

B/FFH
2004
079

**DETEKSI KOI HERPES VIRUS PADA IKAN KOI (*Cyprinus
carpio*) MENGGUNAKAN TEKNIK *POLYMERASE CHAIN
REACTION* (PCR) DI BALAI KARANTINA IKAN
SOEKARNO-HATTA**

SAPTOAJI TRISAKSONO



**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR**

2004

RINGKASAN

SAPTOAJI TRISAKSONO. BO1400111. **DETEKSI KOI HERPES VIRUS PADA IKAN KOI (*Cyprinus carpio*) MENGGUNAKAN TEKNIK *POLYMERASE CHAIN REACTION* DI BALAI KARANTINA IKAN SOEKARNO – HATTA**. Skripsi. Dibawah bimbingan PIEN SUPATMIRAH WIBOWOMOEKTI dan RINI WIDAYATI.

Penelitian yang dilakukan bertujuan untuk mendeteksi kemungkinan adanya penyakit *Koi Herpes Virus* (KHV) dengan pemeriksaan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada ikan koi (*Cyprinus carpio*).

Hasil penelitian dari bulan Juni sampai Juli 2003 bahwa ikan koi impor dari negara Jepang menunjukkan hasil yang negatif sama dengan data yang berasal dari laporan intersepsi Balai Karantina Ikan Soekarno-Hatta (BKISH) ikan koi impor bulan Januari sampai Mei 2003 dari negara Jepang, Malaysia dan Singapura. Ikan koi yang diekspor ke negara Perancis, Jepang, dan Jerman bulan Juni sampai dengan bulan Juli 2003 menunjukkan hasil yang negatif sama dengan data yang berasal dari laporan intersepsi BKISH ikan koi ekspor bulan Januari sampai Mei 2003 dari negara Belanda dan Jerman. Ikan koi yang dikeluarkan secara domestik ke daerah Balikpapan bulan Juni 2003 menunjukkan hasil yang negatif sama dengan data intersepsi BKISH ke daerah Pontianak bulan Februari 2003 karena tidak ada DNA target yang teramplifikasi. Hasil pemantauan ikan koi dari Lubuk Linggau menunjukkan hasil yang positif karena ada DNA target yang teramplifikasi, hal tersebut membuktikan bahwa penyebaran ikan koi hanya terbukti positif pada pemantauan antar daerah di Indonesia sedangkan impor dan ekspor menunjukkan hasil yang negatif. Pendeteksian KHV dengan PCR pada ikan koi dapat dilakukan secara cepat sehingga penyebaran penyakit dapat dihindari.

**DETEKSI *KOI HERPES VIRUS* PADA IKAN KOI
(*Cyprinus carpio*) MENGGUNAKAN TEKNIK *POLYMERASE
CHAIN REACTION* (PCR) DI BALAI KARANTINA IKAN
SOEKARNO-HATTA**

SAPTOAJI TRISAKSONO

Skripsi

Sebagai salah Satu Syarat

Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Hewan
pada Fakultas Kedokteran Hewan

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR**

2004

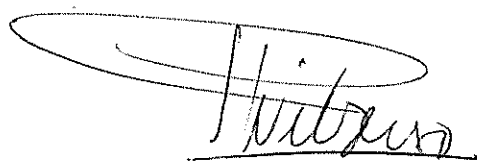
Judul Skripsi : DETEKSI *KOI HERPES VIRUS* PADA IKAN KOI (*Cyprinus carpio*) MENGGUNAKAN TEKNIK *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR) DI BALAI KARANTINA IKAN SOEKARNO – HATTA

Nama : SAPTOAJI TRISAKSONO

NRP : B01400111

Disetujui,

Dosen Pembimbing I



Drh. Pien S. Wibowomoekti, Msi

NIP. 130281949

Dosen Pembimbing II

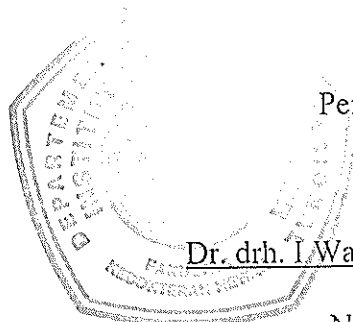


Ir. Rini Widayati

NIP. 080109206

Diketahui,

Pembantu Dekan I



Dr. drh. I Wayan Teguh Wibawan, MS.

NIP. 131129090

Tanggal lulus : 09 SEP 2004



When it HURTS 😞 to look back, and you're SCARED 🙏 to look ahead,
you can look beside you and your BEST FRIEND will be there. 😊👉👈😊

Good friends are like STARS ★★★★★ You don't always see them, but you know
they are ALWAYS THERE.

"I believe that friends are quiet angels 🧚 who lift us to our feet 🕊️ when
our wings have trouble remembering how to fly." 🕊️

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Jakarta, pada tanggal 17 Agustus 1982 dari ayah Drs. Suhari dan Ibu Sri Suwarni. Penulis merupakan anak keempat dari empat bersaudara.

Pada tahun 1988 penulis masuk Sekolah Dasar Negeri Tugu X dan lulus pada 1994, kemudian melanjutkan ke SLTP Negeri 2 Cimanggis, tahun 1995 penulis pindah ke SLTP Negeri 226 Jakarta dan lulus pada tahun 1996. Pada tahun yang sama penulis melanjutkan pendidikan di SMU Keluarga Widuri dan lulus tahun 2000.

Tahun 2000 penulis diterima di Institut Pertanian Bogor melalui jalur Undangan Seleksi Masuk Institut Pertanian Bogor (USMI).

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, dengan rahmat dan hidayahnya sehingga penyusunan skripsi yang berjudul “Deteksi *Koi Herpes Virus* Pada Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) di Balai Karantina Ikan Soekarno – Hatta” dapat terselesaikan dengan baik. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Sarjana (S1) di Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.

Penghargaan yang setinggi-tingginya penulis sampaikan kepada orang tua, Ayahanda Drs. Suhari dan Ibunda Sri Suwarni, yang selalu bersikap penuh perhatian serta memberikan doa restunya.

Penghargaan dan rasa terima kasih tak terhingga penulis sampaikan kepada Drs. Widodo selaku direktur Balai Karantina Ikan Soekarno-Hatta, Ir. Rini Widayati selaku dosen pembimbing kedua, Staf Lab. Balai Karantina Ikan Soekarno-Hatta atas segala fasilitas yang diberikan khususnya mbak Ani, mbak Ami, mbak Zakiya, mbak Kristin, mas Syahrul, mas Adam, mas Warsidi dan pak Kardiman.

Demikian juga kepada Dr.Drh. I Wayan Teguh Wibawan, MS selaku Wakil Dekan, Drh. Pien Supatmirah Wibowomoekti, MSi selaku dosen pembimbing, Dr. Drh Ligaya Ita Tumbelaka, MSc selaku dosen pembimbing akademik, Drh. Sri Murtini, MSi atas kesempatan yang diberikan kepada penulis.

Tidak lupa penulis mengucapkan terima kasih kepada Oni Mahanani Destarlina dan Monica Anggunadi selaku teman sepenelitian, Mas Setyo Sri Mardiko, SE, Mas Budi Santoso, SM, Mas Unggul Haryo Waskito, Skom yang telah memberikan dorongan, doa, dan semangat dalam menyelesaikan skripsi ini, Haris Setiadi (Djurex) yang setia menemani dalam suka dan duka serta telah membantu hingga penelitian ini akhirnya selesai, Kurnia Oktavia Khaerani atas dukungannya dan karena menjadi orang yang paling kusayangi.

Penulis menyampaikan juga ucapan terima kasih kepada Rekan-rekan Rumah Gubuk Tajir (Hendro Susilo dan Apris Beniawan), Jaka, Mia, Retty, Arik, Roy, Angie, Yramantha, Elok, Bujel, Cocool, Dedeh, Tika, Yoga, Kamto,

Mercky, Ina, Irma, Ayu, Rekan-rekan asrama Sengked (Ate, Nandar dan Johan) atas dukungan dan doanya selama ini.

Terakhir, ucapan terima kasih penulis tunjukkan kepada Teman-teman Appidae 37 dan semua pihak yang telah membantu skripsi ini semoga Allah SWT membalas atas semua kebaikan dengan sesuatu yang lebih baik. Amien

Harapan penulis, semoga penelitian dan skripsi ini dapat bermanfaat bagi yang memerlukan, demi perkembangan dan kemajuan ilmu pengetahuan. Penulis menerima kritik dan saran yang membangun, demi perbaikan dan kesempurnaan penulisan skripsi ini.

Bogor, Juli 2004

Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
PENDAHULUAN.....	1
1. Latar Belakang	1
2. Tujuan	3
3. Manfaat	3
TINJAUAN PUSTAKA.....	4
1. Perkarantinaaan	4
2. Balai Karantina Ikan di Indonesia	4
3. Tugas Pokok dan Fungsi	5
4. Ikan Koi	5
4.1. Asal Usul	5
4.2. Klasifikasi Ikan Koi	7
5. <i>Koi Herpes Virus</i> (KHV)	9
5.1. Sejarah dan Kronologis Kejadian	9
5.2. Sifat dan Morfologi Virus	9
5.3. Gejala Klinis	11
5.4. Pengobatan	11
6. Diagnosa KHV	11
MATERI DAN METODE	15
1. Tempat dan Waktu	15
2. Alat dan Bahan	15

3. Metode Kerja	15
3.1. Teknik Pengambilan Sampel	15
3.1.1. Bahan fiksasi	16
3.1.2. Peralatan pengambilan sampel.....	16
3.1.3. Cara pengambilan sampel	16
3.2. Teknik Pengiriman Sampel	16
3.3. Ekstraksi DNA menggunakan “ <i>WIZARD GENOMIC</i> ”	16
3.4. Amplifikasi Virus DNA	18
3.5. Elektroforesis	18
3.6. <i>Staining</i> dan Observasi Gel	19
4. Data	20
HASIL DAN PEMBAHASAN	22
KESIMPULAN DAN SARAN	29
1. Kesimpulan	29
2. Saran.....	29
DAFTAR PUSTAKA	30

DAFTAR TABEL

Tabel

1.	Klasifikasi ikan koi berdasarkan warna tubuhnya	7
2.	Seting suhu dan siklus KHV pada <i>thermocycler</i>	12
3.	Formula standar PCR untuk mendeteksi KHV	12
4.	Komposisi reagen untuk setiap sampel.....	13
5.	Data hasil pemeriksaan PCR Herpes virus pada ikan koi ekspor bulan Januari sampai dengan Mei 2003	20
6.	Data hasil pemeriksaan PCR Herpes virus pada ikan koi impor bulan Januari sampai dengan Mei 2003	21
7.	Hasil pemeriksaan PCR Herpes virus pada ikan koi ekspor bulan Juni sampai dengan Juli 2003	22
8.	Hasil pemeriksaan PCR Herpes virus pada ikan koi impor bulan Juni sampai dengan Juli 2003	23
9.	Data pemantauan PCR Herpes virus pada ikan koi di Lubuk Linggau bulan Februari dan Juni 2003	23
10.	Jenis Primer, sekuen dan ampikon	25

DAFTAR GAMBAR

Gambar

1.	Ikan koi <i>Ghosiki</i>	8
2.	Alat amplifikasi DNA	18
3.	Alat elektroforesis	19
4.	<i>UV trans-illuminator</i>	20
5.	Hasil uji PCR negatif KHV pada ikan koi	27
6.	Hasil uji PCR positif KHV pada ikan koi	28

PENDAHULUAN

1. Latar belakang

Ikan koi merupakan salah satu ikan hias yang banyak diminati orang di seluruh dunia, termasuk di Indonesia. Ikan ini mempunyai habitat di air tawar sehingga biasanya dipelihara di kolam di halaman rumah. Harganya yang relatif mahal dan sistem pemeliharaannya yang cukup rumit memang terkesan membatasi penggemar ikan ini hanya untuk golongan ekonomi menengah ke atas, namun hal itu justru menjadi suatu daya tarik tersendiri bagi para penggemar koi karena dengan memandangi taman sambil bersantai di kolam ikan sambil mendengarkan air bergerak dan melihat keindahan ikan koi di halaman rumah merupakan impian bagi setiap pemilik ikan koi. Ikan koi digemari karena memiliki warna yang indah dan corak yang khas pada bagian-bagian tubuhnya.

Budidaya ikan koi di Jepang sudah menjadi sebuah gengsi sehingga tidak mengherankan jika bisnis ikan koi di negeri sakura ini setiap tahunnya mencapai nilai 300 milyar yen salah satu alasannya karena ikan koi sudah menjadi simbol status sehingga menjadi hewan yang patut dikoleksi. Budidaya ikan koi di Indonesia dilihat dari sisi peluang memiliki kesempatan yang sangat besar untuk menyaingi Jepang karena budidaya ikan koi di Jepang terhambat beberapa persoalan seperti terbatasnya lahan, mahalnya upah tenaga kerja, dan pengaruh empat musim, tetapi pada kenyataannya budidaya ikan koi di Indonesia masih terbatas hal ini disebabkan karena ketidak tahuan dan ketidak mampuan memanfaatkan peluang yang ada dan juga karena alasan yang klasik yaitu dalam membudidayakan ikan koi terutama dalam skala besar membutuhkan lahan dan dana yang tidak sedikit (Tiana dan Murhananto 2002).

Sebagaimana makhluk hidup pada umumnya, ikan koi pun tidak luput dari serangan penyakit yang bisa disebabkan oleh bakteri, fungi, parasit dan virus. Salah satu penyakit pada ikan koi yang banyak terjadi sekarang ini adalah penyakit koi herpes. Penyakit ini merupakan penyakit infeksius yang disebabkan oleh virus herpes koi, penyakitnya sangat ganas dan dapat menyebabkan kematian masal (80 – 95%) dalam kurun waktu satu minggu karena virus tersebut mempunyai masa inkubasi antara 5 –7 hari (Davenport 2001). Di Indonesia

penyakit KHV pertama kali terjadi pada ikan koi di Blitar, Jawa timur pada bulan Maret 2002. Penyakit KHV mudah dan cepat menular pada ikan mas dan ikan koi tetapi tidak menular kepada manusia (Rukyani dan Agus 2003).

Deteksi infeksi KHV di BKISH dapat diketahui dengan melakukan uji PCR, uji patologi mikrokopis (histopatologi), patologi makrokopis (patologi anatomi), dan dengan melihat gejala klinisnya. Di Indonesia sampai saat ini wabah KHV telah menyebar ke Bali (Denpasar dan Badung); Jawa Timur (Banyuwangi, Tulungagung, Blitar, Malang, Kediri, Surabaya); Jawa Tengah (Semarang dan Brebes); Jawa Barat (Subang, Bogor, Bandung, Purwakarta, Cianjur, Bekasi); Banten; Sumatera (Lampung, Bengkulu dan Sumatera Selatan) (Rukyani dan Sunarto 2003). Usaha bersama sedang dilakukan untuk mengantisipasi masalah penyakit tersebut ke depan dengan memperbaiki sistem impor, ekspor, pengiriman antar daerah ikan hidup ke dan dari Indonesia. Setiap impor ikan dan produk perikanan diwajibkan melalui prosedur IRA (Import Risk Analysis) dan karantina, termasuk di dalamnya sertifikat yang menyatakan status kesehatan ikan. Sesuai dengan Keputusan Menteri no. 28 tahun 2003 yang melarang pengiriman ikan mas dan ikan Koi keluar pulau Jawa serta penghentian impor ikan mas dan ikan koi dari luar, dan juga Keputusan Menteri no. 40 tahun 2003 yang menyatakan bahwa pulau Jawa dan Bali merupakan daerah terjangkit dan semua aktifitas pengiriman ikan mas dan ikan koi dari kedua pulau tersebut harus melalui prosedur pemeriksaan oleh karantina. Impor ikan koi hanya diperbolehkan bila berasal dari negara bebas KHV dan dilengkapi sertifikat status kesehatan ikan (Rukyani dan Sunarto 2003).

Dalam tingkat mikro, pencegahan dapat dilakukan dengan cara menutup kolam yang terserang agar tidak menular ke kolam lain, memanen ikan yang sakit / mati dan memusnahkannya dengan cara membakar atau mengubur dalam tanah, tidak membuang ke perairan umum seperti sungai, danau, saluran irigasi, dan saluran air lainnya karena ikan yang sakit merupakan sumber penularan virus KHV. Usaha lainnya adalah tidak menggunakan bibit atau induk dari lokasi wabah dan melakukan desinfeksi kolam / peralatan kolam yang terkontaminasi dengan benzalkonium klorida 200 ppm selama 1 jam (Yosha 2003) pula pentingnya mendeteksi penyakit tersebut secara dini.

2. Tujuan

Penelitian ini bertujuan mendeteksi kemungkinan adanya penyakit *Koi Herpes Virus* dengan pemeriksaan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada ikan koi (*Cyprinus carpio*) di jalur lalu lintas impor, ekspor, maupun antar daerah di Indonesia.

3. Manfaat

Penelitian ini bermanfaat agar dapat mendeteksi *Koi Herpes Virus* lebih awal pada ikan koi (*Cyprinus carpio*) dengan menggunakan metode PCR dan pengambilan kebijakan instansi berwenang.

TINJAUAN PUSTAKA

1. Perkarantinaaan

Tanah air Indonesia dikaruniai Tuhan Yang Maha Esa berbagai jenis sumberdaya alam hayati berupa aneka ragam jenis hewan, ikan, dan tumbuhan yang perlu dijaga dan dilindungi kelestariannya karena sumberdaya alam hayati tersebut merupakan salah satu modal dasar dan sekaligus sebagai faktor dominan yang perlu diperhatikan dalam pembangunan nasional untuk mewujudkan masyarakat adil dan makmur berdasarkan Pancasila dan Undang-Undang Dasar 1945. Tanah air Indonesia atau sebagian pulau-pulau di Indonesia masih bebas dari berbagai hama dan penyakit hewan, hama dan penyakit ikan, serta organisme pengganggu tumbuhan yang memiliki potensi untuk merusak kelestarian sumberdaya alam hayati. Peningkatan lalu lintas hewan, ikan, dan tumbuhan antar negara dan dari suatu area ke area lain di dalam wilayah negara Republik Indonesia, baik dalam rangka perdagangan, pertukaran, maupun penyebarannya, semakin membuka peluang bagi kemungkinan masuk dan menyebarnya hama dan penyakit hewan, hama dan penyakit ikan, serta organisme pengganggu tumbuhan yang berbahaya atau menular yang dapat merusak sumberdaya hayati. Untuk mencegah masuknya hama dan penyakit hewan, hama dan penyakit ikan, serta organisme pengganggu tumbuhan ke wilayah negara Republik Indonesia, mencegah tersebarnya dari suatu area ke area lain, dan mencegah keluarnya dari wilayah negara Republik Indonesia, diperlukan karantina hewan, ikan, dan tumbuhan dalam satu sistem yang maju dan tangguh. Sehubungan dengan hal-hal tersebut, perlu ditetapkan peraturan perundang-undangan yang menyangkut perkarantinaaan hewan, ikan, dan tumbuhan dalam suatu Undang-undang (Presiden RI 1992a).

2. Balai Karantina Ikan di Indonesia

Menurut surat keputusan Menteri Pertanian nomor : 169/Kpts/LB.730/1990 yang merevisi surat keputusan Menteri Pertanian nomor : 819/Kpts/UM/II/1980 tentang pemasukan ikan kedalam wilayah Republik Indonesia. Pelabuhan udara Jakarta telah ditetapkan sebagai satu-satunya tempat

pemasukan ikan hidup kedalam wilayah Republik Indonesia kemudian dibuat surat keputusan Menteri Pertanian nomor 169/Kpts/LB.730/1990 yang memutuskan tentang tempat pemasukan (impor) ikan hidup kewilayah Republik Indonesia, sedangkan surat keputusan Menteri Pertanian nomor 245/Kpts/LB.730/4/1990 tanggal 11 april 1990 memutuskan tentang tempat-tempat untuk memperoleh pelayanan sertifikat kesehatan ikan untuk pengeluaran (ekspor) ikan hidup dari wilayah Republik Indonesia.

3. Tugas Pokok dan Fungsi

Karantina hewan, ikan, dan tumbuhan mempunyai tugas pokok dan fungsi yaitu mencegah masuknya hama dan penyakit hewan karantina, hama dan penyakit ikan karantina, dan organisme pengganggu tumbuhan karantina dari luar negeri kedalam wilayah negara Republik Indonesia, mencegah tersebarnya hama dan penyakit hewan karantina, hama dan penyakit ikan karantina, dan organisme pengganggu tumbuhan karantina dari suatu area ke area lain didalam wilayah negara Republik Indonesia dan juga mencegah keluarnya hama dan penyakit hewan karantina, hama dan penyakit ikan dan organisme pengganggu tumbuhan tertentu dari wilayah Negara Republik Indonesia (Presiden RI 1992b).

4. Ikan Koi

4.1. Asal usul

Menurut legenda Cina nama ikan koi muncul pertama kali sekitar 2.500 tahun lalu (551-479 SM) pada saat tersebut Raja Shoko mengirimkan ikan karper yang bersisik indah sebagai hadiah ulang tahun putra ahli filsafat Cina, yaitu Confusius (Tiana dan Murhananto 2002). Koi pertama kali masuk ke Jepang sekitar 200 tahun lalu yang akhirnya sekarang menjadi ikan nasional negara Jepang. Peternakan ikan koi menghasilkan koi satu warna selain warna hitam, koi-koi yang dihasilkan itu koi merah, putih dan kuning muda sekitar tahun 1804-1830 didesa di pegunungan Niigata. Keberhasilan para peternak ikan di Niigata itu ditiru oleh penduduk desa-desa lain disekitarnya, seperti Desa Takegawa, Desa Higayashima, Desa Ota, Desa Taneuhara, dan Desa Kamaghasima di Niigata bagian tengah, desa-desa itulah yang kemudian menjadi sentra pengembangan koi.

Kawin silang pada tahun 1830-1850 telah berhasil dilakukan antara koi warna merah dan koi warna putih yang menghasilkan koi warna merah putih yang disebut *kohaku* (Tiana dan Murhananto 2002).

Ikan koi telah dapat dihasilkan jenis *asagi* (biru abu-abu, bercampur merah) dan jenis *ki utsuri* (koi hitam dengan pola kuning) pada tahun 1875. Jenis Ikan koi tiga warna dihasilkan pada tahun 1912-1926 dengan jenis *taisso sanke* (koi putih dengan pola merah dan hitam), *showa sanshoku* (koi hitam dengan pola warna merah dan putih), *ogon* (metalik), dan *ginrin* (keperakan). Terakhir lahir koi dengan lima warna yang disebut *goshiki* yang berwarna dasar biru dengan bercak-bercak merah, hitam, biru tua, dan putih. Komunitas koi Jepang pada tahun 1904 dikejutkan oleh munculnya koi tak bersisik yang berasal dari Jerman, masyarakat Jepang menyebutnya *kagami goi*. Koi tak bersisik ini merupakan hasil kawin silang antara karper Jepang dan karper Jerman. Jika *kagami goi* ini disilangkan kembali akan menghasilkan koi yang separuh tubuhnya bersisik dan separuh lagi tidak bersisik, koi ini diberi nama *doitsu nishiki goi* (Tiana 2001).

Koi pertama kali diekspor ke San Fransisko, AS pada tahun 1938, setelah itu berturut-turut dikirim ke Hawaii (1947), Kanada (1949), dan Brasil (1953). Pemeliharaan koi diluar Jepang meningkat drastis selama tahun 1980-an, mulai dekade ini koi sudah mendunia dan menjadi komoditas industri sementara itu koi dari Jepang pertama kali masuk ke Indonesia diperkirakan tahun 1981-1982, dibawa oleh Hani Moniaga kemudian mengembangkan peternakan koi di Cipanas yang diberi nama Leon dan Leony. Koi pertama itu panjangnya sekitar 90-100 cm, berumur 50-75 tahun. Sejak saat itu, sepertinya koi mulai populer di Indonesia (Sukrianto 2000) dengan penyebaran ikan koi di Indonesia saat ini meliputi daerah Bali; Jawa Timur; Jawa Tengah; Jawa Barat; Banten; dan Sumatera.

4.2. Klasifikasi ikan koi

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

filum	: Vertebrata
kelas	: Pisces
subkelas	: Teleostei
ordo	: Ostariophysi
subordo	: Cyprinoidea
famili	: Cyprinidae
genus	: <i>Cyprinus</i>
species	: <i>Cyprinus carpio</i>

Adapun klasifikasi ikan koi berdasarkan warna tubuhnya disajikan dalam tabel 1.

Tabel 1. Klasifikasi ikan koi berdasar warna tubuhnya (Twigg 2000).

Pola warna tubuh	Nama ikan (Jepang)	Variasi warna tubuh
Dengan 1 warna	Shiromuji	Putih
	Benigo, Higo, Akagoi	Merah
	Kigo	Kuning
	Karasugoi, Sumigo	Hitam
	Kingo	Keemasan
	Gingo	Putih keperakan
	Kohaku	Putih, belang merah
Dengan 2 warna	Tancho	Tubuh putih, dengan warna merah di kepala
	Bekko (Shiro-bekko, Aka-bekko, Ki-bekko)	Putih, merah, atau kuning dengan belang hitam
	Utsurimono (Shiro-utsuri, Ki-utsuri, Hi-utsuri)	Hitam, dengan belang putih, kuning, atau merah
	Asagi	Biru, belang merah
	Taisho-sanke	Tubuh putih, dengan belang merah dan hitam
Dengan 3 warna	Showa-sanshoku	Tubuh hitam, dengan belang merah dan putih
	Goshiki	Lima warna

Salah satu contoh ikan koi yang mempunyai lebih dari 3 warna berdasarkan warna tubuhnya disajikan dalam gambar 1.



Gambar 1. Ikan koi *Ghosiki* (Tiana dan Murhananto 2002)

Menurut Hardjamulia (1978), ikan koi memiliki ciri-ciri yang mudah dilihat yaitu badan memanjang, sedikit memipih ke samping, mulut terletak di ujung tengah, sudut ada dua pasang, sirip dorsal panjang dengan bagian belakang jari-jari keras, letak permukaan sirip punggung berseberangan dengan sirip perut, sirip anal yang terakhir bergerigi. Ikan koi jantan dan betina dapat dibedakan dengan mudah jika sifat kelamin sekunder sudah terlihat jelas, untuk membedakan jenis kelaminnya dapat dilihat pada alat kelamin luar. Ikan koi jantan, lubang genital terletak dibelakang genital papila dan tidak menonjol letaknya, ujung papila tersebut hanya berlubang sebuah yang merupakan lubang kencing dan sekaligus lubang pengeluaran sperma. Ikan koi betina lubang genital terletak di depan genital papila yang terlihat menonjol, lubang kencing dan lubang pengeluaran telur terletak di ujung papila. Induk ikan koi jantan mempunyai sirip dada relatif pendek, lunak, jari-jari luar tipis, lapisan sirip dalam dada licin. Tubuh ikan koi betina lebih tebal / gemuk dibandingkan dengan yang jantan pada umur yang sama. Induk ikan koi betina memiliki sirip dada relatif lebih panjang, jari-jari luar tebal, lapisan dalam sirip dada kasar. Tubuh induk ikan koi jantan pada bagian perutnya tidak lunak, perut ini jika dipijat akan mengeluarkan cairan seperti air, sedangkan pada ikan betina tidak mengeluarkan cairan.

Ikan koi dapat hidup pada suhu antara 0 – 35° C, tetapi pada suhu yang ekstrem misalnya 0° C ikan koi akan berhenti makan dan sistem kekebalan tubuhnya hilang, hal tersebut dapat menyebabkan ikan koi sangat mudah dihindangi penyakit. Suhu optimum untuk pemeliharaan ikan koi berkisar antara 15 – 25 °C, suhu yang cukup rendah ini diperlukan untuk menghasilkan warna tubuh koi yang baik sedangkan pH ideal yang dibutuhkan koi agar tumbuh sehat berkisar antara 6,5 - 8,5 (Tiana dan Murhananto 2002).

5. *Koi Herpes Virus (KHV)*

5.1. Sejarah dan kronologis kejadian

KHV merupakan penyakit pada ikan yang disebabkan oleh DNA virus. Penyakit ini pertama kali dilaporkan pada tahun 1998 di Israel dan USA menyerang ikan jenis "*common carp*" dan ikan koi yang menyebabkan kematian masal. Kerugian ekonomi yang dialami akibat kematian ikan yang disebabkan oleh penyakit ini di Israel mencapai empat juta dolar Amerika (Tinman dan Bejerano 2003).

Di Indonesia penyakit KHV pertama kali terjadi pada ikan koi di Blitar, Jawa Timur pada bulan Maret 2002 kemudian ikan koi yang berasal dari China ini masuk ke Surabaya melalui Hongkong pada bulan Desember 2002 dan Januari 2003 setelah dari Surabaya, ikan ini selanjutnya dibawa ke Blitar dan mulailah terjadi kematian masal (80-95%). Penyakit ini sangat cepat menular ke ikan koi yang lain sehingga dalam kurun waktu satu bulan telah menyebabkan kematian pada ikan Koi peliharaan lebih dari 5000 ekor. Wabah KHV di Indonesia sampai saat ini telah menyebar sampai ke Bali (Denpasar dan Badung); Jawa Timur (Banyuwangi, Tulungagung, Blitar, Malang, Kediri, Surabaya); Jawa Tengah (Semarang dan Brebes); Jawa Barat (Subang, Bogor, Bandung, Purwakarta, Cianjur, Bekasi); Banten; Sumatera (Lampung, Bengkulu dan Sumatera Selatan) (Rukyani dan Sunarto 2003).

5.2. Sifat dan Morfologi Virus

Menurut Hariyadi (1994) virus adalah agen / organisme yang amat kecil, bersifat infeksi dan hanya dapat berkembang biak pada jaringan hidup. Partikel

virus tunggal dan tidak memiliki perlengkapan metabolisme untuk hidup dan bereproduksi, virion bergantung pada sintesa struktur dari sel inang untuk bereplikasi (Post 1983). Virus tidak dapat diobati ataupun disembuhkan oleh antibiotik, sampai saat ini belum ada pengobatan efektif terhadap virus, walaupun beberapa penyakit viral dapat dicegah dengan vaksinasi, misalnya : vaksin Rabies, Polio, Hepatitis dan sebagainya (Yosha 2003).

Herpes virus merupakan virus yang mempunyai kemampuan masuk kedalam tempat-tempat tubuh yang sulit dilalui dan bahkan virus tersebut dapat menjadi tidak terdeteksi karena virus tersebut berada dalam badan sel syaraf sehingga mekanisme pertahanan tubuh tidak dapat merespon sebagai ancaman. Ikan dapat terinfeksi virus herpes biasanya melalui kontak dengan mukosa kulit dan sekresi, apabila ikan yang telah terinfeksi virus herpes dan kemudian dapat hidup maka ikan tersebut menjadi *carrier* (pembawa), jika kondisi ikan tersebut stres atau mengalami penurunan kondisi tubuh misalnya pada saat transportasi, akibat parasit ataupun karena kualitas air yang jelek maka virus ini dapat timbul kembali dan dapat menyebarkan infeksi virus herpes tersebut ke ikan yang lain (Davenport 2001).

KHV adalah salah satu penyakit infeksius yang hanya menyerang spesies *Cyprinus carpio* yaitu ikan mas dan ikan koi tetapi virus ini berbeda dengan virus herpes yang terlebih dulu ditemukan pada ikan mas yaitu *cyprinid herpesvirus* (CHV). Secara morfologi KHV termasuk dalam golongan herpesvirus yaitu virus yang berbentuk hexagonal dengan diameter 110 nanometer karena termasuk virus herpes maka virus ini dapat sebagai *carrier* yang timbul kembali disaat kondisi ikan stres. Studi komparatif menunjukkan bahwa KHV dari Indonesia mempunyai persamaan sekuen DNA dengan KHV dari Amerika Serikat (Rukyani dan Sunarto 2003). Virus ini hidup dan berkembang biak pada suhu antara 18-30⁰C oleh karena itu serangan penyakit KHV akan mereda bila ikan dipelihara di luar rentan suhu tersebut. Kematian terjadi sangat cepat karena virus ini mempunyai masa inkubasi antara 5-7 hari dengan tingkat kematian mencapai 80-95% dalam waktu satu minggu sejak gejala klinis pertama muncul (Davenport 2001).

5.3. Gejala Klinis

KHV menyerang sel-sel epitel terutama epitel kulit dan insang maka dari itu ikan koi yang terserang virus ini akan kehilangan nafsu makan, lemah, mengalami penurunan produksi mukosa pada kulit dan insang sehingga kulit tampak kering, hemoragi pada kulit dan sirip, nekrosa sel insang, dan mata tampak cekung. Ikan yang terserang penyakit ini juga akan mengalami perubahan tingkah laku antara lain berenang dekat ke permukaan air, berkumpul di tempat percikan air atau air mancur, gangguan pernafasan (megap-megap di permukaan air), hiperaktif secara tiba-tiba, inkoordinasi gerak dan kehilangan keseimbangan (Yosha 2003).

5.4. Pengobatan

Saat ini tidak terdapat obat untuk mengobati penyakit KHV tetapi pengobatan dengan chloramines T atau potassium permanganat dapat digunakan untuk mengobati penyakit sekunder yang diakibatkan oleh infeksi bakteri, fungi dan parasit pada insang, garam tidak beriodium untuk dehidrasi, vitamin C untuk meningkatkan sistim kekebalan, tetapi hal ini bukan berarti bahwa ikan tersebut sembuh dari penyakit KHV (Yosha 2003).

6. Diagnosa KHV

Salah satu diagnosa KHV yang dipakai adalah PCR. PCR adalah suatu teknik yang dipakai untuk melipatgandakan asam nukleat (DNA) *invitro* secara enzimatis (Rabinow 1998) sedangkan menurut Koesharyani *dkk.* (2002) teknik PCR ini merupakan teknik enzimatis secara *invitro* untuk memperbanyak *fragmen* DNA spesifik dengan memperpanjang primer secara simultan pada strand DNA komplementer dengan jumlah kopi DNA yang teramplifikasi sekitar 2 kali lebih banyak dari setiap siklus. Teknik ini pertama kali ditemukan oleh Kary Mulis diawal tahun 1980an (Rabinow 1998).

Amplifikasi dilakukan dalam *thermocycler* PTC-200 tanpa melalui tahap pre-denaturasi. Keseluruhan setting suhu dan siklus tercantum pada tabel 2.

Tabel 2. Setting suhu dan siklus KHV pada *thermocycler* (Sunarto *dkk.* 2003)

No	Reaksi	Suhu ($^{\circ}\text{C}$)	Lama	Jumlah siklus
1	<i>Denaturation</i>	94	1 menit	30
2	<i>Annealing</i>	56	2 menit	30
3	<i>Extension</i>	74	3 menit	30
4	<i>Final Elongation</i>	74	7 menit	1

Setiap siklus pada tabel 2 terdiri atas 3 tahap reaksi sebagai berikut :

1. *Denaturation* yaitu suatu proses pemecahan DNA target dari untai ganda (*double-stranded DNA*) menjadi untai tunggal (*single stranded DNA*) dilakukan dengan cara pemanasan pada suhu 94°C .
2. *Annealing* yaitu suatu proses penempelan primer kepada DNA untai tunggal. Pada suhu 56°C primer akan menempel pada pangkal dan ujung dari masing - masing DNA untai tunggal yang komplementer sehingga mengapit suatu daerah tertentu dari sekuen DNA target.
3. *Extension* yaitu suatu proses pemanjangan primer dengan bantuan enzim *taq polymerase* pada suhu 74°C . Pada akhir proses ini dengan suhu 74°C akan terbentuk 2 buah DNA untai tunggal baru yang komplemen terhadap sekuen DNA target (Koesharyani *dkk.* 2002).

Proses amplifikasi tersebut memerlukan formula khusus, berikut merupakan salah satu komposisi formula yang dapat digunakan untuk proses amplifikasi yang disajikan dalam tabel 3.

Tabel 3. Formula standar PCR untuk mendeteksi KHV (Sunarto *dkk.* 2003)

No	Reagen	Jumlah atau volume per reaksi
1.	Cetakan DNA	100-1000 mg
2.	Primer	0.25 μg
3.	dNTP	10 μM
4.	<i>Taq Polymerase</i>	1 unit
5.	Tris HCl ph 8.3	60 nM
6.	NH_2SO_2	15 mM
7.	MgCl_2	2 mM

Kemudian Sunarto *dkk.* (2003) berhasil melakukan modifikasi reaksi standar dengan menggunakan *master mix* atau *Ready To Go PCR bead* sehingga proses pengerjaan sampel menjadi lebih sederhana seperti pada tabel 4.

Tabel 4. Komposisi reagen untuk setiap sampel (Sunarto *dkk.* 2003)

No.	Reagen	Jumlah atau volume per reaksi
1.	<i>Master mix</i>	12.5 μ L
2.	<i>Primer Forward</i> 290	0.5 μ L
	<i>Primer Reverse</i> 290	0.5 μ L
3.	Cetakan DNA	2 μ L
4.	<i>Nucleus Free Water</i>	9.5 μ L

Sintesa DNA yang dihasilkan dalam satu siklus kemudian berperan sebagai cetakan atau *template* pada siklus berikutnya. Jumlah DNA target akan menjadi berlipat dua pada setiap akhir siklus, maka DNA target akan meningkat secara eksponensial sehingga setelah melalui 31 siklus akan terjadi milyaran (2^{31}) amplifikasi DNA target (Sunarto 1996). DNA virus yang telah berlipat ganda jumlahnya dapat dideteksi dengan elektroforesis menggunakan gel agarose kemudian hasil elektroforesis yang berupa *band* DNA dapat dilihat dengan menggunakan alat *uv trans-illuminator* setelah sebelumnya diwarnai dengan Ethidium Bromida (Koesharyani *dkk.* 2002).

Keunggulan PCR yaitu dapat mendeteksi penyakit sebelum gejala muncul, sehingga teknik ini dapat digunakan sebagai sistem peringatan dini (*early warning system*), teknik ini dapat diselesaikan dalam waktu cepat (6 jam) dan bisa juga digunakan untuk *screening* dan pendeteksian apakah suatu organisme tersebut bertindak sebagai pembawa (*carrier*) virus KHV karena teknik ini mempunyai spesifitas dan sensitivitas tinggi (Sunarto *dkk.* 2003)

Kelemahan PCR yaitu PCR tidak bisa dipakai untuk mendeteksi penyakit yang susunan basa primernya belum diketahui karena setiap jenis penyakit virus membutuhkan primer yang spesifik, alat dan bahan yang digunakan untuk mendiagnosa harganya mahal, ada kemungkinan terjadi kontaminasi selama

proses uji dan bisa juga diakibatkan oleh penggunaan atau pengaturan alat-alat yang tidak benar.

MATERI DAN METODE

1. Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan selama satu bulan dimulai pada bulan Juni 2003 - Juli 2003 di Balai Karantina Ikan Soekarno Hatta, Bandar Udara Soekarno Hatta Jakarta.

2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah *thermocycler*, unit elektroforesis, *uv trans-illuminator*, kamera polaroid, *autoclave*, alat bedah, *analytical balance*, sentrifuse, *vortex*, mikropipet ukuran 1-10 μL , mikropipet ukuran 1-20 μL , mikropipet ukuran 10-100 μL , mikro pipet ukuran 200-1000 μL , *deep freezer* - 20°C, *refrigerator*, *laminar flow*, pH meter, *timer*, erlenmeyer, botol sampel, mikrotube ukuran 0.2 ml, 0.5 ml, dan 1.5 ml, mikropipet tips 10 μL , mikropipet tips 100 μL , mikropipet tips 1000 μL , film, sarung tangan dan masker.

Bahan-bahan yang digunakan adalah alkohol 70%, DNA *ekstraktion kit* : *Wizard Genomic*, *Deoksinukleotide Triphosphat* (dNTP), *taq polymerase*, TAE buffer, primer *forward* dan *reverse*, *marker 100 base pair* (bp) *DNA ladder*, agarose, Ethidium Bromide, EDTA, *nucleus free water*, *staining solution*, *master mix*, dan etanol.

3. Metode Kerja

Metode yang digunakan adalah uji PCR, metode ini terdiri dari beberapa tahap dimulai dari:

3.1. Teknik Pengambilan Sampel

Jenis dan jumlah sampel serta cara pengambilan dan pengawetannya sangat penting dalam pemeriksaan PCR, karena sampel yang telah rusak atau yang jumlahnya tidak mencukupi akan menyulitkan dalam interpretasi hasil pemeriksaan. Sampel yang digunakan untuk uji PCR adalah insang sebanyak 10-20 mg yang diambil dalam keadaan hidup. Menurut Prayitno *dkk.* (2003) beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam pengambilan sampel ikan untuk keperluan diagnosis :

3.1.1. Bahan fiksasi

Fiksasi adalah proses pengawetan sampel dengan menggunakan bahan pengawet agar material yang kita ambil dapat diproses dengan teknik PCR. Ada 2 cara pengawetan yang umum digunakan yaitu :

- Fiksasi dalam larutan alkohol
- Pembekuan dalam suhu dibawah -20°C

3.1.2. Peralatan pengambilan sampel

Peralatan pengambilan sampel yang dimaksud adalah peralatan yang langsung digunakan dalam pengambilan sampel dimana peralatan yang digunakan sebelumnya didesinfeksi terlebih dahulu. Proses desinfeksi alat bedah dimulai dari

- Membersihkan peralatan dengan kertas tisu
- Membilas dengan akuades
- Mendesinfeksikannya dengan alkohol 70 %
- Memanaskannya dengan api bunsen.

3.1.3. Cara pengambilan sampel

Pengambilan sampel yang benar diusahakan memperhatikan jenis dan jumlah sampel yang dapat diambil dari benih, ikan dewasa atau induk. Sampel dari benih berupa tubuh secara utuh, sedangkan dari ikan dewasa dan induk dapat berupa insang.

3.2. Teknik Pengiriman Sampel

Sampel yang telah dikumpulkan dan diawetkan dengan alkohol 70% kemudian dikemas sebaik mungkin supaya tidak bocor selama pengiriman setelah itu dikirim ke laboratorium terdekat yang mampu melakukan diagnosis penyakit KHV dengan teknik PCR.

3.3. Ekstraksi DNA menggunakan "WIZARD GENOMIC"

Ekstraksi DNA untuk sampel ikan (KHV) menggunakan ekstraksi dengan jaringan lunak dengan tahap:

- Cairan 600 μl *nuclei lysis solution* dimasukkan ke dalam 1.5 ml mikrotube kemudian didinginkan di lemari es.
- Jaringan yang segar (dikeringkan terlebih dahulu dengan tisu) sebanyak 10-20 mg atau jaringan yang sudah dibekukan (dicacah dahulu) dimasukkan ke dalam cairan *nuclei lysis*, setelah itu kedua cairan tersebut dicampur dengan menggunakan alat pengocok kemudian cairan dipindahkan ke dalam mikrotube baru.
- Cairan tersebut diinkubasi pada suhu 65°C selama 15-30 menit, setelah itu 3 μl *r-nase solution* ditambahkan pada mikrotube yang berisi jaringan kemudian dibolak-balikan sebanyak 2-5 kali dan cairan tersebut diinkubasi selama 15-30 menit pada suhu 37°C .
- Cairan didinginkan pada suhu ruang selama 5 menit, kemudian ditambahkan 200 μl *protein precipitation solution* pada suhu ruang dan dicampur dengan menggunakan alat pengocok selama 20 detik, setelah itu didinginkan pada es selama 5 menit, lalu disentrifugasi selama 4 menit pada 13.000 - 16.000 g (14.000 rpm) kemudian akan terlihat endapan putih / pelet berupa protein terkumpul didasar mikrotube.
- Supernatan (mengandung DNA) dipindahkan pada mikrotube baru berukuran 1.5 ml yang mengandung 600 μl *isopropanol* pada suhu ruang dan dikocok secara perlahan sampai terlihat serabut-serabut seperti benang halus, kemudian disentrifugasi selama 1 menit pada 13.000 – 16.000 g (14.000 rpm) maka akan terlihat pelet DNA berwarna putih pada dasar mikrotube.
- Supernatan dibuang secara hati-hati kemudian dilakukan pencucian pelet DNA dengan ditambahkan 600 μl *ethanol* 70%, setelah itu cairan dibolak-balikkan selama beberapa kali.
- Cairan disentrifugasi selama 1 menit pada 13.000 – 16.000 g (14.000 rpm) pada suhu ruang, kemudian cairan dibuang secara perlahan-lahan (agar pelet DNA tidak ikut terbang).
- DNA dikeringkan dengan cara diangin-anginkan pada mikrotube yang mengandung pelet DNA pada kertas tisu bersih selama 10-15 menit.
- *DNA rehydration* 100 μl ditambahkan ke dalam mikrotube lalu diinkubasi pada suhu 65°C selama 1 jam atau diinkubasi semalam pada suhu ruang atau 4°C .

- Penyimpanan DNA dalam kulkas pada suhu 2-8°C (Koesaryani, 2002).

3.4. Amplifikasi Virus DNA

Amplifikasi atau perbanyakan DNA target dimaksudkan untuk meningkatkan jumlah DNA virus yang ada dengan menggunakan alat *thermocycler* (gambar 2) sehingga dapat dideteksi dengan elektroforesis. Tahap amplifikasi :

- Cairan 0.5 µl primer *forward* dan *reverse*, 12.5 µl *master mix*, 9.5 µl *nucleus free water*, dan 2 µl *template* DNA ditempatkan pada mikrotube 0.2 ml, kemudian semua cairan tersebut disentrifugasi selama beberapa detik pada 13.000 – 16.000 g (14.000 rpm).
- *Nucleus free water* 2 µl dalam mikrotube 0.2 ml digunakan untuk kontrol negatif
- Sampel yang positif KHV dalam mikrotube 0.2 ml digunakan untuk kontrol positif.



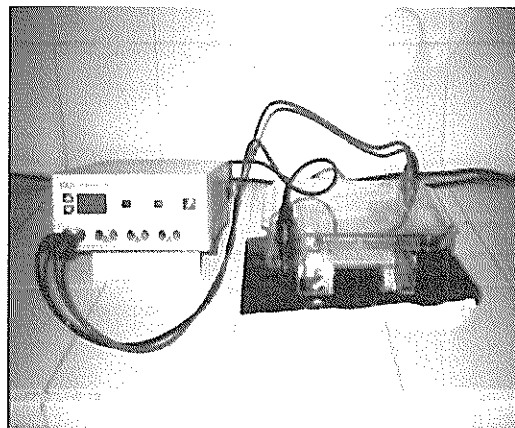
Gambar 2. Alat amplifikasi DNA (*Thermalcycler*)

3.5. Elektroforesis

Tahapan elektroforesis dengan menggunakan alat yang tertera dalam gambar 3 :

- Masing-masing sampel dipipet sebanyak 8 µl pada kertas parafilm.

- *Marker* sebanyak 5 μ l dipipet pada kertas parafilm
- *Staining solution* (6x loading) 2 μ l ditambahkan pada masing-masing sampel dan *marker*, lalu dicampur dengan baik.
- Masing-masing sampel dan *marker* dipipet ke dalam sumur agarose secara perlahan dan hati-hati.
- *Marker* diletakkan di sumur pertama dari gel agarosa diikuti sampel, kontrol positif dan negatif.
- Proses elektroforesis berlangsung dengan kekuatan listrik 100 V selama 50 menit.

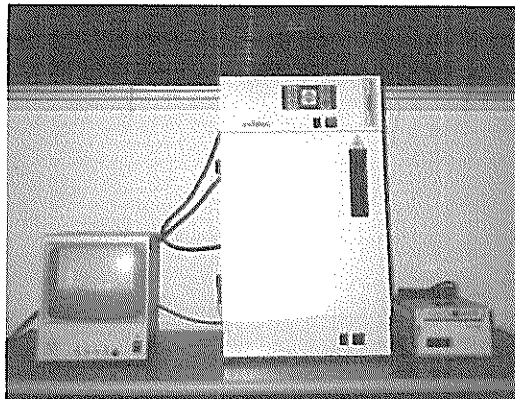


Gambar 3. Alat elektroforesis

3.6. *Staining* dan Observasi Gel

Tahapan *staining* dan obsevasi gel menggunakan alat *uv-trans illuminator* dalam gambar 4

- Proses ini dimulai dengan perendaman gel ke dalam buffer yang ditambahkan 0.05% Ethidium Bromida selama 15 menit.
- Gel tersebut diletakkan pada *uv trans-illuminator* nanti berat molekul DNA target akan terlihat dengan jelas dan berpendar berupa band.
- Berat molekul target dibandingkan dengan *marker* yang digunakan
- Didokumentasikan dengan kamera atau diprint pada kertas printer.



Gambar 4. *UV trans-illuminator*

3. Data

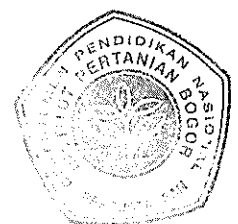
Penelitian ini dilakukan dengan mengambil data primer dari bulan Juni sampai Juli tahun 2003 dan data sekunder dari Balai Karantina Ikan Soekarno – Hatta dari bulan Januari sampai Mei tahun 2003 (tabel 5 dan 6).

Tabel 5. Data hasil pemeriksaan PCR Herpes virus pada ikan koi ekspor bulan Januari sampai dengan Mei 2003 (Anonim, 2003).

Bulan / No.	Organ Diperiksa	Keterangan	Asal / Tujuan	Hasil
Januari 2003				
1.	Insang	Ekspor	Belanda	(-)
April 2003				
1.	Insang	Ekspor	Jerman	(-)

Tabel 6. Data hasil pemeriksaan PCR Herpes virus pada ikan koi impor bulan januari sampai dengan Mei 2003 (Anonim, 2003).

Bulan / No.	Organ diperiksa	Keterangan	Asal / Tujuan	Hasil
Januari 2003				
1.	Insang	Impor	Jepang	(-)
2.	Insang	Impor	Jepang	(-)
Februari 2003				
1.	Insang	Impor	Malaysia	(-)
2.	Insang	Impor	Jepang	(-)
3.	Insang	Impor	Jepang	(-)
Maret 2003				
1.	Insang	Impor	Jepang	(-)
2.	Insang	Impor	Jepang	(-)
3.	Insang	Impor	Jepang	(-)
4.	Insang	Impor	Jepang	(-)
5.	Insang	Impor	Jepang	(-)
6.	Insang	Impor	Jepang	(-)
7.	Insang	Impor	Singapura	(-)
April 2003				
1.	Insang	Impor	Jepang	(-)
Mei 2003				
1.	Insang	Impor	Jepang	(-)
2.	Insang	Impor	Jepang	(-)
3.	Insang	Impor	Jepang	(-)
4.	Insang	Impor	Jepang	(-)
5.	Insang	Impor	Jepang	(-)
6.	Insang	Impor	Jepang	(-)
7.	Insang	Impor	Jepang	(-)
8.	Insang	Impor	Jepang	(-)
9.	Insang	Impor	Jepang	(-)
10.	Insang	Impor	Jepang	(-)



HASIL DAN PEMBAHASAN

Ikan koi yang diekspor ke negara Perancis, Jepang, dan Jerman dari bulan Juni sampai dengan Juli 2003 kemudian diperiksa dengan mengambil insangnya terhadap kemungkinan adanya Herpes virus dengan metode PCR menunjukkan hasil yang negatif (Tabel 7) sama dengan data laporan intersepsi BKISH pada ikan koi ekspor bulan Januari sampai dengan Mei 2003 (tabel 5).

Tabel 7. Hasil pemeriksaan PCR Herpes virus pada ikan koi ekspor bulan Juni sampai dengan Juli 2003.

Bulan / No.	Organ Diperiksa	Keterangan	Asal / Tujuan	Hasil
Juni 2003				
1.	Insang	Ekspor	Prancis	(-)
2.	Insang	Ekspor	Jepang	(-)
Juli 2003				
1.	Insang	Ekspor	Jerman	(-)

Pemeriksaan ikan koi yang dikeluarkan secara domestik ke daerah Balikpapan bulan Juni 2003 kemudian diperiksa dengan mengambil insangnya terhadap kemungkinan adanya Herpes virus dengan metode PCR menunjukkan hasil yang negatif sama dengan data intersepsi BKISH ke daerah Pontianak bulan Februari 2003.

Ikan koi yang di impor dari negara Jepang bulan Juni sampai dengan Juli 2003 kemudian diperiksa dengan mengambil insangnya terhadap kemungkinan adanya Herpes virus dengan metode PCR menunjukkan hasil yang negatif (Tabel 8) sama dengan data laporan intersepsi BKISH pada ikan koi impor bulan Januari sampai dengan Mei 2003 (tabel 6).

Tabel 8. Hasil pemeriksaan PCR Herpes virus pada ikan koi impor bulan Juni sampai dengan Juli 2003.

Bulan / No.	Organ diperiksa	Keterangan	Asal / Tujuan	Hasil
Juni 2003				
1.	Insang	Impor	Jepang	(-)
2.	Insang	Impor	Jepang	(-)
Juli 2003				
1.	Insang	Impor	Jepang	(-)
2.	Insang	Impor	Jepang	(-)

Hasil pemantauan ikan koi dari Lubuk Linggau bulan Juni 2003 kemudian diperiksa dengan mengambil insang terhadap kemungkinan adanya Herpes virus dengan metode PCR menunjukkan hasil yang positif sama dengan data laporan intersepsi BKISH pemantauan ikan koi dari daerah Lubuk Linggau bulan Februari 2003 (tabel 9).

Tabel 9. Data pemantauan PCR Herpes virus pada ikan koi di daerah Lubuk Linggau bulan Februari dan Juni 2003.

Bulan / No.	Organ diperiksa	Keterangan	Asal / Tujuan	Hasil
Februari 2003				
1.	Insang	Pemantauan	Lubuk Linggau	(+)
Juni 2003				
1.	Insang	Pemantauan	Lubuk Linggau	(+)

Proses PCR dimulai dengan proses ekstraksi DNA yang menggunakan organ insang sampel bisa dalam keadaan hidup, atau dapat juga disimpan dalam alkohol 70%. Ekstraksi DNA bertujuan untuk mendapatkan DNA virus. Penambahan *nuclei lysis solution* pada sampel bertujuan agar protein dan lipid sebagai penyusun membran sel lisis sehingga DNA yang berada di inti sel dapat keluar. Kerja *nuclei lysis* akan lebih optimal dalam melisiskan protein sampel maka perlu diinkubasikan pada suhu 65°C selama 15-30 menit. Penambahan *r-*

nase solution dengan cara membolak-balikkan sebanyak 2-5 kali, kemudian menginkubasikan cairan tersebut selama 15-30 menit pada suhu 37°C kemudian mendinginkan pada suhu ruang selama 5 menit diharapkan supaya sel-sel yang belum lisis akhirnya menjadi lisis. Penambahan *protein precipitation solution* pada sampel bertujuan agar terjadi presipitasi atau pengendapan dari protein yang dibantu oleh proses sentrifugasi maka akan terlihat endapan putih / pelet berupa protein yang terkumpul didasar mikrotube. Penambahan *isopropanol* dimaksudkan untuk mengikat supernatan yang mengandung DNA yang nantinya akan terlihat serabut-serabut seperti benang halus pada cairan tersebut, selanjutnya dilakukan pencucian pelet DNA yang menempel pada dasar mikrotube dengan menggunakan etanol 70%. Pencucian bertujuan untuk memurnikan DNA yang terikat, memastikan hilangnya protein dan kontaminan lainnya yang masih tertempel. *DNA rehydration* merupakan media pelarut yang akan melarutkan DNA dan memiliki konsentrasi garam rendah. Proses ini memerlukan inkubasi pada suhu 65°C selama 1 jam kemudian proses tersebut dilanjutkan dengan menginkubasikan semalaman pada suhu ruang. DNA yang diperoleh kemudian disimpan pada suhu 2-8°C bertujuan supaya DNA tersebut tidak rusak.

Setelah didapatkan stok DNA murni sebagai DNA target amplifikasi maka dilanjutkan dengan proses pengamplifikasian DNA dengan PCR menggunakan mesin PCR (*Thermalcycler*). Amplifikasi atau perbanyakkan DNA target dimaksudkan untuk meningkatkan jumlah DNA virus yang ada dimana proses tersebut dimulai dari untaian ganda DNA yang akan diputus menjadi untaian tunggal DNA yang akan digunakan sebagai tempat untuk sintesis DNA. Untaian DNA yang dimaksud adalah DNA target yang berada pada sampel yang telah diekstraksi. Amplifikasi DNA untuk mendeteksi KHV menggunakan salah satu primer spesifik yaitu klon DNA Sphl-5 dari Amerika. Oligonukleotida primer merupakan fragmen nukleotida yang komplementer dengan ujung-ujung fragmen DNA yang akan dilipat gandakan, terdiri dari primer *forward* dan *reverse* dengan sekuen seperti tertera pada tabel 9.

Tabel 9 Jenis primer, sekuen dan amplikon (Sunarto *dkk.* 2003)

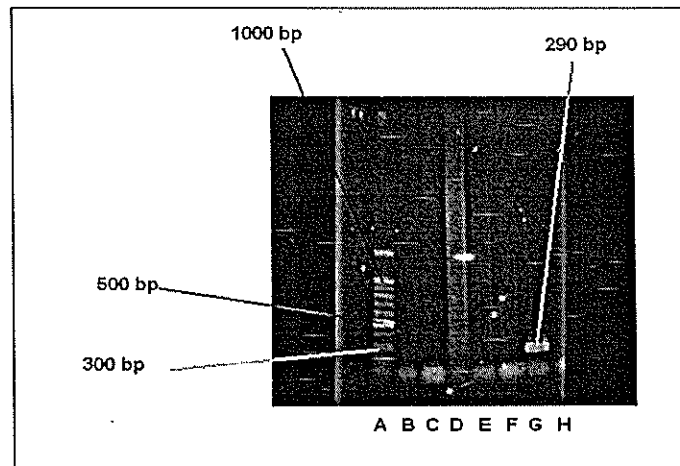
Asal	Sekuen primer	Amplikon
SphI-5, USA	F290 : 5'-GACACCACATCTGCAAGGAG-3' R290 : GACACATGTTACAATGGTGGC-3'	290 bp

Reaksi terdiri dari *denaturation*, *annealing*, *extension* dan *final elongation*. Proses denaturasi yang berlangsung pada suhu 94°C selama 1 menit menyebabkan pemecahan DNA target dari untai ganda (*double-stranded DNA*) menjadi untai tunggal (*single stranded DNA*) sehingga untuk memutuskannya memerlukan suhu yang cukup tinggi, kemudian diikuti dengan penurunan suhu sampai pada suhu 55°C sehingga proses *Annealing* atau perlekatan primer pada DNA untai tunggal dapat berlangsung karena suhu 55°C merupakan suhu yang tepat untuk memulai perlekatan primer yang akan menempel pada pangkal dan ujung dari masing-masing DNA untai tunggal. Hal tersebut akan mengurangi kemungkinan kesalahan penempelan primer dan kesalahan penempelan nukleotida pada ujung 3' dari primer. Primer akan melekat pada DNA target selanjutnya akan diteruskan dengan proses *extension* atau pemanjangan primer yang telah menempel pada *template* dengan bantuan enzim polymerase (*Taq polymerase*) yang tahan panas sampai 100 °C. Lamanya proses *extension* ditentukan oleh panjangnya DNA target yang akan dilipat gandakan dan suhu yang digunakan. *Taq polymerase* merupakan enzim yang dapat mensintesis rantai DNA yang baru dari DNA yang sudah ada. *Template* yaitu DNA target yang diekstraksi dari sampel ikan koi sakit dan berfungsi sebagai cetakan. Proses pemanjangan untai DNA ganda ini menggunakan dNTPs yang terdiri dari dATP, dCTP, dTTP, dGTP sebagai sumber nukleotida (Erlich 1989) dimana konsentrasi dari masing-masing nukleotida tersebut harus sama untuk mengurangi kesalahan dalam penyatuan masing-masing basa. *Final elongation* pada suhu 74°C selama 7 menit untuk memberi kesempatan kepada enzim polymerase yang belum menyelesaikan reaksinya, sehingga tidak ada sintesa DNA baru yang belum selesai. Hasil akhir proses amplifikasi akan membentuk 2 buah DNA untai tunggal baru yang komplemen terhadap sekuen DNA target.

Analisa hasil PCR menggunakan teknik elektroforesis gel agarosa berfungsi untuk memisahkan fragmen DNA hasil amplifikasi. Gel agarosa memiliki kapasitas pemisahan lebih rendah dalam berbagai konsentrasi dibanding dengan gel akrilamid tetapi memiliki spektrum pemisahan yang lebih besar. Gel agarosa yang digunakan di dalam proses elektroforesis dapat memisahkan molekul DNA yang memiliki ukuran 100-2000 base pair, sedangkan ukuran molekul DNA KHV yang dipisahkan sebesar 290 base pair. Proses elektroforesis berlangsung selama 50 menit dengan kekuatan listrik 100 V.

Marker adalah barisan pita (*band*) yang telah diketahui berat molekulnya, marker yang digunakan adalah *marker* dengan 100 bp *ladder* yang artinya tiap pita pada *marker* ini mempunyai interval 100 bp. *Marker* ini terdiri dari fragmen mulai dari 100 bp sampai 1000 bp dengan fragmen 500 bp tampak lebih terang dari pita lainnya. *Marker* diletakkan bersama-sama dengan sampel, biasanya *marker* diletakkan di sumur pertama dari gel agarosa kemudian diikuti sampel, kontrol positif dan negatif. Buffer TAE yang berada didalam tempat elektroforesis berfungsi sebagai elektrolit pembawa aliran listrik dan untuk mempertahankan pH di dalam tempat dan di dalam gel agarosa. Penambahan Ethidium Bromida dalam buffer pada proses staining berfungsi sebagai penanda DNA karena zat kimia ini dapat menyisip diantara nukleotida dan akan bercahaya jika disinari dengan sinar ultraviolet. Ethidium Bromida ini termasuk zat yang bersifat karsinogenik dan dapat menyebabkan mutasi karena adanya gugus benzena pada strukturnya. Bromophenol Blue yang terdapat didalam gel loading buffer berfungsi sebagai pewarna visual bagi produk PCR sehingga dapat diketahui proses elektroforesisnya. Berat molekul *band* DNA yang tampak berpendar dapat dihitung dengan cara membandingkannya dengan *marker* yang telah diketahui berat molekulnya, pada KHV sebesar 290 bp.

Hasil negatif didapat setelah melalui rangkaian proses PCR karena pita atau *band* sampel yang tingginya sejajar dengan kontrol negatif, hal tersebut karena tidak adanya DNA target yang teramplifikasi yang kemudian dipotret dengan *uv trans-illuminator* (gambar 5).

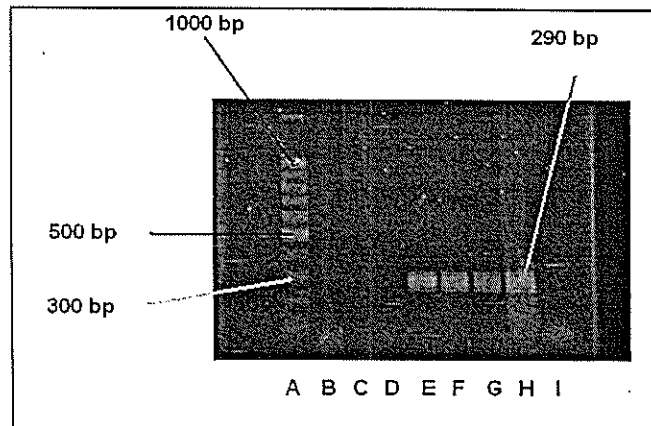


Gambar 5. Hasil uji PCR negatif KHV pada ikan koi

Keterangan hasil PCR:

- | | |
|-------------------------------|------------------------------|
| A : penanda (<i>marker</i>) | E : sampel keempat (negatif) |
| B : sampel pertama (negatif) | F : sampel kelima (negatif) |
| C : sampel kedua (negatif) | G : kontrol positif |
| D : sampel ketiga (negatif) | H : kontrol negatif |

Hasil positif didapat setelah melalui rangkaian proses PCR karena pita atau *band* yang tingginya sejajar dengan kontrol positif terlihat menunjukkan berat molekul 290 bp, hal tersebut karena adanya DNA target yang teramplifikasi yang kemudian dipotret dengan *uv trans-illuminator* (gambar 6).



Gambar 6. Hasil uji PCR positif KHV pada ikan koi

Keterangan hasil PCR:

- | | |
|-------------------------------|-----------------------------|
| A : penanda (<i>marker</i>) | F : sampel kelima (positif) |
| B : sampel pertama (negatif) | G : sampel keenam (positif) |
| C : sampel kedua (negatif) | H : kontrol positif |
| D : sampel ketiga (negatif) | I : kontrol negatif |
| E : sampel keempat (positif) | |

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Kesimpulan

Hasil penelitian dari bulan Juni sampai Juli 2003 dapat disimpulkan bahwa Pendeteksian KHV dengan PCR pada ikan koi dapat dilakukan secara cepat sehingga penyebaran penyakit dapat dihindari, tidak ada penyebaran penyakit KHV ekspor-impor melalui BKISH dengan pemeriksaan PCR, tidak ada penyebaran penyakit KHV dari Jakarta ke daerah, tetapi hasil pemantauan di Lubuk Linggau menunjukkan hasil positif sehingga daerah tersebut dapat menjadi sumber penyebaran penyakit KHV.

2. Saran

Uji PCR hendaknya dilakukan pada setiap pintu-pintu masuk wilayah seperti yang ditetapkan oleh surat keputusan Menteri Pertanian nomor 169/Kpts/LB.730/1990 yang memutuskan bahwa pemasukan (impor) ikan hidup ke wilayah Republik Indonesia dan surat keputusan Menteri Pertanian nomor 245/Kpts/LB.730/4/1990 tentang tempat-tempat untuk memperoleh pelayanan sertifikat kesehatan ikan untuk pengeluaran (ekspor) ikan hidup dari wilayah Republik Indonesia, juga lalu lintas domestik.

DAFTAR PUSTAKA

- [Anonim]. 2003. Laporan Tahunan Intersepsi Laboratorium Balai Karantina Ikan Soekarno-Hatta. Balai Karantina Ikan Soekarno-Hatta. Jakarta.
- Davenport K. 2001. Koi Herpes Virus (KHV). Ornamental Aquatic Trade Association. United Kingdom.
- Erlich HA. 1989. PCR Technology : Principles and Application for DNA Amplification. Second Edition United States and Canada : Stockton Press.
- Hardjamulia A. 1978. Budidaya Perikanan, Budidaya Ikan Mas, Ikan Nila, Ikan Mola, Ikan Jambal Siam. SPP-SUPM. Bogor.
- Hariyadi M. 1994. Identifikasi Patogen Penyebab Penyakit Ikan Oleh Virus. Makalah Latihan Peningkatan Keterampilan Teknis Petugas Karantina Ikan di IPB. Bogor.
- Koesharyani I. 2002. Penuntun Praktikum *Polymerase Chain Reaction* pada Pelatihan PCR. Departemen Kelautan dan Perikanan. Badan Riset Kelautan dan Perikanan Pusat Riset Perikanan Budidaya.
- , Roza D, Mahardika K, Johnny F, Zafran, Yuasa K. 2002. Manual for Fish Disease Diagnosis – II (Marine Fish and Crustacean in Indonesia). Gondol Research Institute for Mariaculture and Japan International Cooperation Agency.
- Menteri Pertanian. 1980. SK No :819/ Kpts/ UM/ II/ 1980 Tentang Pemasukan Ikan Kedalam Wilayah Republik Indonesia. Jakarta.
- , 1990. SK No : 169/ Kpts/ LB.730/ 1990 Tentang Pemasukan Ikan Kedalam Wilayah Republik Indonesia. Jakarta.
- , 1990. SK No : 245/ Kpts/ LB.730/ 1990 Tentang Pengeluaran Ikan Dari Wilayah Republik Indonesia. Jakarta.
- Post G. 1983. Textbook Of Fish Health. T.F.H. Publication, Inc. Ltd. USA.

- Prayitno SB, Kamiso HN, Akmad R, Fachrian HP, Mohammed M, Taukhid, Agus S, Hambali S, Arief T, Mohammed A, Djumbuh R, Maskur, Fatmah, Muljadi, Endang S. 2003. Penyakit Virus Insang Membusuk (KHV) Pada Budidaya Mas Dan Koi. Departemen Kelautan dan Perikanan. Jakarta.
- Presiden RI. 1992a. Undang-Undang Republik Indonesia. Nomor 16 Tentang Latar Belakang Dibentuknya Karantina Hewan, Ikan, dan Tumbuhan. Jakarta.
- . 1992b. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 16 Pasal 3 Tentang Tugas Pokok dan Fungsi Karantina Hewan, Ikan, dan Tumbuhan. Jakarta.
- Rabinow, P. 1998. What The Heck is PCR ? / !. <http://people.ku.edu/~jbrown/pcr.html>. Berkeley, California. [12 Juli 2004].
- Rukyani A dan Sunarto A. 2003. Makalah Seminar Penilaian Kualitas Ikan Koi : Mewaspada Bahaya Penyakit *Koi Herpes Virus* (KHV). Jakarta.
- Saanin H. 1984. Taksonomi dan Kunci Identifikasi Ikan. Binatjipta. Bogor.
- Sukrianto. 2000. Pembenihan Ikan Koi (*Cyprinus Carpio L.*) di Hanura Koi Centre Desa Bojongloa Kecamatan Buah Dua Kabupaten Sumedang. Laporan Magang Faperta UNPAD. Bandung.
- Sunarto. 1996. Diagnostik *Thalassemia* dengan *Polymerase Chain Reaction*. Laboratorium Ilmu Kesehatan Anak/ UPF Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- Sunarto A, Isti K dan Taukhid. 2002. Prosedur *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Untuk Diagnosa Cepat Penyakit *Koi Herpes Virus* (KHV) Pada Ikan Mas dan Koi. Laboratorium Riset Kesehatan Ikan. Jakarta.
- Tiana OA. 2001. Beternak Ikan Koi (*Cyprinus carpio L.*) Ala Hanura. Materi Pelatihan Hanura Koi Centre. Bandung.
- Tiana OA. dan Muharnanto. 2002. Budi Daya Koi. Agro Media Pustaka. Jakarta.

Tinman S dan Bejerano. 2003 . Field Observations Of A Herpes Viral Disease Of Koi Carp (*Cyprinus carpio*) In Israel. Central Fish Health Laboratory. 19150 Nir David. Israel.

Twigg D. 2000. How to Keep Koi An Essential Guide. IDG books Worldwide, Inc. New York.

Yosha S. 2003. Update On *Koi Herpes Virus* (KHV) for the Koi Hobbyist. KOI USA Magazine March / April 2003.