkan calon induk yang lebih baik. Dengan demikian ikan-ikan yang dipelihara di Waduk Cirata telah terpapar berulang kali terhadap KHV. Terpaparnya ikan secara berulang diindikasikan telah merangsang peningkatan kemampuan sistem ketahanan tubuh ikan baik non-spesifik maupun spesifik serta diikuti terbentuknya sel memori. Parelberg *et al.* (2003) menyatakan bahwa ikan resisten didefinisikan sebagai semua ikan yang mampu hidup setelah minimal 2 kali terinfeksi secara alami atau eksperimen. Diduga ikan yang dipelihara kembali di keramba Waduk Cirata telah memperoleh sistem imun bawaan dari induk. Hal ini menyebabkan ikan mas yang terpapar untuk bertahan terhadap serangan KHV dan diikuti dengan peningkatan survivor ikan.

Umumnya kematian ikan pada benih lebih besar daripada ukuran besar. Woo *et al.* (2002) menyatakan bahwa infeksi virus dapat menyebabkan kematian secara massal khususnya pada benih daripada induk karena perkembangan ketahanan

Beberapa parameter hematologi ikan carrier-laten memperlihatkan nilai yang hampir sama dengan ikan sehat, dengan demikian ikan ini berpeluang dikembangkan menjadi calon ikan mas tahan KHV. Parameter hemoglobin, hematokrit dan total eritrosit, meskipun lebih rendah, namun nilainya masih pada kisaran ikan sehat, sedangkan berdasarkan parameter yang berhubungan dengan

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.

sistim imun yakni total leukosit dan difrensial leukosit memperlihatkan nilai yang lebih tinggi daripada ikan sehat. Hasil kajian ini merupakan suatu indikasi perkembangan dan kemampuan sistim imun ikan mas melawan serangan KHV meskipun ikan masih bersifat carrier-laten. Aspek lain yang mungkin mempengaruhi ketahanan ikan tersebut terjadi perkembangan ketahanan alami secara genetik

© Karakteristik Virulensi Virus

Dalam ilmu kesehatan ikan, sistim ketahanan tubuh berbanding terbalik dengan virulensi virus, yang artinya bahwa kemampuan virus menginfeksi akan meningkat ketika aktivitas sistim imun menurun dan demikian sebaliknya. Perentanan dapat mengalami penurunan ketika virus yang diujikan justru virus yang telah lemah. Kajian nilai virulensi virus atau fish infected dosis-50 (FID-50) akan menunjukkan kemampuan virus menginfeksi sekaligus memperlihatkan perentanan tubuh dan kemampuan sistim imun ikan untuk melawan virus. Tingkat virulensi virus dapat mengalami perubahan. Penentu dari virulensi virus biasanya multigenik (oleh banyak gen) (Fenner *et al.* 1995)

Patokan kajian virulensi virus berdasarkan penelitian Amrullah (2004) yang menemukan FID-50 sekitar titer $10^{4,2}$ /ml. Nilai FID-50 120 jam pada uji virulensi virus KHV yang diperoleh dari ikan sakit mencapai $10^{0,7}$ dan $10^{5,0}$ untuk virus dari ikan carrier-laten. Hasil uji ini memperlihatkan terjadinya penurunan virulensi virus KHV. Namun disisi lain, bahwa virus yang diperoleh dari ikan carrier-laten masih memiliki virulensi yang besar.

Kenyataan di lapangan bahwa virus yang masuk ke kawasan baru tetap menyebabkan kematian mencapai 80-90 %. Seperti pada tahun 2002 di Waduk Cirata (Sunarto *et al.* 2004), tahun 2003 di Danau Singkarak dan di Danau Toba tahun 2004. Penelitian Perelberg *et al.* (2003) dengan melakukan injeksi secara intraperitoneal ekstrak ginjal yang dihomogenkan dan disaring sebanyak 0,4 ml menunjukkan infeksi 37 % dan 82 % setelah 7-10 hari penginfeksian. Antychowicz *et al.* (2005) menemukan bahwa sebagian besar ikan mengalami kematian setelah 24-48 munculnya gejala klinis. Fenner *et al.* (1995) menyatakan bahwa keganasan virus tergantung kepada perimbangan antara virulensi virus dan

ketahanan inang. Suatu infeksi akut merupakan perlombaan antara kemampuan virus bereplikasi, menyebar dalam tubuh dan menyebabkan penyakit dengan kemampuan inang untuk menangkis dan mengendalikan serangan virus.

Hasil uji ini merupakan suatu indikasi bahwa ikan mas yang bebas KHV yang berasal dari luar Waduk Cirata atau yang belum pernah terpapar dengan KHV ternyata masih rentan. Bahkan kerentanan ikan mas juga diperlihatkan dengan munculnya gejala klinis ketika terpapar dengan KHV yang diperoleh dari ikan carrier-laten.

Penurunan tingkat mortalitas ikan mas yang terserang KHV di Waduk Cirata diduga disebabkan oleh beberapa hal yang berkaitan dengan sistem imun dan penurunan virulensi virus. Benih ikan mas yang dipelihara umumnya berasal dari induk ikan mas yang dipelihara di Waduk Cirata dan pernah terpapar dengan KHV dengan demikian benih-benih yang dipelihara telah memiliki imunitas bawaan dari induk sehingga sebagian mampu bertahan. Intensitas serangan virus yang sering muncul diduga menjadi salah satu faktor yang meningkatkan ketahanan ikan, karena sistem imun ikan terlatih untuk melawan serangan KHV, selanjutnya adanya penurunan virulensi virus menjadi salah satu faktor yang menyebabkan menurunnya mortalitas ikan. Iwama and Nakanishi (1996) menyatakan bahwa ikan secara individual dari populasi yang sama memiliki kemampuan yang berbeda untuk menahan bakteri seperti *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida* dan *Renibacterium salmonarium*.

Kualitas Air

Kualitas air yang terpantau di keramba Waduk Cirata maupun di laboratorium, menunjukkan kualitas yang baik untuk kehidupan ikan mas. Kualitas air Waduk Cirata diperoleh dari hasil pengukuran yang dilakukan oleh Badan Pengelola Waduk Cirata (BPWC), yakni Pada pengamatan di keramba Waduk Cirata DO berkisar 4,8 – 5,0 ppm, pH 7,8 dan suhu 28-30°C. Sedangkan hasil pengukuran kualitas di laboratorium diperoleh kandungan oksigen terlarut (DO) berada pada kisaran toleransi ikan yakni 6,31-6,81 ppm, pH air berkisar 7,89-8,14.



SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa keberadaan virus dapat diamati berdasarkan munculnya gejala klinis memutih atau nekrosis pada insang. Virus herpes dapat bersifat carrier-laten tanpa menunjukkan adanya gejala klinis, penurunan suhu dapat digunakan sebagai stressor untuk mendeteksi keberadaan virus pada ikan carrier-laten.

Secara hematologi dan ketahanan sistim imun ikan, ikan carrier-laten memiliki keunggulan daripada ikan sehat dan ikan sakit, yang dapat digunakan sebagai dasar pengembang biakan ikan carrier-laten menjadi ikan mas tahan

Virus KHV yang diperoleh dari Waduk Cirata telah mengalami penurunan virulensi, dengan demikian berpeluang digunakan sebagai calon vaksin khususnya virus yang diperoleh dari ikan carrier-laten

Saran

Untuk memperoleh ikan mas yang lebih tahan terhadap serangan virus, dapat diperoleh melalui seleksi sisa ikan yang hidup setelah beberapa kali terpapar KHV yang selanjutnya dapat dikembangkan melalui program pengembangbiakan sehingga diperoleh ikan-ikan tahan terhadap KHV. Selanjutnya virus-virus yang diperoleh dari ikan carrier-laten dapat diteliti peluangnya menjadi virus yang dilemahkan secara alami.

Peningkatan sistim imun ikan diduga diikuti oleh perbaikan ketahanan alami secara genetik, untuk membuktikan munculnya ikan mas yang tahan KHV secara genetik perlu dilakukan penelitian selanjutnya.

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 literatur 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

- Affandi R dan Tang UM. 2002. Fisiologi Hewan Air. Pekanbaru : Unri Press
- Amrullah. 2004. Penggunaan imunostimulan *Spirulina platensis* untuk meningkatkan ketahanan tubuh ikan koi (*Cyprinus carpio*) terhadap virus herpes [Thesis]. Bogor : Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Anderson D.P. 1974. Fish immunology. Hongkong : TFH publication Ltd.
- _____ and K. A. Swicki . 1993. Basic haematology and serology for fish health program. Paper presented in second symposium on diseases in Asian aquaculture "aquatic animal health and the environmental" Phuket, Thailand. 25-29th October 1993.
- Antychowicz J, Reichert M, Matras M, Bergmann SV and Heanen O. 2005. Epidemiology, pathogenicity and molecular biology of koi herpes virus isolated in Poland. Bull Vet Ist Pulawy 49 : 367-373.
- Aratawidjaja KG. 2002. Immunologi dasar. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Blaxhall PC. 1971. The haematological assessment of the health of fresh water fish. A review of selected literature. J. Fish Biology 4 : 593-608.
- _____ and Daisley K. W. (1973). Routine haematological methods for use with fish blood. J. Fish Biology 5. 771-781
- Cho MY, Shon SK and Park SI. 2005. The status of viral disease of carp in Korea : Its control and research development. Bulletin of Fisheries Research Agency, Yokohama-Japan. 86 : 23-25
- Daili SF dan. Makes WIB. 2002. Infeksi virus herpes. Jakarta : Balai Penerbit Fakultas Kedokteran UI.
- Ellis AE. 1988. Fish vaccination. San Diego : Academy Press
- Engelsma MY and Haenen OLM. 2005. KHVD, Diagnosis, control, research and future in the Netherlands and Europe. Bulletin of fisheries research agency, Yokohama-Japan. 86 : 13-14

- Erlich, AE. 1998. Basic Methodology. Pages 1-6 in Erlich, AE (editor). PCR technology. Principles and applications for DNA amplifications. USA : Stocton Press.
- Fenner FJ, Gibbs EPJ, Murphy FA, Rott R, Studdert MJ and White DO. 1993. Virologi veteriner. California : Academic Press.
- Hujaya Y. 2004. Fisiologi ikan dasar pengembangan teknik perikanan. Rineka Cipta, Jakarta.: Rineka Cipta.
- Gilad O, Yun S, Andre KB, Adkison MA, Zlotkin A, Bercovier H, Eldar A and Hendrick R. 2002. Initial characteristic of koi herpesvirus and development of polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio*. Dis Aquat Org. 48 : 101-108.
- Guyton AC and Hall JE. 1997. Buku ajar fisiologi kedokteran. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC
- Hall. 1972. Blood coagulation and it's disorder in dog. Baltimore : The Williams and Wilknis Company.
- Halver E J and Hardy RW. 2002. Fish nutrition. Third Edition. San Diego– California : Academic Press.
- Hartman KH, Yanong RPE, Petty BD, Floyd RF and Riggs AC. 2004. Koi herpes virus (KHV) disease. Publikasi internet.. <http://www.edis.ifas.edu>.
- Hedrick RP, Gilad O, Yun S, Spangerberg JV, Marty GD, Nordhausen RW, Kebus MJ, Bercovier H and Eldar A. 2000. A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a stain of common carp. American Fisheries Society. Journal of Aquatic Animal Health 12 : 44-57
- _____, O Gilad, Yun SC, Mcdowell TS, Waltzed TB, Kelley GO and Adkison MA. 2005. Initial isolation and characterization of a herpes-like virus (khv) from koi and common carp. Bulletin of Fisheries Research Agency, Yokohama-Japan 86 : 1-7.
- Hubec TC, Smith AS, Robertson JL. 2001. Age-relatd changes in hematology and plasma chemistry of hybrid striped bass (*Morone chrysps x morone saxatilis*). Veterinary Clinical Pathology 30 : 8 - 15
- Huttenhous HBT. 2005. The Ontogeny of the common carp (*Cyprinus carpio* L) immune system. PhD Thesis. Netherlands : Wageningen University.

- Ikuta K and Yamaguchi M.1005. The present of carp fisheries and aquaculture in Japan. Bulletin of Fisheries Research Agency, Yokohama-Japan. 86 : 55-58.
- Ispir U and Dorucu M. 2005. A study the effects of levamisole on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Turk Journal Veteriner Animal Science 29 : 1169-1176.
- Iwama G and Najanishi T. 1996. The fish immune system : organism, pathogen , and environment. California : Academy Press.
- Karunasagar Iddya, Karunasagar Indrani and Reilly A. 1999. Aquaculture and biotechnology. Enfield USA : Science Publishers Inc.
- Kresno SB. 2001. Imunologi diagnosis dan prosedur laboratorium. Edisi Ketiga. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Lawrence AJ and Hemingway KL. 2003. Effects of pollution on fish. Molecular effect and population responses. Hongkong : Blackwell Publishing.
- Prasdiyanti P. 1997. Polymerase Chain Reaction : Cara mudah memperbanyak DNA. Warta Biotek Tahun XI No.3 : 1-3.
- Ragnadottir B. 2006. Innate immunity of fish (overview). Fish and shellfish Immunology 20 : 137-151.
- Malole MB, 1988. Virologi. Bogor : Pusat Antar Universitas Institut Pertanian Bogor.
- Martins ML, Tavares-Das M, Fujimoto RY, Onaka EM and Namora DT. 2004. Haematological alterations of *Leporinus macrocephalus* (Osteichthyes : Anostomidae) naturally infected by *Goezia leporine* (Nematoda : Aniskidae) in fish pond. Arq. Bras. Med.Vet.Zootec. 25 : 640-646.
- Miyazaki T, Okamoto H, Kageyama T and Kobayashi T. 2002. Viremia-associated ana-aki-boy, a new viral disease in color carp *Cyprinus carpio* in Japan. Dis Aquat Org 39 : 183-192
- Moyle PB and Cech JJ. 1988. Fishes : An introduction to ichthyology, 2nd ed USA : Prentice Hall.
- Muladno. 2002. Seputar teknologi rekayasa genetika. Bogor : Pustaka Wira Usaha Muda.

Nabib R dan Pasaribu FH, 1989. Patologi dan penyakit ikan. Bogor : Pusat Antar Universitas Institut Pertanian Bogor.

Nat DR. 2001. Characterization of immune system of carp (*Cyprinus carpio* L.) to the hemoflagellata *Trypanoplasma borelly* Laveran and Mesnil. Disertation. Der Universitat Hannover.

Negal. RL. 1972. Genetically abnormal red blood cell. Florida : CRC Press.

Noga EJ. 2000. Fish disease, diagnosis and treatment. USA : Iowa State Press, a Blackwell Publishing Company.

Prapathi NK, Latimer KS and Burnley VV. 2004. Heamatologic reference interval for koi (*Cyprinus carpio*), including blood cell morphology, cytochemistry and ultrastructure. Veterinary Clinical Pathology 33 : 74-83

OIE]. 2003. Manual of diagnostic test for aquatic animal 2003. <http://www.oie.int>

Ornamental aquatic trade association. 2001. Koi herpes virus (KHV). United Kingdom,

Orun I, Dorucu M and Yazlak H, 2003. Haematological parameters of three cyprinid fish species from Karakaya Dam Lake, Turkey. Online Journal of Biological Sciences 3 : 320-328

Plumb C. 1994. Health maintenance of cultured fishes. Principal microbial diseases. CRC Press.

Parelberg A, Sminov MS, Hutoran M, Diamant A, Bejerano Y and Kotler M. 2003. Epidemiology description of new viral disease afflicting cultured *Cyprinus carpio* in Israel. The Israeli Journal of Aquaculture 55 : 5-12

——— A. Ronen, Hutoran M, Smith Y and. Kotler M. 2005. Protection of cultured *Cyprinus carpio* disease by an attenuated virus vaccine. Vaccine 23 : 3396-3403

Prakorova, Vesely DT, Piackova V, Reschova S and Hulova J. 2005. Current knowledge on koi herpesvirus (KHV) : a Review. Vet. Med.-Crech, 50 : 139-147.

Robitt IM, 1988. Essential immunology. London : Blackwell Scientific Publications.

- Ronen A, Perelberg A, Abramowitz J, Hutoran M, Tinman S, Bejerano I., Steinitz M and Kotler M. 2003. Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in culture *Cyprinus carpio*. Vaccine 21 : 4677- 4684
- Sano M, Iyo T, Miwa S, Iida T. 2005. Diagnosis of koi herpesvirus (KHV) disease in Japan. Bulletin of Fisheries Research Agency. Yokohama-Japan. 86 : 59-61.
- Centra Biosains Dinamika, 2004. Kit Standar KHV Protokol. Jakarta
- Hariff M. Soon, S., Lee, KL and LT Tan,. 2000. Practical Problems with PCR Detection in Asia : The Importance of standardization. in DNA-Based molecular diagnostic techniques : Research Needs for standardization and Validation of the detection of aquatic animal pathogens and disease. Walker and Subasinghe (edt). FAO Fisheries technical papers 396. <http://www.fao.org/docrep/005/x4946e/x494e00.htm>.
- Hapira Y, Magen Y, Zak T, Kotler M, Hulata G, Laviva-sivan B. 2005. Diffrential resistance to koi herpes virus (KHV)/carp nephritis and dill necrosis virus (CNGV) among common carp (*Cyprius carpio* L) strains and crossbreds. Aquaculture 245 : 1-11
- Polihin DD. 2006. Polymerase Chain Reaction (PCR). Bahan pelatihan teknik diagnostik untuk peningkatan produksi peternakan dan perikanan di kawasan timur Indonesia. 10-23 September 2006. Pusat Studi Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi IPB.
- Stoksit M, Deptula W and Travricek M. 2001. Resistance in carps (*Cyprinus carpio* L) affected by a natural bacterial infection. Vet Met-Czech. 46 : 6-11.
- Sunarto A, Rukyani A and Itami T. 2005. Indonesian experience on the outbreak of koi herpesvirus in koi and carp (*Cyprinus carpio*). Bulletin of Fisheries Research Agency. Yokohama-Japan. 86 : 15-21
- Svobadova Z and Vykusova B. 1991. Diagnostics. prevention and therapy of fish disease and intoxications. Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology Vodnany, Czechoslovakia.
- V Lusova, Drastichova J, Svoboda M and Zlabek V. 2003. Effect of deltamethrin on haematological indices of common carp (*Cyprinuc carpio* L.). Acta Vet. Brno 72 : 79-85.
- auhid, Sunarto A, Koeshani I, Supriyadi H dan Gardenia L. 2004. Strategi pengendalian penyakit koi herpes virus (KHV) pada ikan mas dan koi.

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.

makalah workshop pengendalian penyakit koi herpes virus (KHV) pada budidaya ikan air tawar, Bogor.

Tierney KB, Farrell AP and Kennedy CJ. 2004. The Differential leucocyte landscape of four teleost : Juvenile *Oncorhynchus kisutch*, *Clupea pallasii*, *Clupea incosntans* and *Pimephale promelus*. Journal Fish Biolgy 65 : 906-919.

© Tizard I. 1988. An introduction to veterinary immunology. Second Ed. Philadelphia : WB Sanders Company.

© Traver D, Herbomel P, Patton EE, Murphey RD, Yoder JA, Litman GW, Catic S, Amemiya CT, Zon LA and Trede NS. 2003. The Zebrafish as a model organism to study development of the immune system. Advantages in immunology 81 : 253-330

Vedemeyer dan Yusatake. 1977. Clinical methods fore the assessment of the effect on environmental stress in fish health. Technical papers on the U.S. Fish and Wildlife service. US depart. Of the Interior. Fish and Wildlife Service American 89 : 1-17.

Woo PTK, Bruno DW and Lim LHS. 2002. Disease and disorder of finfish in cage culture. Waligford : Cabi Publishing.

Yusa K, Panigoro N, Bahnan M dan Kholidin EB. 2003. Panduan diagnosa penyakit Ikan. Jambi : Balai Budidaya Air Tawar (BBAT) Jambi.

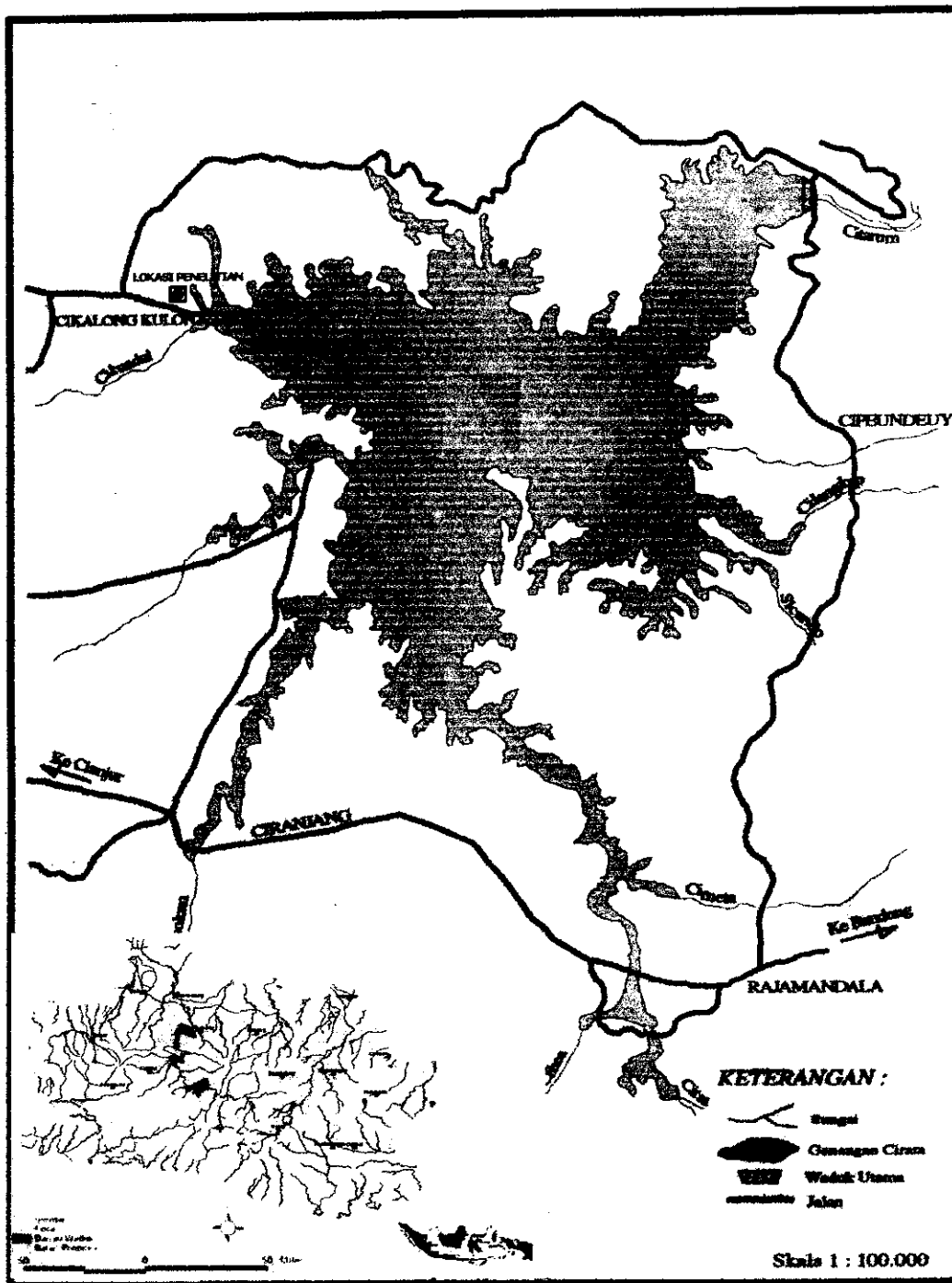


Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

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.

LAMPIRAN

Lampiran 1 Peta Waduk Cirata dan lokasi penelitian



Sumber : Badan Pengawasan waduk Cirata (BPWC), 2006

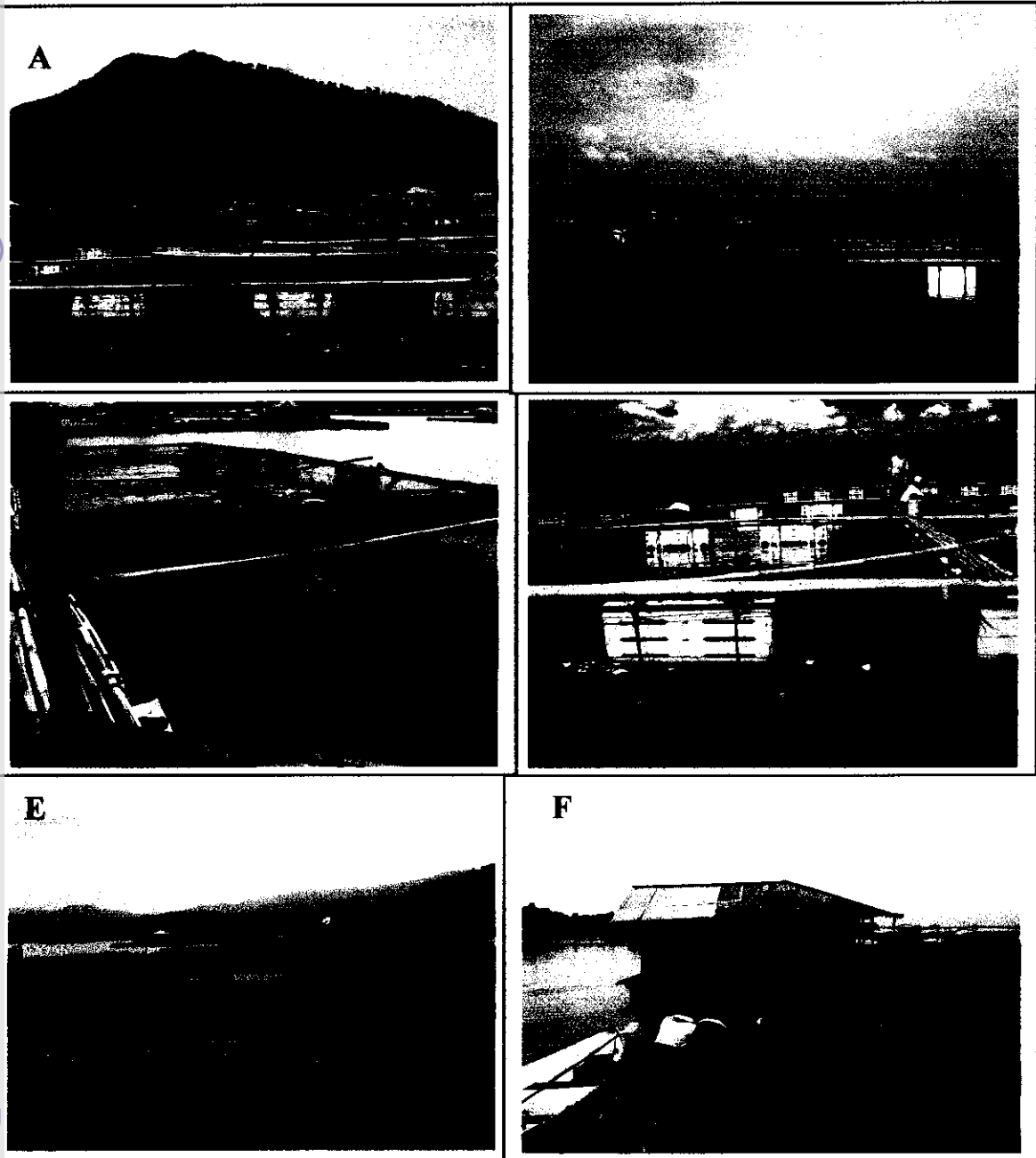
Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

© 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 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.

Lampiran 2 Petak keramba pengambilan sampel



Keterangan : Lokasi A sebanyak 2 petak, lokasi B sebanyak 1 petak, lokasi C sebanyak 1 petak, lokasi D sebanyak 1 petak, lokasi E sebanyak 2 petak dan lokasi F sebanyak 4 petak

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.

Lampiran 3 Prosedur PCR untuk KHV

Deteksi Ikan yang terserang KHV

a. Isolasi DNA Ikan (Sentra BD)

Satu potong insang ikan diambil, dicuci dengan larutan preservatif, selanjutnya insang dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifuse yang baru, dilakukan penambahan 300 μL larutan sel lisis, insang dihancurkan menggunakan pastel secara perlahan, kemudian diinkubasikan pada 65 $^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit. Sebanyak 1,5 μL Rnase ditambahkan, tabung dibolak-balikkan ± 25 kali, diinkubasikan pada suhu 37 $^{\circ}\text{C}$. Selanjutnya dibiarkan sampai mencapai suhu ruang. Sebanyak 100 μL larutan pengendap protein ditambahkan, di vortex pada kecepatan maksimum 20 detik, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan maksimum 20 detik. Setelah disentrifugasi, sebanyak 250 μL diambil secara perlahan, dan ditambahkan 500 μL isopropanol dingin. Tabung dibolak-balikkan sampai terlihat benang putih DNA, kemudian sentrifugasi pada kecepatan maksimum selama 5 menit, kemudian supernatan dibuang dan ditambahkan sebanyak 500 μL ethanol 70 % dingin. Bolak-balikkan tabung beberapa kali untuk mencuci DNA pellet, kemudian disentrifugasi lagi pada kecepatan maksimum selama 3 menit, kemudian pencucian dengan ethanol dingin ini diulangi satu kali lagi. Kemudian supernatan dibuang, balikkan tabung di atas kertas tissue, dibiarkan kering udara 10-15 menit. Selanjutnya DNA dilarutkan kembali dengan pelarut DNA sebanyak 500 μL , inkubasikan pada 65 $^{\circ}\text{C}$ selama 5 menit. Kemudian disimpan pada suhu rendah untuk dapat digunakan selanjutnya

Sebanyak 4 μL DNA hasil isolasi DNA dengan 1 μL 10 X sampel loading buffer di atas parafilm

1. masukka ke dalam sumur gel, elektroforesis menggunakan 1 x TAE buffer pada 100 volts selama 20 menit
- hasil isolasi DNA yang baik akan menunjukkan pita tebal (seperti kumis) pada posisi dekat sumur.

b. Rekasi PCR

Primer Mix, control positif dan negative diletakkan dalam laptopcooler, setelah mencair, sentrifugasi agar seluruh cairan terkumpul di dasar tabung dan mengurangi terbentuknya aerosol. Ready-to-Go-PCR beads diberi label sesuai sample yang akan diamplifikasi termasuk dua tabung kontrol negatif (air dan DNA template negatif kontrol) dan satu untuk kontrol positif. Kemudian dilakukan pencampuran reaksi seperti di bawah ini

Tabel 6 Pencampuran bahan untuk uji PCR

	Kontrol (+) DNA	Kontrol (-) dH ₂ O	Kontrol (-) DNA	Sampel DNA
dH ₂ O (μL)	22	24	22	22
Primer Mix 10 pmol/μL(μL)	1	1	1	1
DNA template (μL)	2	-	2	2
Total volume (μL)	25	25	25	25

Alternatif lain, pada saat mengerjakan sampel dalam jumlah besar, maka dibuat master mix yang terdiri dari :

22 μL distilled water x jumlah sampel (n + 1)

1 μL primer mix x jumlah sampel (n + 1)

Kemudian penambahan 2 μL template (sample yang akan diuji) pada masing-masing tabung, kontrol negatif dan kontrol positif. Kemudian tabung ditutup secepatnya setelah menambahkan template untuk mengurangi peluang kontaminasi silang. Selanjutnya sentrifugasi tabung untuk menurunkan reagen yang masih menempel pada dinding tabung sentrifugasi. Sampel tabung sesegera diletakkan dalam thermal cycler, tutup heated lid. Program siklus yang digunakan adalah 94^o C selama 5 menit (*awal*), 94^o C selama 30 detik (*denaturasi*), 51^o C selama 30 detik (*annealing*), 72^o C selama 30 detik (*elongase*) dan 72^o C selama 7 menit (*finishing*)

Elektroforesis gel agarose

Penyediaan gel agarose 1 % pada saat amplifikasi dilakukan dengan cara mendidihkan 0,5 g bubuk agarose yang dilarutkan dalam 50 mL 1 x TAE buffer. Kemudian setelah mendidih dan jernih diangkat dan didiamkan 10 menit, ditambahkan 2 μ L ethidium bromida. Kemudian dituangkan ke dalam cetakan gel biarkan hingga mengeras \pm 30 menit.

Setelah siklus PCR selesai, tabung disentrifugasi, kemudian diambil 9 μ L hasil amplifikasi dicampur dengan 1 μ L 10 X sample loading buffer di atas parafilm. Kemudian hasil campuran dimasukkan ke dalam sumur. Masukkan 1 μ L 100 bp ladder DNA marker ke dalam sumur sebagai penanda berat molekul hasil amplifikasi. Selanjutnya dilakukan elektroforesis menggunakan 1 x TAE buffer pada 100 volts selama 30 menit atau setelah warna biru dari sample loading dye mencapai batas bawah, elektroforesis dihentikan, angkat gel dan letakkan di atas UV trans-illuminator. Gunakan kaca pelindung pada saat melakukan expose gel pada sinar UV. Setelah warna pada loading dye mencapai batas bawah, elektroforesis dihentikan, angkat gel dan letakkan di atas UV trans-illuminator. Sampel positif akan menghasilkan pita DNA 190 bp, sedangkan sample negatif tidak menghasilkan pita apapun. Dokumentasikan hasil menggunakan kamera digital.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

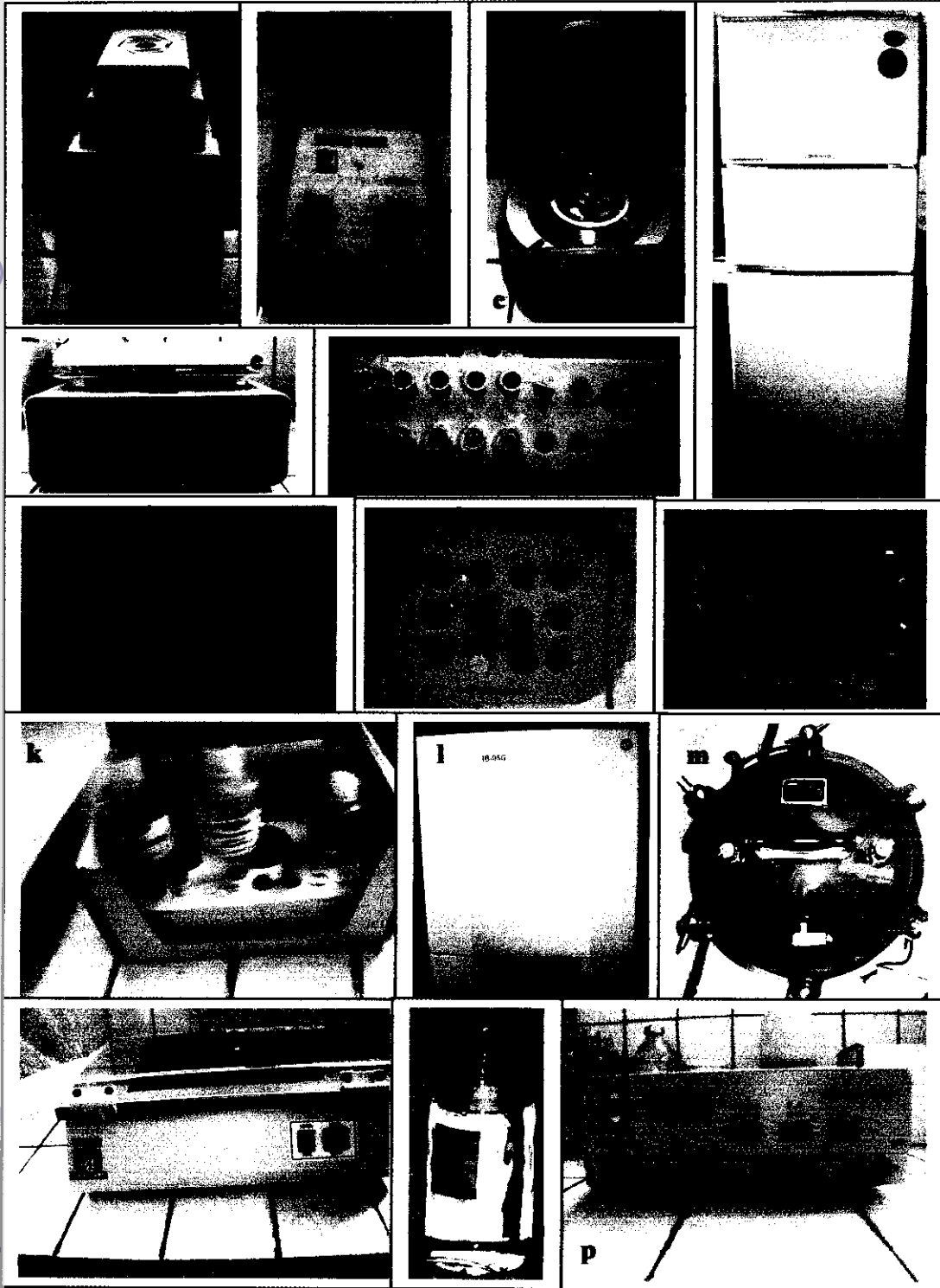
© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

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.

Lampiran 4 Alat dan bahan PCR

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)



Keterangan : a. Thermal cycler; b. vortex; c. sentrifuse; d. freezer; e. hotplate; f. mikro tube; g. mikropipet; h. primer; h. media elektroforesis dan agar gel; h. bahan ekstraksi DNA, ethidium bromida, loading buffer, larutan buffer elektroforesis; l. inkubator/oven; m. Autoclaf; n. sinar ultraviolet; o. akuabides; dan p. pengatur arus.

Lampiran 5 Prosedur pengamatan hematologi ikan

a. Kadar Hematokrit

Kadar hematokrit diukur dengan metode Anderson dan Swicki (1993) yaitu dengan memasukkan sampel darah dari 3 ekor ikan perunit penelitian ke dalam tabung mikrohematokrit secara kapiler hingga terisi 80 %, kemudian ujung tabung disumbat dengan kretoseal. Selanjutnya disentrifuse selama 15 menit dengan kecepatan 3500 rpm. Pengukuran kadar hematokrit dilakukan dengan membandingkan volume padatan sel darah dengan volume seluruh darah dengan skala hematokrit.

b. Total Leukosit

Total leukosit dihitung menurut petunjuk Blaxhall dan Daisley (1973). Sampel darah dari 3 ekor ikan perunit penelitian diisap dengan menggunakan pipet berskala 0,5. Dilanjutkan dengan menghisap larutan Turk's sampai skala 11. Pipet digoyang agar bercampur homogen. Tetesan pertama dibuang sedangkan tetesan berikutnya dimasukkan ke dalam haemositometer dan ditutup dengan kaca penutup. Perhitungan dilakukan pada 5 kotak besar hemositometer.

Jumlah leukosit darah adalah jumlah leukosit terhitung dikalikan dengan 50 sel/mm³.

c. Penghitungan Jenis Leukosit

Jenis leukosit menurut petunjuk Blaxhall dan Daisley (1973). Pemeriksaan dilakukan dengan membuat sediaan ulas darah dari 3 ekor ikan perunit penelitian, dikering udarakan, kemudian difiksasi dengan methanol selama 5 menit. Dibilas dengan akuades, kemudian dikeringudarakan dan dilanjutkan dengan pewarnaan giemsa selama 15 menit. Dicuci dengan air mengalir dan dikering udarakan diantara tissue. Jenis leukosit dihitung dari 100 sel pengamatan.

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.

d. Total Eritrosit

Prosedur pengamatan dan perhitungan jumlah sel darah merah pada penelitian ini sebagai berikut (Blaxhall and Daisley, 1973)

1. darah dihisap dengan pipet berskala 0,5, larutan hayem dihisap sampai skala 101. Pipet digoyangkan membentuk angka delapan selama 3-5 menit.
2. Tetesan pertama dibunag, tetesan berikutnya diteteskan kedalam haemocytometer dan ditutup dengan kaca penutup.
3. Perhitungan dilakukan pada 5 kotak kecil.
4. Jumlah sel darah merah yang terhitung diconversi dengan rumus :

$$\text{Jumlah sel darah merah} = \Sigma \text{ Sel darah merah terhitung} \times 10^4 \text{ sel/mm}^3$$

Kadar Hemoglobin

Prosedur pengukuran kadar hemoglobin dilakukan menurut Wedemeyer dan Kusutake (1977), yaitu :

1. Tabung salinometer diisi dengan larutan HCl 0,1 N sampai angka 10 (garis paling bawah pada tabung salinometer).
2. Tabung tersebut ditempatkan diantara dua tabung warna standar.
3. Darah ikan diambil dari dalam effendorf dari pipet sahli sebanyak 0,02 ml.
4. Ujung pipet dibersihkan, darah dari pipet sahli dimasukkan ke dalam tabung salinometer lalu diamkan selama ± 3 menit.
5. Campuran darah dan HCl dalam tabung salinometer kemudian ditetesi akuades sampai warna pada tabung salinometer sama dengan warna pada tabung standar.

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.

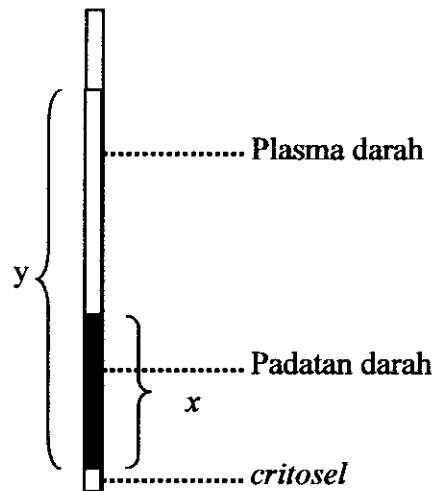
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

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

Lampiran 6 Penghitungan kadar hematokrit (Svobodova and Vikosova 1991).

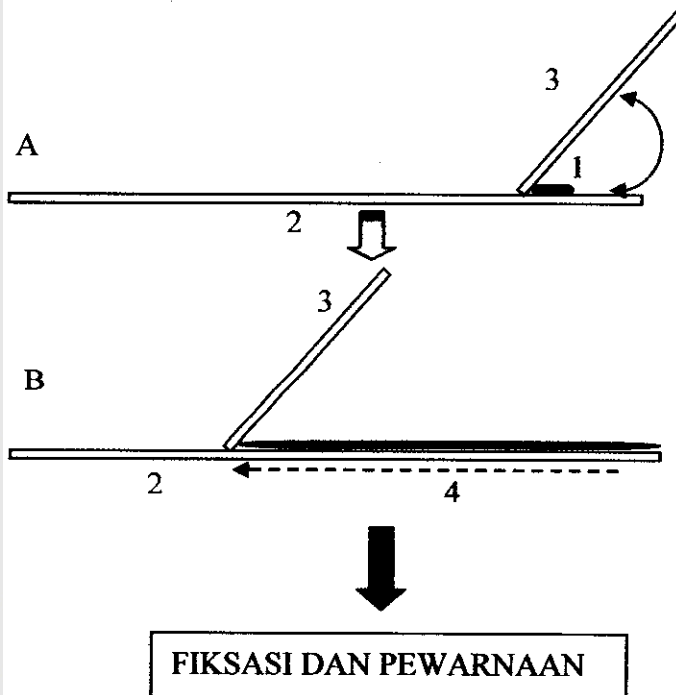
Sampel darah diambil dengan pipet mikrohematokrit non-heparin sampai kira-kira 80 % bagian tabung. Selanjutnya ujung tabung (warna biru) ditutup dengan menggunakan *critosel* kemudian disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Kadar hematokrit diukur dengan menghitung perbandingan padatan dan volume darah. Kadar Hematokrit dinyatakan sebagai % volume padatan sel darah.

Penghitungan kadar hemtokrit = $(x/y) \times 100\%$



Lampiran 7 Pembuatan Preparat Ulas Darah (Svobodova and Vykusova 1991).

Pengamatan jumlah dan jenis lekosit ikan mas dihitung dari hasil preparat ulas darah. Preparasi dimulai dengan perendaman gelas objek dalam methanol guna membersihkannya dari lemak. Selanjutnya setetes darah ditempatkan pada sisi ujung objek gelas, kemudian objek gelas lainnya ditempelkan dengan sudut 45° terhadap gelas objek pertama sampai darah menyebar ke sisi ujung objek gelas, kemudian digeser ke belakang hingga menyentuh darah. Kemudian gelas obyek kedua digeser berlawanan arah sehingga membentuk lapisan tipis darah. Preparat dikering-udarkan dan difiksasi dengan metanol selama 5 menit. Preparat kemudian dibilas dengan akuades dan dikering-udarkan kembali, selanjutnya diwarnai dengan pewarna giemsa selama 15 menit. Preparat dibilas kembali dengan air akuades untuk mengurangi kelebihan warna dan dikeringkan dengan tissue.



Keterangan gambar:

A-B. Penyebaran darah

1. Tetesan darah

2. Objek Gelas 1.

3. Objek gelas 2

4. Arah penyebaran

FIKSASI DAN PEWARNAAN

Lampiran 8 Metode Pembuatan Preparat Histologi (Yuasa *et al*, 2003)

a. Fiksasi.

Larutan fiksasi yang digunakan adalah larutan formalin berpenyangga (pH 7,0). Organ tubuh ikan yakni insang, daging dan ginjal dipisahkan dari tubuh, kemudian difiksasi dalam larutan formalin.

Tabel 5 Komposisi larutan formalin berpenyangga fosfat (pH 7,0).

Bahan Kimia	Jumlah
Formalin	100 ml
NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O (natrium hidrogenfosfat)	4 g
Na ₂ PO ₄ (dinatrium hidrogenfosfat)	6,5 g
Akuades	900 ml

b. Dehidrasi dan Pengisian paraffin

Spesimen dibilas dengan air mengalir selama 15-30 menit untuk mencuci formalin. Pindahkan jke dalam setiap larutan untuk dehidrasi dan pengisian paraffin. Larutan dan waktu perendaman yang digunakan sesuai tabel berikut.

Tabel 6 Larutan dan Waktu perendaman dehidrasi dan embedding.

Larutan	Waktu Perendaman
Ethanol 70 %	1-2 jam
Ethanol 80 %	1-2 jam
Ethanol 90 %	1-2 jam
Ethanol 95 %	1-2 jam
Ethanol 100 %	1-2 jam
Ethanol 100 %	1-2 jam
Xylel	1-2 jam
Xylel	1-2 jam
Xylel	1-2 jam
Parafin (pada suhu 60 ^o C)	1-2 jam
Parafin (pada suhu 60 ^o C)	1-2 jam
Parafin (pada suhu 60 ^o C)	1-2 jam

c. Bloking

Letakkan tempat jaringan (cetakan untuk blok paraffin) pada hot plate suhu 65^o C dan isi dengan parafin yang telah dilelehkan. Letakkan organ pada dasar cetakan lalu taruh ke atas es untuk sedetik. Setelah itu letakkan kaset jaringan

tersebut diatas cetakan. Tambahkan paraffin pada cetakan secukupnya. Blok parafin ini diletakkan pada papan es sampai parafin membeku. Kemudian lepaskan blok arafin dari cetakan lalu dipotong 2-3 mm dari tepi organ.

d. Pembuatan Preparat Sediaan

Blok parafin dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4 μm . Jaringan yang dipotong melekat pada pisau mikrotom diambil dengan menggunakan kertas karton yang agak basah dan pindahkan ke wadah yang telah diisi air. Setelah itu, pindahkan ke atas kaca preparat dan letakkan dalam air hangat pada waterbath suhu 50°C selama 5 detik guna mengembangkan parafin. Letakkan kaca preparat tersebut diatas slide warmer suhu 55°C selama 1 jam untuk merekatkan jaringan tersebut pada kaca preparat.

e. Pewarnaan H & E

Deparafinasi

1. Rendam dalam xylel-1 selama 10 menit
2. Rendam dalam xylel-2 selama 10 menit
3. Rendam dalam etanol absolut-1 selama 5 menit
4. Rendam dalam etanol absolut-2 selama 5 menit
5. Rendam dalam etanol 90% beberapa menit
6. Rendam dalam etanol 80% beberapa menit
7. Rendam dalam etanol 70 beberapa menit
8. Bilas dengan air mengalir selama 1 menit
9. Bilas dengan akuades selama beberapa detik.

Pewarnaan

1. Rendam dalam larutan hematoksilin selama 4 menit
2. Bilas dengan air mengalir selama 15 menit
3. Rendam dalam akuades selama 1 detik
4. Rendam dalam larutan eosin selama 5-6 menit
5. Rendam dengan akuades selama sedetik.

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

- Dehidrasi

1. Rendam dalam etanol 70 % selama 1 detik
2. Rendam dalam etanol 80 % selama 1 detik
3. Rendam dalam etanol 90 % selama beberapa detik
4. Rendam dalam etanol 95 % selama 5 menit
5. Rendam dalam etanol absolut-1 selama 10 menit
6. Rendam dalam etanol absolut-2 selama 15 menit

- Penetrasi

1. Rendam dalam Xylel-1 selama 10 menit
2. Rendam dalam Xylel-2 selama 10 menit
3. Rendam dalam Xylel-3 selama 10 menit

- Penutupan Jaringan

1. Ambil 1 tetes zat perekat (biolekt) dan letakkan ditengah-tengah kaca penutup
2. Ambil preparat sediaan yang masih terendam dalam larutan xylel lalu segera letakkan penutup diatasnya.
3. Tekan keluar udara yang terdapat diantara kaca preparat dan kaca penutup dengan menggunakan forcep.

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.

Lampiran 9 Analisis anova one-way total eritrosit pada setiap status kesehatan ikan

Tabel crosstab total eritrosit terhadap status kesehatan ikan

Total eritrosit	Status kesehatan ikan			Total
	Sakit	Carrier-laten	Sehat	
380000	1			1
560000	1			1
670000		1		1
840000	1			1
850000	4			4
940000			1	1
1020000		1		1
1040000	1			1
1060000	1			1
1070000			1	1
1080000		1		1
1090000			1	1
1150000	1			1
1170000		2		2
1190000	1	2		3
1220000			1	1
1250000	1	1		2
1260000		1		1
1280000	1	1		2
1290000	1			1
1300000			1	1
1330000	1	2	1	4
1350000	1			1
1370000		2		2
1380000		1		1
1390000			1	1
1400000		1		1
1420000		1	1	2
1430000	1			1
1460000			1	1
1520000			1	1
1530000		1		1
1560000			1	1
1570000	1		2	3
1590000			1	1
1600000	1			1
1610000	1			1
1620000			1	1
1660000	1	2		3
1680000			1	1
1710000	1			1
1730000			2	2
1740000			1	1
1770000		1		1
1850000	1		2	3
1940000			1	1
1970000		1		1
2000000			1	1

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

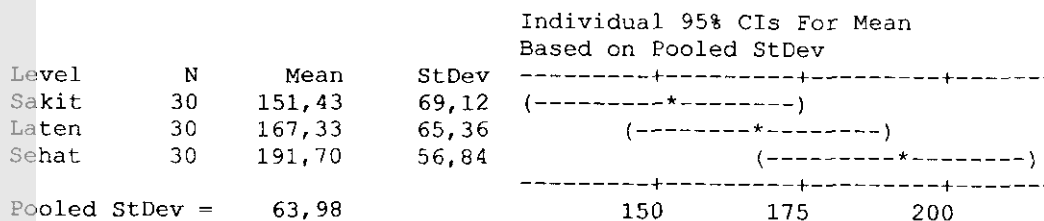
Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

2020000		1		1
2040000			1	1
2070000			1	1
2080000	1			1
2130000	1			1
2190000		1		1
2320000			1	1
2370000	1			1
2440000		1		1
2510000		2		2
2660000		1		1
2680000	1			1
2780000		1		1
2850000	2			2
2920000	1			1
3090000			1	1
3150000			1	1
3620000		1		1
3680000			1	1
3990000			1	1
Total	30	30	30	90

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	2	24679	12340	3,01	0,054
Error	87	356156	4094		
Total	89	380836			



Rangkuman data total eritrosit (x 10⁴ sel/ml)

Variabel	N	Rata-rata	Median	Stadar deviasi	SE mean	minimum	maksimum
Sakit	30	151,4	134,0	69,1	12,6	38	292
Carrier-Laten	30	167,3	139,0	65,4	11,9	67	362
Sehat	30	191,7	173,5	56,8	10,4	17	315

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 literatur 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.

Lampiran 10 Analisis anova one-way total leukosit pada setiap status kesehatan ikan

Tabel crosstab total leukosit terhadap status kesehatan ikan

Total leukosit	Status kesehatan Ikan			Total
	Sakit	Carrier-laten	Sehat	
11300	1			1
13500	1			1
15350		1		1
16600	1			1
16650	1			1
16900			1	1
17050			1	1
18200			1	1
18400	1			1
18600			1	1
19050	1			1
20350			1	1
20600		1		1
21150	1			1
21400			1	1
21600	1			1
21650		1		1
21750			1	1
21900		2		2
22150	1			1
22300	1			1
22600		1		1
23400	1			1
23550			1	1
23850		1	1	2
23950			1	1
24100	1	2		3
24500		1	1	2
24600		1		1
25200			1	1
25300		1		1
25600	1			1
25700	1			1
26200			1	1
26350			1	1
26600		1		1
26750	1			1
26850			1	1
27150		1		1
27200			1	1
27350		1		1
27450		1		1
27650			1	1
27750	1			1
27800	1			1
28400			1	1
28450	1			1

© 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.

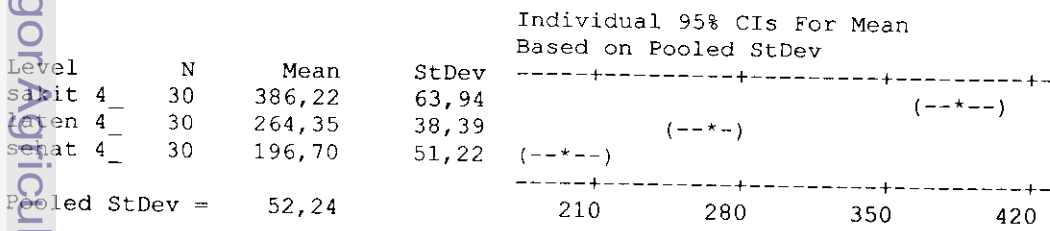
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

- 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.

28550	1		1	1
28600	1	1		2
29000		2		2
29950			1	1
30150			1	1
30600		1		1
30950		1		1
31000			1	1
31100			1	1
31400	1		1	2
31650			1	1
31700	1			1
32200		1		1
32300	1			1
32500			1	1
32950			1	1
33300			1	1
33900	1			1
34250		1		1
35050			1	1
35900	1			1
37000	1			1
38250			1	1
38900	1			1
40250		1		1
40500		2		2
40600	1			1
41750	1			1
41900		1		1
43800	1			1
44650		1		1
48100		1		1
63300		1		1
	30	30	30	90

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	2	553446	276723	101,42	0,000
Error	87	237384	2729		
Total	89	790829			



Tabel Rangkuman data total leukosit (x 100 sel/ml)

Variabel	N	Rata-rata	Median	Stadar deviasi	SE mean	minimum	maksimum
Sakit	30	386,20	389,8	63,90	11,7	234,0	486
Carrier-laten	30	264,35	272,5	38,39	7,01	153,5	325
Sehat	30	196,70	201,5	51,22	9,35	101,5	311

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 literatur 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.

Lampiran 11 Analisis anova one-way hemoglobin pada setiap status kesehatan ikan

Tabel crosstab hemoglobin terhadap status kesehatan ikan

Hemoglobin	Status kesehatan Ikan			Total
	Sakit	Carrier-laten	Sehat	
2,6	2			2
2,8	1			1
3,0	2			2
3,8	4			4
4,2	3	4		7
4,4	3	1		4
4,6		3	2	5
4,8		1		1
4,9			1	1
5,0	2	1	3	6
5,2		2	3	5
5,4		2	2	4
5,6	1		1	2
5,8	2	2	2	6
5,9			1	1
6,0	2	1	4	7
6,1			1	1
6,2	1	1	1	3
6,4	1	4		5
6,5			2	2
6,6		2	1	3
6,7			1	1
6,9			1	1
7,0		2		2
7,2	1	1	1	3
7,6			3	3
7,8	2	2		4
8,0		1		1
8,2	1			1
8,4	1			1
total	29	30	30	89

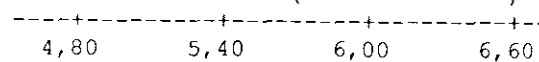
Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	2	18,89	9,45	5,81	0,004
Error	84	136,67	1,63		
Total	86	155,56			

Individual 95% CIs For Mean
Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev
Sakit_1	29	5,041	1,716
Laten_1	29	5,855	1,110
Sehat_1	29	6,141	0,840

Pooled StDev =



- 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 buku, dan sebagainya;
 - 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.

Rangkuman data hemoglobin (g) menggunakan program Minitab

Variabel	N	Rata-rata	Median	Stadar deviasi	SE mean	minimum	maksimum
Sakit	29	5,041	4,4	1,716	0,319	2,6	8,4
Carrier-laten	30	5,880	5,9	1,099	0,201	4,2	8,0
Sehat	30	6,137	6,0	0,826	0,151	4,6	7,6

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.

Lampiran 12 Analisis anova one-way hematokrit pada setiap status kesehatan ikan

Tabel crosstab hematokrit terhadap status kesehatan ikan

Hematokrit	Status kesehatan ikan			Total
	Sakit	Carrier-laten	Sehat	
14,16		1		1
17,23	2			2
18,69		1		1
19,02	1			1
19,24			1	1
20,03		1		1
22,54		1		1
22,56	1			1
22,63			1	1
22,75			1	1
23,49	1			1
23,86	1			1
24,13			1	1
24,22		1		1
24,31	2		1	3
24,64			1	1
24,66			1	1
24,98	1	1		2
25,58		1	1	2
26,22			1	1
26,33	1	1		2
26,57	1	1		2
26,88			1	1
27,32		1		1
27,50			1	1
27,82		1		1
28,00	1		2	3
28,03			1	1
28,15	1			1
28,30			1	1
28,64	1	1		2
28,90		1		1
29,00	1			1
29,03	1		1	2
29,33	1			1
29,35		1		1
29,74			1	1
30,14		1		1
30,25			1	1
30,30		1	1	2
30,33			1	1
30,43		1		1
30,48			1	1
30,87	1			1
31,33	1	2	1	4
31,40		1		1
31,48		1		1

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.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang



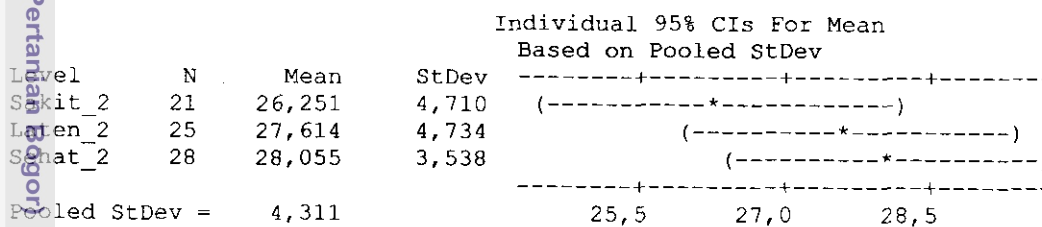
Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

31,87		1		
32,00		1		1
32,08			2	2
32,20			1	1
32,22			1	1
32,31			1	1
32,33			1	1
32,36	1	1		2
32,57		1		1
34,67	1			1
Total	21	25	28	74

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	2	40,9	20,4	1,10	0,338
Error	71	1319,6	18,6		
Total	73	1360,5			



Rangkuman data hematokrit (%)

Variabel	N	Rata-rata	Median	Stadar deviasi	SE mean	minimum	maksimum
Sakit	21	26,250	26,570	4,710	1,03	17,23	34,67
Carrier-laten	25	27,614	28,900	4,734	0,947	14,16	25,28
Sehat	28	28,055	28,165	3,538	0,667	19,24	24,89

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

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

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

Lampiran 13 Analisis anova one-way neutrofil pada setiap status kesehatan ikan mas (*Cyprinus. carpio*)

Tabel crosstab netrofil terhadap status kesehatan ikan

Netrofil	Status kesehatan Ikan			Total
	1	2	3	
0	11	13	20	44
1	9	4	3	16
2	4	8	5	17
3	2	1	2	5
4	1	2		3
5	2	1		3
6		1		1
10	1			1
Total	30	30	30	90

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	2	19,09	9,54	1,75	0,179
Error	87	473,37	5,44		
Total	89	492,46			

				Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev	
Level	N	Mean	StDev	-----+-----+-----+-----	
sakit 3	30	3,700	2,215	(-----*-----)	
laten 3	30	2,933	2,677	(-----*-----)	
sehat 3	30	2,600	2,061	(-----*-----)	
Pooled StDev =				2,40	3,20 4,00

Rangkuman data neutrofil

Variabel	N	Rata-rata	Median	Stadar deviasi	SE mean	minimum	maksimum
Sakit	30	3,700	3,5	2,215	0,404	0,0	5
Carrier-laten	30	2,993	2,5	2,677	0,489	0,0	4
Sehat	30	2,600	3,0	2,061	0,376	0,0	4

Lampiran 14 Analisis anova one-way limfosit pada setiap status kesehatan ikan

Tabel crosstab limfosit terhadap status kesehatan ikan

Limfosit	Status kesehatan ikan			Total
	Sakit	Carrier-laten	Sehat	
4	1			1
17	1			1
19	1			1
20	1			1
24	1			1
25	2			2
32	1			1
33	1			1
34	1			1
37	1	1		2
39	1		1	2
40	1	1		2
43	4			4
45			1	1
46	1			1
47			1	1
49	1			1
50	2	2		4
51			1	1
52	1	1	1	3
53		1		1
54	1	3	4	8
55	1		2	3
57		1		1
59			1	1
60		1		1
62	1	1	1	3
63	1	1	1	3
65		1	1	2
66	2	3	1	6
67			1	1
68	1	1	2	4
69		3	5	8
70		1		1
71		1	2	3
72		1		1
73		4	1	5
76			1	1
77		1		1
78	1			1
80		1		1
82			2	2
Total	30	30	30	90

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:

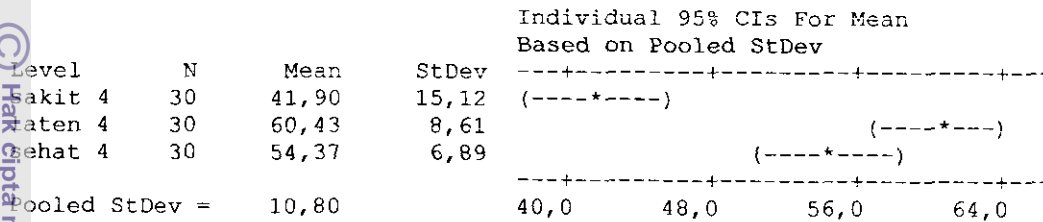
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

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.

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	2	5357	2679	22,96	0,000
Error	87	10151	117		
Total	89	15508			



Rangkuman data limfosit

Variabel	N	Rata-rata	Median	Stadar deviasi	SE mean	minimum	maksimum
akit	30	41,90	43	15,12	2,76	17	72
arrier-	30	60,43	62	8,61	1,57	37	73
aten	30	54,37	54	6,89	1,26	36	65

Lampiran 15 Analisis anova one-way monosit pada setiap status kesehatan ikan

Tabel crosstab monosit terhadap status kesehatan ikan

Monosit	Status kesehatan ikan			Total
	Sakit	Carrier-laten	Sehat	
0		1	7	8
1			2	2
2		2	2	4
3		2	4	6
4		2	3	5
5		2		2
6		4	1	5
7		1		1
8			2	2
10		1		1
11		1		1
12		1	3	4
13		1		1
14	1	2		3
15		2		2
16			3	3
17		3	2	5
18	1	1		2
19		2		2
20	1	1		2
21	1			1
26	3	1	1	5
27	1			1
28	1			1
30	3			3
32	1			1
35	1			1
38	1			1
40	1			1
41	1			1
42	1			1
45	2			2
46	1			1
48	1			1
50	1			1
54	1			1
64	1			1
65	1			1
66	2			2
69	1			1
70	1			1
	30	30	30	90

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	2	18860	9430	83,74	0,000
Error	87	9797	113		
Total	89	28657			

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev			
Level	N	Mean	StDev
akut 4	30	40,37	16,31
aten 4	30	11,50	5,94
ehat 4	30	8,10	6,05
Pooled StDev =		10,61	

angkuman data monosit

Variabel	N	Rata-rata	Median	Stadar deviasi	SE mean	minimum	maksimum
akut	30	40,37	39,0	16,31	2,98	14	69
carrier-	30	11,50	11,5	5,94	1,08	3	26
aten							
ehat	30	8,10	6,0	6,05	1,10	2	26

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:

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

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

Lampiran 16 Analisis anova one-way trombosit pada setiap status kesehatan ikan

Tabel crosstab trombosit terhadap status kesehatan ikan

Trombosit	Status kesehatan ikan			Total
	1	2	3	
2	2			2
3	3			3
4	1			1
5	2		1	3
6	2			2
8	1			1
9	1			1
10	3		1	4
12	1	5	1	7
13	2			2
14	1			1
15	2	2		4
16	2	1	1	4
18	1	1		2
19	2	1		3
20	2			2
21		2		2
22		1		1
23		1		1
24		3	2	5
25	2		1	3
27			1	1
28		1	2	3
29		1	4	5
30			2	2
31		1	3	4
32			1	1
33		2		2
34		1		1
35		2	1	3
36			1	1
37		1		1
38		1	2	3
39		1	1	2
41		2		2
42			3	3
46			1	1
49			1	1
	30	30	30	90

- 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.

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	2	8258,5	4129,2	65,96	0,000
Error	87	5446,0	62,6		
Total	89	13704,5			

Individual 95% CIs For Mean
Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	
sakit 4	30	11,533	6,771	(---*---)
aten 4	30	25,067	9,581	(---*---)
ehat 4	30	34,900	7,083	(---*---)
Pooled StDev = 7,912				16,0 24,0 32,0

Angkuman data trombosit

Variabel	N	Rata-rata	Median	Standar deviasi	SE mean	minimum	maksimum
sakit	30	11,53	10	6,77	1,24	2	25
carrier-	30	25,07	24	9,58	1,75	12	41
aten							
ehat	30	34,90	35	7,08	1,29	12	49

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.

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.

Lampiran 17 Hasil uji virulensi virus (FID₅₀ -120 jam)

Lampiran 17 Hasil uji virulensi virus (FID₅₀-120 jam)

Perlakuan : Virus berasal dari ikan sakit					
Perlakuan	Konsentrasi	Ulangan	Terinfeksi	Tidak terinfeksi	Total ikan
Ikan Sakit	10 ⁻⁵	1	4	1	5
		2	4	1	5
		3	5	0	15
	10 ⁻⁶	1	13	2	5
		2	4	1	5
		3	4	2	15
	10 ⁻⁷	1	3	3	5
		2	11	2	5
		3	3	3	5
		1	2	3	5
		2	2	3	15
		3	7	8	

Ulangan	Ikan tidak terinfeksi	Kumulatif ikan terinfeksi	Kumulatif tidak ikan terinfeksi	Prosen
1	21	21	2	
2	21	42	6	

Konsentrasi virus	Ikan terinfeksi	Ikan tidak terinfeksi	Kumulatif ikan terinfeksi	Kumulatif tidak ikan terinfeksi	Prosentase
10 ⁻⁵	13	2	21	2	91
10 ⁻⁶	11	4	18	6	75
10 ⁻⁷	7	8	7	14	33
	45	45			

$$FID_{50} = \frac{> 50 - 50}{> 50 - < 50}$$

$$FID_{50} = \frac{91 - 50}{91 - 33}$$

$$FID_{50} = 10^{6,7}$$

Perlakuan : Virus berasal dari ikan carrier-laten

Perlakuan	Konsentrasi	Ulangan	Terinfeksi	Tidak terinfeksi	Total ikan
Ikan Carrier-Laten	10^{-5}	1	4	1	5
		2	3	2	5
		3	3	2	5
	10^{-6}		10	5	
		1	2	3	5
		2	1	4	5
	10^{-7}	3	3	2	5
			6	9	
		1	2	3	5
		2	1	4	5
		3	1	4	5
			4	11	15

Konsentrasi virus	Ikan terinfeksi	Ikan tidak terinfeksi	Kumulatif ikan terinfeksi	Kumulatif tidak ikan terinfeksi	Prosentase
10^5	10	5	20	5	80
10^{-6}	6	9	10	19	34
10^{-7}	4	11	4	30	11

$$FID_{50} = 80-50/80-34 = 30/46=0,65= 10^{5,6}$$

$$FID50 = \frac{> 50 - 50}{> 50 - < 50}$$

$$FID50 = \frac{91 - 50}{91 - 33}$$

$$FID50 = 10^{6,7}$$

Lampiran 17 Hasil uji virulensi virus (FID₅₀ -120 jam)

Perlakuan : Virus berasal dari ikan sakit

Perlakuan	Konsentrasi	Ulangan	Terinfeksi	Tidak terinfeksi	Total ikan
Ikan Sakit	10 ⁻⁵	1	4	1	5
		2	4	1	5
		3	5	0	5
			13	2	15
	10 ⁻⁶	1	4	1	5
		2	4	1	5
		3	3	2	5
			11	3	15
	10 ⁻⁷	1	3	2	5
		2	2	3	5
		3	2	3	5
			7	8	15

Konsentrasi virus	Ikan terinfeksi	Ikan tidak terinfeksi	Kumulatif ikan terinfeksi	Kumulatif tidak ikan terinfeksi	Prosentase
10 ⁻⁵	13	2	21	2	91
10 ⁻⁶	11	4	18	6	75
10 ⁻⁷	7	8	7	14	33
	45	45			

$$FID_{50} = \frac{> 50 - 50}{> 50 - < 50}$$

$$FID_{50} = \frac{91 - 50}{91 - 33}$$

$$FID_{50} = 10^{6,7}$$

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.

Perlakuan : Virus berasal dari ikan carrier-laten

Perlakuan	Konsentrasi	Ulangan	Terinfeksi	Tidak terinfeksi	Total ikan
Ikan Carrier-Laten	10^{-5}	1	4	1	5
		2	3	2	5
		3	3	2	5
	10^{-6}		10	5	
		1	2	3	5
		2	1	4	5
		3	3	2	5
	10^{-7}		6	9	
		1	2	3	5
		2	1	4	5
		3	1	4	5
			4	11	15

Konsentrasi virus	Ikan terinfeksi	Ikan tidak terinfeksi	Kumulatif ikan terinfeksi	Kumulatif tidak ikan terinfeksi	Prosentase
10^5	10	5	20	5	80
10^{-6}	6	9	10	19	34
10^{-7}	4	11	4	30	11

$$FID_{50} = 80 - 50 / 80 - 34 = 30 / 46 = 0,65 = 10^{5,6}$$

$$FID_{50} = \frac{> 50 - 50}{> 50 - < 50}$$

$$FID_{50} = \frac{91 - 50}{91 - 33}$$

$$FID_{50} = 10^{6,7}$$

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.