

## Efikasi vaksin KV3 (kovax) untuk pengendalian penyakit koi herpesvirus (KHV) pada ikan mas (*Cyprinus carpio*)

Taukhid<sup>1</sup>, Ayi Santika<sup>2</sup>, Ciptoroso<sup>2</sup>, Asep Suhendra<sup>2</sup>,  
Zakki Zainun<sup>2</sup>, Jaelani<sup>2</sup>, Dery D.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Balai Riset Perikanan Budi Daya Air Tawar (BRPBAT)  
Jln. Raya Sempur No. 1, Bogor

<sup>2</sup>Balai Besar Pengembangan Budi Daya Air Tawar (BBPBAT)

### Abstrak

Penelitian yang bertujuan untuk mengetahui efikasi vaksin KV3 untuk pengendalian penyakit Koi Herpesvirus (KHV) pada ikan mas (*Cyprinus carpio*) telah dilakukan pada skala laboratorium. Design penelitian ini adalah membandingkan kelompok ikan yang divaksin dengan kelompok yang tidak divaksin. Vaksinasi dilakukan melalui teknik perendaman selama 40 menit terhadap populasi ikan mas "specific pathogen free (SPF)" KHV. Selama 3 hari pasca vaksinasi, suhu air dipertahankan pada kisaran 23-24 °C. Tiga minggu pasca vaksinasi dilakukan uji tantang terhadap KHV melalui teknik pemaparan (*cohabitation*) selama 14 hari. Pengamatan dilakukan terhadap tingkah laku, gejala klinis, mortalitas kumulatif, survival rate, relative percent survival, indikator imunologis serta deteksi keberadaan KHV. Hasil pengujian vaksin KV3 memberikan rata-rata nilai kelangsungan hidup kelompok ikan yang divaksin sebesar 89,11% dibandingkan dengan kelompok ikan control yang hanya sebesar 5,33%; nilai *relative percent survival* (RPS) sebesar 88,50% dan nilai tersebut termasuk dalam kategori efektif. Secara umum vaksin KV3 termasuk dalam kategori jenis vaksin yang relatif aman terhadap komoditas target, karena tidak mengakibatkan kematian akut selama 24 jam pasca aplikasi.

Kata kunci: efikasi, ikan mas, koi herpesvirus (KHV), vaksin.

### Pendahuluan

Ikan mas (*Cyprinus carpio* Linn.) merupakan salah satu komoditas ikan pangan strategis, pemasok protein hewani bagi jutaan rakyat Indonesia, baik di pedesaan maupun di perkotaan. Kasus kematian masal ikan mas akibat infeksi Koi Herpesvirus (KHV) di beberapa sentra budi daya ikan sejak pertengahan tahun 2002, mengakibatkan produksi ikan mas nasional mengalami penurunan sekitar 40% selama kurun waktu 2002-2007. Secara kumulatif, kerugian ekonomi akibat penyakit tersebut hingga akhir 2007 diperkirakan mencapai lebih dari 250 milyar rupiah.

KHV merupakan penyakit viral pada ikan mas dan koi (*Cyprinus carpio*) yang sangat menular, menginfeksi semua umur/ukuran ikan dan sistem budi daya; mengakibatkan mortalitas antara 80-100% dari total populasi ikan, dengan masa inkubasi antara 1-7 hari (Hedrick *et al.* 2000; Sunarto *et al.* 2005; Pokorova, 2005). Infeksi KHV dipicu oleh penurunan suhu lingkungan sehingga disebut sebagai virus yang menyerang saat dingin (*a cold virus*). Individu yang bertahan hidup (*survivors*) pada saat terjadi wabah umumnya akan menjadi tahan (*resistant*) terhadap infeksi berikutnya. Namun ketahanan tersebut tidak menunjukkan adanya transfer kepada keturunannya (*maternal immunity*). Secara klinis dan/atau visual, infeksi KHV sering ditunjukkan dengan adanya nekrosis pada organ insang, eksese mukus, lepuh pada kulit, serta pergerakan renang yang tidak terarah (*nervous movement*) (Taukhid *et al.*, 2005; Gardenia *et al.*, 2005).

Hingga kini belum tersedia teknologi pengendalian KHV yang memiliki tingkat keberhasilan dan kesesuaian yang tinggi untuk berbagai sistem budi daya ikan mas dan koi. Secara medis, infeksi virus sangat sulit dikendalikan dengan menggunakan obat/bahan kimia; dan alternatif yang paling prospektif untuk pengendalian penyakit tersebut adalah melalui pendekatan ekologis dan biologis. Pendekatan ekologis antara lain dapat dilakukan dengan mengeksplorasi parameter lingkungan yang dapat memblokir kemampuan multiplikasi dan virulensi virus; sedangkan pendekatan biologis dapat dilakukan melalui

pembekalan dini kekebalan tubuh, baik kekebalan spesifik maupun non-spesifik; serta pemanfaatan materi biologis lainnya yang berpotensi menghambat dan merusak kemampuan multiplikasi dan virulensi virus.

Vaksinasi pada ikan telah terbukti memberi kontribusi yang sangat signifikan terhadap peningkatan produksi perikanan budi daya, terutama industri salmon dan trout di Eropa. Saat ini, sedikitnya ada 10 jenis vaksin telah dipasarkan secara umum dan diaplikasikan oleh pembudi daya ikan di Amerika, Eropa, dan Jepang. Keberhasilan program vaksinasi tersebut cukup menggembirakan, hal itu terlihat dari (1) menurunnya tingkat mortalitas ikan budi daya akibat infeksi patogen potensial, (2) menurunnya penggunaan antibiotik pada budi daya ikan, dan (3) menurunnya daya resistensi beberapa jenis patogen terhadap antibiotik.

Pemberian unsur imunostimulan (seperti *microencapsulated* vitamin C) pada pakan selama periode pemeliharaan dapat menekan tingkat kematian akibat infeksi KHV hingga mencapai 40% (sintasan 60%). Pembekalan kekebalan spesifik secara dini melalui program vaksinasi pada budi daya ikan mas dan koi diharapkan dapat menekan tingkat kematian kurang dari 10% (sintasan > 90%). Saat ini telah tersedia vaksin anti-KHV (KV3) dalam bentuk sediaan virus KHV yang telah dilemahkan, namun informasi tentang efektivitas jenis vaksin tersebut di wilayah Indonesia belum tersedia.

Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas pemberian vaksin KV3 (Kovax) pada populasi ikan mas sebagai upaya pengendalian terhadap penyakit KHV melalui pembekalan kekebalan tubuh pada skala laboratorium. Keberhasilan dan keamanan program vaksinasi diharapkan dapat menjadi salah satu alternatif pencegahan penyakit KHV pada ikan mas dan koi yang lebih realistis dan prospektif.

## **Bahan dan metode**

### *Wadah uji dan media pemeliharaan*

Wadah uji berupa akuarium berukuran 40x60x40 cm<sup>3</sup> dan diisi air sebanyak 70 liter. Seluruh wadah dan perlengkapan pemeliharaan ikan uji sebelum dan selama pelaksanaan pengujian disucikan dengan menggunakan larutan kalium permanganat (KMNO<sub>4</sub>) pada dosis 150 ppm selama 24 jam, sedangkan serok, selang air dan perlengkapan lain yang digunakan secara bersama selalu didesinfeksi dalam larutan Kalium Permanganat pada dosis 1.000 ppm.

Air yang digunakan berasal dari sumur, dan sebelum digunakan ditampung terlebih dahulu minimal selama 48 jam dalam bak *fibre glass* volume 2.000 liter. Setiap akuarium dilengkapi dengan aerasi yang diatur secara manual, sehingga diasumsikan masing-masing wadah memperoleh pasokan udara yang relatif sama. Pada masing-masing kelompok perlakuan dilengkapi minimal sebuah termometer maksimum-minimum yang diatur ulang setiap 24 jam. Suhu air pemeliharaan ikan uji selama kegiatan dipertahankan pada kisaran 20-24 °C. Pengaturan suhu air pada kisaran tersebut dilakukan dengan cara memasukkan es (terbungkus plastik) pada saat suhu air mulai pada posisi 23 °C, dan biasanya kondisi tersebut terjadi pada hari panas antara pukul 12.00-15.00. Penyiponan dan penggantian air baru untuk mempertahankan kualitas media pemeliharaan dilakukan setiap hari sebanyak 5-10% dari total volume air.

### *Ikan uji*

Populasi ikan mas negatif KHV yang digunakan pada pengujian ini berasal dari satu "batch" yang diperoleh dari pembudi daya ikan di Kecamatan Kadupandak, Cianjur dengan umur lebih dari dua bulan

dengan rataan bobot tubuh  $\pm 10$  gram/ekor. Kelompok ikan mas tersebut merupakan hasil pembenihan dari populasi induk ikan mas yang diyakini “belum” pernah terinfeksi KHV.

Konfirmasi status penyakit KHV pada populasi ikan uji, apakah negatif atau positif terinfeksi KHV, dilakukan melalui deteksi gen KHV sebelum dan setelah proses aklimatisasi dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menurut metode yang dikembangkan oleh Gray *et al.* (2002). Selain patogen target, terhadap populasi ikan uji dilakukan pula pemeriksaan secara mikrobiologis terhadap adanya infeksi golongan jasad patogen lainnya seperti parasit (Protozoa, Trematoda, Crustacea), bakteri, dan cendawan.

Proses aklimatisasi ikan uji sebelum diberi perlakuan dilakukan dalam unit karantina yang menerapkan prinsip “biosecurity” agar dapat menjamin bahwa populasi ikan uji benar-benar bebas dari infeksi patogen potensial, terutama terhadap keberadaan KHV. Proses aklimatisasi berlangsung selama 16 hari pada suhu air antara 20-24 °C. Pakan yang diberikan selama kegiatan pengujian adalah pakan komersial dengan kadar protein kasar sebesar 28%. Pemberian pakan dilakukan sebanyak tiga kali sehari pada pukul 08.00, 12.00 dan 16.00 secara *ad libitum*.

Populasi ikan mas positif KHV yang digunakan sebagai sumber infeksi pada proses uji tantang diperoleh dari pembudidaya ikan mas di wilayah Waduk Cirata (daerah endemis KHV) dengan gejala klinis sedang terinfeksi KHV. Kepastian bahwa populasi ikan sumber infeksi tersebut positif terinfeksi KHV didasarkan pada batasan “defini kasus KHV” yang dikembangkan oleh Taukhid *et al.* (2005), serta dikonfirmasi secara laboratoris melalui deteksi gen KHV dengan teknik PCR. Definisi kasus KHV setidaknya harus memenuhi tiga kriteria berikut:

1. Hanya terjadi pada ikan mas dan/atau koi (*Cyprinus carpio*)
2. Insang ikan berwarna pucat, terdapat bercak putih (*white patch*) selanjutnya menjadi rusak, geripis pada ujung lamella dan akhirnya membusuk.
3. Terjadi kematian masal dalam waktu yang relatif singkat (1-7 hari).

#### *Vaksinasi/perlakuan*

Pengujian ini terdiri dari dua kelompok perlakuan, dan masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Kedua perlakuan tersebut adalah:

- A. Kelompok ikan yang divaksin dengan vaksin anti-KHV KV3 (KOVAX).
- B. Kelompok ikan yang tidak divaksin sebagai kontrol.

Sediaan vaksin yang digunakan dalam pengujian ini adalah vaksin virus yang telah dilemahkan (*attenuated vaccine*) dengan merk dagang KV3 produksi KOVAX, merupakan vaksin anti-KHV untuk mencegah penyakit koi herpesvirus (KHV) pada ikan mas dan koi.

Vaksinasi dilakukan terhadap populasi ikan mas “specific pathogen free (SPF)” KHV berdasarkan hasil pemeriksaan secara klinis dan molekuler, serta negatif terhadap infeksi patogen potensial lainnya dari golongan parasit, bakteri dan cendawan. Setelah melalui proses aklimatisasi, populasi ikan mas tersebut juga secara visual telah menunjukkan tingkah laku dan respon yang stabil terhadap kondisi dan sistem pemeliharaan di laboratorium uji.

Proses vaksinasi dilakukan melalui teknik perendaman, yaitu ikan uji direndam dalam larutan vaksin KV3 sesuai dengan protokol yang direkomendasikan oleh produsen. Sebanyak 150 ekor ikan uji dengan rataan bobot tubuh  $\pm 10$  gr/ekor dimasukkan dalam 10 liter air. Kemudian secara aseptik sebanyak 10 ml

stok larutan vaksin dilarutkan secara merata ke dalam air yang telah berisi 150 ekor ikan tersebut. Untuk memastikan bahwa larutan vaksin tersebar merata di seluruh kolom air, dibantu dengan aerasi yang berfungsi pula sebagai pemasok oksigen terlarut selama proses vaksinasi. Perendaman ikan dalam larutan vaksin berlangsung selama 40 menit.

Larutan vaksin yang telah digunakan untuk merendam ikan uji, disucihamakan dengan menggunakan larutan klorin pada dosis 300 ppm selama 48 jam untuk selanjutnya dialirkan ke tempat pembuangan limbah cair yang tersedia di unit karantina ikan.

Setelah proses vaksinasi berakhir, ikan segera dipindahkan ke wadah uji/akuarium dengan kepadatan 50 ekor/wadah selama 21 hari agar ikan uji mempunyai periode yang cukup untuk menginduksi kekebalan spesifik sesuai dengan jenis vaksin yang diberikan. Selama tiga hari pasca vaksinasi, suhu air pemeliharaan ikan selalu dipertahankan agar tidak lebih dari 24 °C. Selama proses induksi kekebalan spesifik pada tubuh ikan uji yang berlangsung beberapa hari, sistem pemeliharaan yang meliputi prosedur penggantian air media dan pemberian pakan adalah sama seperti pada saat proses aklimatisasi.

#### *Uji tantang*

Pada hari ke-21 pasca pemberian vaksin, seluruh kelompok ikan uji diinfeksi KHV secara buatan dengan teknik pemaparan (*cohabitation*) selama 14 hari pada suhu air berkisar antara 20-24 °C. Pada masing-masing wadah percobaan, dimasukkan sebanyak lima ekor ikan mas yang definitif positif terinfeksi KHV. Kepastian bahwa populasi ikan sumber infeksi tersebut positif terinfeksi KHV didasarkan pada batasan “defini kasus KHV” menurut Taukhid *et al.* (2004), serta telah dikonfirmasi secara laboratoris melalui uji *polymerase chain reaction* (PCR).

Untuk membedakan antara individu kelompok ikan uji dengan individu kelompok ikan sumber infeksi dilakukan melalui penanda (*tagging*) dengan memotong salah satu sirip dada ikan sumber infeksi. Ikan sumber infeksi yang mati selama proses uji tantang diganti dengan individu baru, sehingga proporsi ikan sumber infeksi selama berlangsungnya proses uji tantang tetap proporsional yaitu 5 ekor/70 liter air.

#### *Pengamatan*

Pengamatan dilakukan terhadap tingkah laku, gejala klinis dan mortalitas ikan uji yang dilakukan setiap hari hingga akhir pengujian. Individu ikan uji yang mengalami kematian diperiksa penyebab utamanya secara klinis dan laboratoris. Pada pengujian ini, hanya individu ikan uji yang mengalami kematian akibat terinfeksi KHV yang dihitung sebagai mortalitas kumulatif.

Deteksi gen KHV dengan teknik PCR dilakukan menurut metoda yang dikembangkan oleh Gray *et al.* (2002) terhadap populasi ikan uji pada (1) sebelum proses aklimatisasi, (2) pada saat proses aklimatisasi, (3) sesaat sebelum proses vaksinasi, serta (4) terhadap individu ikan uji yang mati selama proses pengujian. Sedangkan pada populasi ikan sumber infeksi, deteksi gen KHV dilakukan (1) sebelum didatangkan ke lokasi pengujian, dan (2) sesaat sebelum proses uji tantang. Pengambilan sampel untuk masing-masing kelompok dilakukan dengan teknik sampling selektif (*non-probability sampling*) yang didasarkan pada tingkah laku dan gejala klinis yang nyata akibat infeksi KHV.

Efektivitas vaksin dievaluasi berdasarkan mortalitas kumulatif, sintasan (SR) dan *relative percent survival* (RPS) selama proses pengujian.

Sintasan (SR)

Sintasan dihitung dengan rumus:

$$SR = N/N_0 \times 100$$

Keterangan:

$N_0$  : jumlah ikan pada saat awal pengujian

$N$  : jumlah ikan pada akhir pengujian + jumlah ikan yang mati karena penyebab lain (selain infeksi KHV).

Relative percent survival (RPS)

RPS dihitung dengan rumus:

$$RPS = (1 - \{\% \text{ mortalitas ikan yang divaksin} / \% \text{ mortalitas ikan kontrol}\}) \times 100$$

Indikator sistem kekebalan tubuh

Selain nilai sintasan dan mortalitas, dilakukan pula pengamatan terhadap beberapa parameter haematologis yang dapat digunakan sebagai indikator sistem pertahanan tubuh ikan, antara lain: penghitungan total leukosit dan aktivitas fagositosis yang dilakukan pada periode induksi kekebalan dan periode ujiantang. Beberapa parameter kualitas air yang diduga memiliki peran sebagai stressor maupun patogenitas KHV (pH, oksigen terlarut, dan amoniak) diamati secara berkala, sedangkan suhu air minimum-maksimum diamati setiap hari.

**Hasil dan pembahasan***Ikan uji*

Visualisasi hasil deteksi KHV dengan teknik PCR terhadap populasi ikan mas yang digunakan sebagai hewan uji menunjukkan hasil negatif (Gambar 1), sedangkan populasi ikan mas yang digunakan sebagai sumber infeksi menunjukkan hasil positif (Gambar 2).

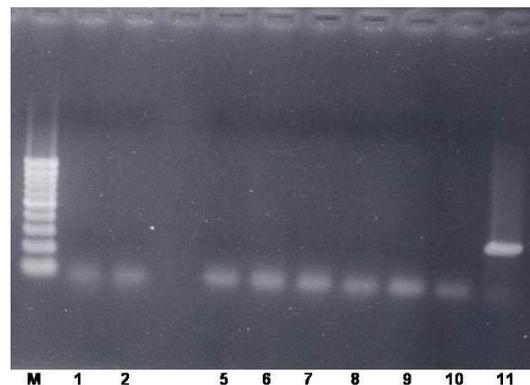
Berdasarkan visualisasi hasil deteksi KHV pada ikan mas yang ditunjukkan pada Gambar 1, maka penggunaan ikan uji dari populasi “spesifik pathogen free” terhadap KHV pada pengujian ini telah sesuai dengan persyaratan. Demikian pula dengan populasi ikan mas yang digunakan sebagai sumber infeksi seperti ditunjukkan pada Gambar 2, yang menunjukkan hasil positif KHV; meskipun dengan persen prevalensi KHV hanya 80% (4/5). Namun karena pendekatan hasil deteksi adalah populasi; maka dapat diasumsikan bahwa populasi ikan sumber tersebut secara definitif adalah positif terinfeksi KHV.

Selain SPF terhadap KHV, persyaratan umum yang idealnya harus dipenuhi oleh populasi ikan yang hendak divaksin adalah sehat dan relatif bebas dari adanya infeksi patogen potensial. Hasil pemeriksaan secara mikrobiologis pada populasi ikan uji terhadap keberadaan infeksi patogen golongan lainnya juga menunjukkan bahwa tidak ditemukan adanya infeksi patogen potensial dari golongan parasit, cendawan maupun bakteri. Sehingga dapat dikatakan bahwa secara umum populasi ikan uji dalam kondisi sehat dan telah siap untuk divaksinasi.

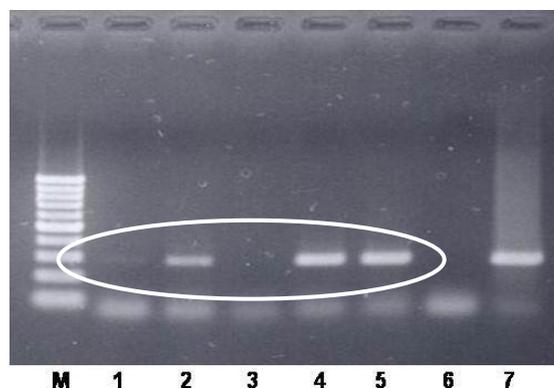
*Tingkah laku dan gejala klinis*

Tingkah laku pada kelompok ikan uji yang divaksin selama masa proses induksi kekebalan tubuh (hari ke-1 hingga ke-21 pasca vaksinasi) terlihat bahwa secara umum dapat dikatakan cukup sehat dan normal; meskipun pada hari ke-2 terdapat masing-masing satu ekor ikan dari setiap wadah menunjukkan

tingkah laku yang abnormal yaitu terlihat lemah dan selalu menggantung di permukaan air, sedangkan tingkah laku pada kelompok ikan kontrol selama periode tersebut semuanya tampak sehat dan normal.



Gambar 1. Profil gel elektroforesis hasil deteksi Koi Herpesvirus (KHV) dari ikan mas uji pada saat (1) sebelum proses aklimatisasi (line 1 & 2), (2) pada saat proses aklimatisasi (line 5, 6 & 7), (3) sesaat sebelum proses vaksinasi (line 8, 9 & 10) M = marker DNA, dan line 11 = kontrol positif



Gambar 2. Profil gel elektroforesis hasil deteksi Koi Herpesvirus (KHV) dari ikan mas yang digunakan sebagai sumber infeksi sesaat sebelum proses kohabitasi. M = marker DNA, line 1 - 5 = sampel individu ikan mas, line 6 = kontrol negatif dan line 7 = kontrol positif

Pada hari ke-5 pasca vaksinasi, ikan-ikan uji yang menunjukkan tingkah laku abnormal pada kelompok ikan yang divaksin mulai tampak adanya bercak-bercak kemerahan pada permukaan tubuh, tutup insang (operkulum), dan lamella insang berwarna pucat serta geripis pada bagian ujungnya. Pada hari ke-7, bercak-bercak kemerahan berkembang menjadi lesi dan kerusakan pada lamella insang semakin parah (*gill rot*) hingga menyebabkan kematian pada hari ke-8, 9, dan 12. Hasil pemeriksaan secara laboratoris terhadap ketiga ekor ikan yang mati tersebut ditemukan adanya infeksi dua jenis jasad patogen, yaitu koi herpesvirus (KHV) dan bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Terjadinya ikan uji yang mengalami kematian pasca vaksinasi, dan berdasarkan hasil pemeriksaan ditemukan adanya infeksi KHV; maka diduga kuat bahwa KHV merupakan primary agent penyebab kematian tersebut, sedangkan bakteri *A. hydrophila* sebagai penginfeksi sekunder. Kehadiran KHV yang berkembang menjadi virulen pada kelompok ikan yang divaksin sangat mungkin terjadi, karena sediaan vaksin yang digunakan pada pengujian ini adalah biakan virus yang lemahkan yang masih memiliki potensi untuk berkembang menjadi virulen apabila kondisi inang dan lingkungan cukup permisif untuk

perkembangan virus tersebut. Oleh karena itu, proses vaksinasi harus benar-benar mengikuti persyaratan dan prosedur yang direkomendasikan oleh produsen.

Proses ujiantang ikan uji terhadap KHV melalui teknik pemaparan dilakukan mulai hari ke-21 pasca vaksinasi dan berlangsung selama 14 hari. Hasil pengamatan tingkah laku pada kelompok ikan yang divaksin pasca ujiantang menunjukkan bahwa pada hari ke-9 pasca ujiantang mulai terlihat beberapa ekor ikan yang menunjukkan tingkah laku abnormal seperti nafsu makan menurun, lemah, berenang tidak terarah, dan megap-megap. Pada kelompok ikan kontrol, kondisi abnormalitas yang serupa sudah terjadi sejak hari ke-5 pasca ujiantang dan terjadi pada sebagian besar ikan uji.

Gejala klinis yang tampak pada kedua kelompok ikan uji selama proses ujiantang antara lain: (1). bercak putih (*white patch*) pada lamella insang, pendarahan, nekrosa dan akhirnya membusuk (Gambar 3a), dan (2). Ekses lendir, kulit melepuh, dan geripis pada ujung sirip, (Gambar 3b).

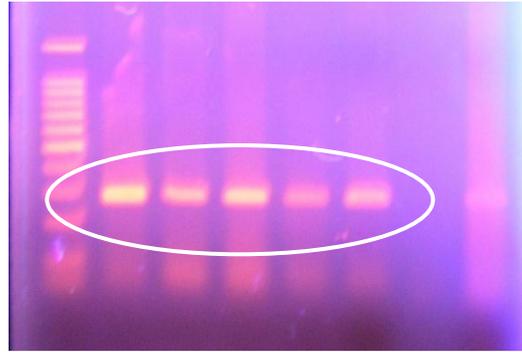


Gambar 3. Ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang terinfeksi Koi Herpesvirus (KHV). Kerusakan pada lamella insang, pendarahan, nekrosa dan akhirnya membusuk (a), dan ekses lendir, kulit melepuh, dan geripis pada ujung sirip (b)

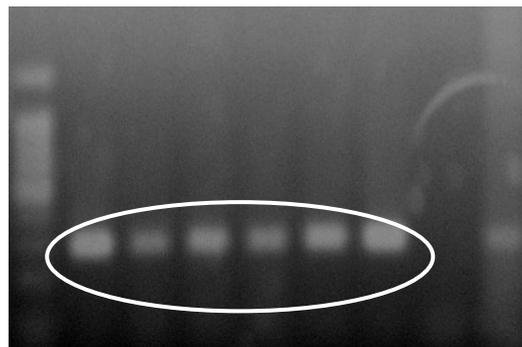
Hasil deteksi KHV terhadap sebagian besar ikan yang sekarat (*moribund*) dari kedua kelompok (vaksinasi dan kontrol) ditemukan bahwa 100% positif adanya infeksi KHV (Gambar 4 dan 5). Hasil isolasi bakteri dari sampel yang sama ditemukan adanya infeksi bakteri *A. hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. Dari hasil tersebut mengindikasikan bahwa proses infeksi buatan dengan teknik pemaparan berhasil dengan baik, dan secara umum dapat dikatakan bahwa KHV merupakan *primary agent* penyebab kematian pada ikan-ikan uji tersebut, sedangkan bakteri merupakan penginfeksi sekunder.

#### *Efektivitas vaksin*

Pola rata-rata jumlah kematian ikan uji dari hari ke hari selama proses ujiantang yang berlangsung selama 14 hari dapat dilihat pada Gambar 6. Pada gambar tersebut terlihat bahwa kematian ikan uji mulai terjadi pada hari ke-6 pasca ujiantang, dan berlangsung hingga hari ke-13. Jumlah kematian tertinggi terjadi pada kelompok ikan kontrol mulai terjadi pada hari ke-7 hingga hari ke-9. Masa inkubasi KHV berlangsung sekitar 14 hari, meskipun berdasarkan pengalaman di Indonesia selama ini masa inkubasi KHV semakin pendek yaitu sekitar 4-10 hari (Taukhid *et al.*, 2005).

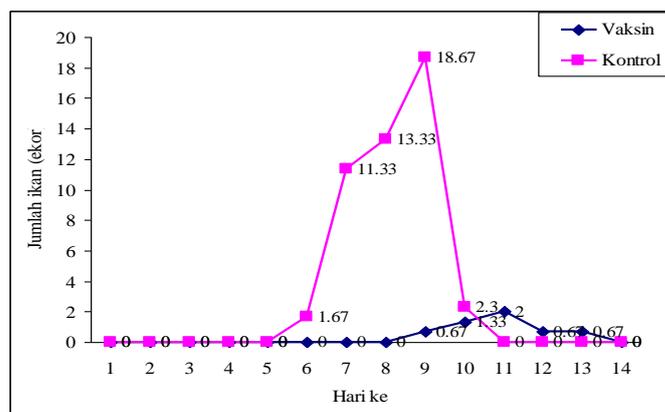


Gambar 4. Profil gel elektroforesis hasil deteksi Koi Herpesvirus (KHV) dari kelompok ikan mas uji yang divaksin selama proses ujiantang: M = marker DNA, sampel ikan uji yang sedang sekarat (line 1-5), 6 = kontrol negatif, dan 7 = kontrol positif



Gambar 5. Profil gel elektroforesis hasil deteksi Koi Herpesvirus (KHV) dari kelompok ikan kontrol selama proses ujiantang: M = marker DNA, sampel ikan uji yang sedang sekarat (line 1-6), 7 = kontrol negatif, dan 8 = kontrol positif

Dari Gambar 6 tersebut juga terlihat bahwa pemberian vaksin sangat nyata memberikan proteksi yang tinggi pada ikan uji terhadap infeksi KHV. Proteksi tersebut tidak hanya dimanifestasikan pada rendahnya jumlah ikan yang mengalami kematian selama proses ujiantang dibandingkan dengan kelompok ikan kontrol, namun juga terhadap periode yang lebih panjang bagi KHV untuk dapat mengakibatkan kematian ikan yang telah dibekali kekebalan tubuh spesifik. Analisa statistik terhadap persen kematian kumulatif menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata pada selang kepercayaan 99% ( $P < 0,01$ ) antar kedua kelompok perlakuan.



Gambar 6. Rataan jumlah kematian ikan uji dari hari ke hari selama proses ujiantang yang berlangsung selama 14 hari

Efektivitas vaksin dapat dievaluasi antara lain melalui level proteksi pada saat diuji tantang terhadap patogen target. Indikator yang paling mudah dan diakui secara umum adalah dengan menilai tingkat kelangsungan hidup (*survival rate*) setelah melewati proses uji tantang terhadap patogen target pada level dan periode tertentu yang diberikan secara buatan. Nilai kelangsungan hidup ikan uji setelah proses uji tantang yang dilakukan selama 14 hari selengkapnya disajikan pada Tabel 1, dan perkembangan rata-rata kelangsungan hidup ikan dari hari ke hari selama proses uji tantang dapat dilihat pada Gambar 7.

Tabel 1. Jumlah ikan pada awal dan akhir uji tantang yang berlangsung selama 14 hari

Perlakuan	Ulangan	Jumlah awal (ekor)	Jumlah akhir (ekor)	Sintasan (%)
Vaksin	1	49	45	91.84
	2	49	42	85.71
	3	49	44	89.79
	Rataan	<b>49</b>	<b>43.67</b>	<b>89.11</b>
Kontrol	1	50	1	2
	2	50	4	8
	3	50	3	6
	Rataan	<b>50</b>	<b>2.67</b>	<b>5.33</b>

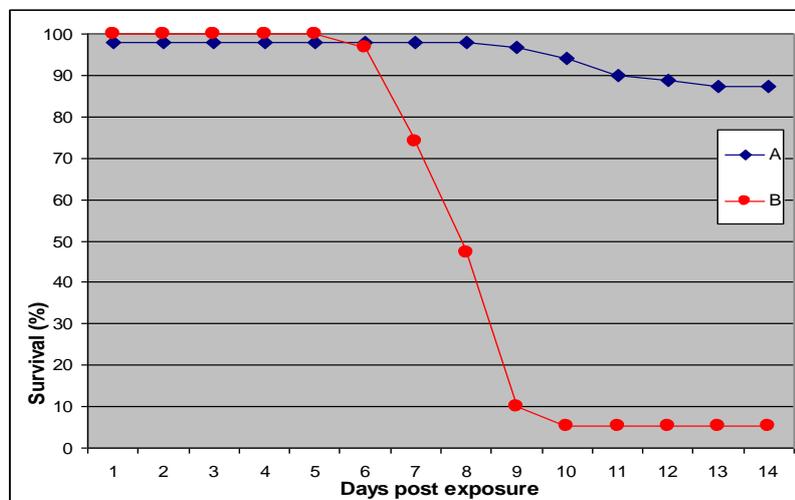
Pemberian vaksin KV3 pada ikan uji menghasilkan rata-rata tingkat kelangsungan hidup sebesar 89,11%, sedangkan pada kelompok kontrol hanya sebesar 5,33% (Tabel 1). Pola rata-rata persentase kelangsungan hidup kedua kelompok ikan uji selama proses uji tantang yang berlangsung selama 14 hari secara detail dapat dilihat pada Gambar 8. Analisa statistik terhadap nilai kematian kumulatif menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata pada selang kepercayaan 99% ( $P < 0,01$ ) antar kedua kelompok perlakuan. Dari nilai tersebut dapat dikatakan bahwa vaksin KV3 memiliki potensi yang sangat prospektif sebagai salah satu teknik pengendalian penyakit KHV pada ikan mas, karena mampu menginduksi kekebalan spesifik hingga level protektif.

Selain indikator tingkat kelangsungan hidup, efektivitas vaksin juga dapat dievaluasi melalui nilai *relative percent survival* (RPS) yang merupakan nilai persen relatif kelangsungan hidup kelompok ikan yang divaksin dibandingkan dengan nilai parameter yang sama dari kelompok ikan kontrol. Nilai RPS ikan uji pada akhir pengujian selengkapnya disajikan pada Tabel 2. Pada tabel tersebut diketahui bahwa nilai RPS dari pemberian vaksin KV3 pada ikan uji adalah sebesar 88,50% yang berarti bahwa vaksin tersebut cukup efektif karena memiliki nilai RPS lebih dari 50% (Ellis, 1998).

#### *Keamanan vaksin (safety of vaccine)*

Keamanan vaksin dapat dievaluasi melalui ada tidaknya kematian akut pasca vaksinasi yang dihitung berdasarkan jumlah kematian yang terjadi secara akut selama 24 jam pada kelompok ikan yang divaksin dibandingkan dengan kelompok ikan kontrol. Kematian yang terjadi secara akut selama 24 jam pasca vaksinasi mengindikasikan bahwa vaksin yang digunakan berpengaruh negatif terhadap ikan yang divaksin. Pada pengujian ini tidak ditemukan adanya kematian ikan uji selama 24 pasca vaksinasi. Jumlah ikan yang divaksin dan kontrol hingga hari ke-21 pasca vaksinasi selengkapnya disajikan pada Tabel 3.

Pada Tabel 3 dapat dilihat bahwa selama periode induksi kekebalan tubuh spesifik yang diharapkan berlangsung selama 2-3 minggu, tidak ditemukan adanya kematian ikan uji yang signifikan. Meskipun terjadi kematian pada masing-masing ulangan pada kelompok ikan yang divaksin selama periode induksi kekebalan, namun jumlahnya sangat minim yaitu 1 ekor pada masing-masing ulangan atau setara dengan 2% dari total populasi.



Gambar 7. Pola rata-rata persentase kelangsungan hidup kedua kelompok ikan uji selama proses uji tantangan yang berlangsung selama 14 hari. A = kelompok ikan yang divaksin, dan B = kelompok ikan kontrol

Tabel 2. Nilai *relative percent survival* (RPS) ikan uji pada akhir pengujian

Perlakuan	Rataan survival rate (%)	Rataan mortalitas (%)	RPS (%)
Vaksin	89,11	10,89	<b>88,50</b>
Kontrol	5,33	94,67	

Tabel 3. Jumlah ikan uji pasca vaksinasi hingga hari ke-21 (periode induksi kekebalan)

Perlakuan	Ulangan	Jumlah awal (ekor)	Jumlah akhir (ekor)	Survival rate (%)
Vaksin	1	50	49	98
	2	50	49	98
	3	50	49	98
	<b>Rataan</b>		<b>50</b>	<b>49</b>
Kontrol	1	50	50	100
	2	50	50	100
	3	50	50	100
	<b>Rataan</b>		<b>50</b>	<b>50</b>

Sebagaimana telah disebutkan pada bagian tingkah laku dan gejala klinis bahwa pada hari ke-5 pasca vaksinasi, ikan-ikan uji yang menunjukkan tingkah laku abnormal pada kelompok ikan yang divaksin mulai tampak adanya bercak-bercak kemerahan pada permukaan tubuh, tutup insang (operkulum), dan lamella insang berwarna pucat serta geripis pada bagian ujungnya. Pada hari ke-7, bercak-bercak kemerahan

berkembang menjadi lesi dan kerusakan pada lamella insang semakin parah (*gill rot*) hingga menyebabkan kematian pada hari ke-8, 9, dan 12. Hasil pemeriksaan secara laboratoris terhadap ketiga ekor ikan yang mati tersebut ditemukan adanya infeksi 2 jenis jasad patogen, yaitu koi herpesvirus (KHV) dan bakteri *Aeromonas hydrophila*. Kehadiran KHV yang berkembang menjadi virulen pada kelompok ikan yang divaksin sangat mungkin terjadi, karena sediaan vaksin yang digunakan pada pengujian ini adalah biakan virus yang lemahkan yang masih memiliki potensi untuk berkembang menjadi virulen apabila kondisi inang dan lingkungan cukup permisif untuk perkembangan virus tersebut. Oleh karena itu, proses vaksinasi harus benar-benar mengikuti persyaratan dan prosedur yang direkomendasikan oleh produsen.

Sesuai dengan batasan *biological safety* untuk produk vaksin bahwa keamanan vaksin dapat dinilai berdasarkan jumlah kematian yang terjadi secara akut selama 24 jam pada kelompok ikan yang divaksin dibandingkan dengan kelompok ikan kontrol; maka pada pengujian ini dapat disimpulkan bahwa vaksin KV3 relatif aman bagi ikan mas.

#### *Respon kekebalan tubuh ikan uji*

Keberhasilan pemberian vaksin pada ikan dapat dievaluasi secara langsung berdasarkan nilai sintasan kelompok ikan yang divaksin setelah melalui proses ujiantang terhadap patogen target pada level dan periode tertentu, atau dapat pula diamati melalui beberapa indikator yang terkait dengan sistem kekebalan tubuh ikan, baik kekebalan spesifik maupun non-spesifik. Indikator yang paling ideal adalah dengan melihat nilai titer antibodi spesifik terhadap patogen target, dalam hal ini koi herpesvirus.

Teknik deteksi antibodi dalam serum darah ikan terhadap KHV belum tersedia di Indonesia, oleh karena itu pengamatan respon kekebalan tubuh ikan uji dievaluasi berdasarkan indikator kekebalan tubuh non-spesifik. Indikator yang umum digunakan untuk status kesehatan atau menilai keragaan sistem kekebalan tubuh non-spesifik pada ikan dapat dilakukan secara hematologis seperti total leukosit dan indeks fagositosis. Secara fungsional, sistem kekebalan tubuh spesifik (antibodi) dan sistem kekebalan tubuh non-spesifik melibatkan komponen yang relatif sama; karena kedua sistem tersebut sangat tergantung pada aktivitas sel leukosit dan sel makrofag yang berperan penting dalam aktivitas fagositosis.

Peningkatan kekebalan ikan mas terhadap KHV, ditandai adanya peningkatan total leukosit dan indeks fagositosis. Leukosit merupakan salah satu komponen darah yang berfungsi sebagai pertahanan non-spesifik yang akan melokalisir dan mengeliminir patogen melalui aktivitas fagositosis. Meningkatnya indeks fagositosis merupakan pertanda terjadi peningkatan kekebalan tubuh.

Peningkatan kekebalan tubuh ikan uji terhadap infeksi KHV (selama proses ujiantang) terlihat pada Gambar 7. Pada gambar tersebut nampak bahwa kematian harian pada kelompok ikan yang divaksin mulai terjadi pada hari ke-9; sedangkan pada kelompok ikan kontrol sudah terjadi sejak hari ke-6. Perbedaan tempo terjadinya kematian pada kedua kelompok ikan tersebut mengindikasikan bahwa pada kelompok ikan yang divaksin memiliki level pertahanan yang lebih tinggi terhadap infeksi KHV sehingga mampu bertahan hidup lebih lama dibanding kelompok lainnya. Demikian pula dengan jumlah ikan yang mati dari masing-masing kelompok dari hari ke hari hingga akhir periode ujiantang. Dari kedua fenomena tersebut, secara umum dapat dikatakan bahwa pada kelompok ikan yang divaksin dengan vaksin KV3 memiliki kualitas dan kuantitas kekebalan tubuh spesifik terhadap infeksi KHV yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok ikan kontrol.

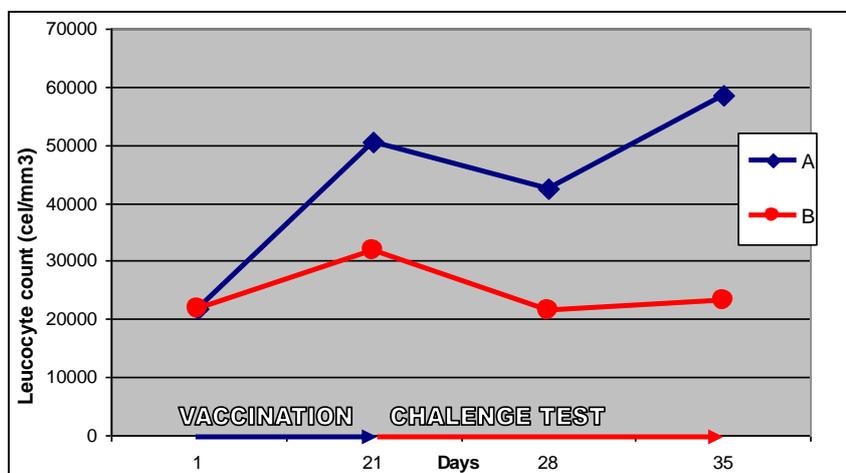
Total leukosit

Jumlah total leukosit pada masing-masing kelompok ikan uji tertera pada Tabel 4, kisaran total leukosit pada kelompok ikan yang divaksin adalah sebanyak 19750-61200 sel/mm<sup>3</sup>; sedangkan pada kelompok ikan kontrol adalah sebanyak 20050-34250 sel/mm<sup>3</sup>. Pola perubahan rata-rata nilai total leukosit selama periode induksi dan periode uji tantang dapat dilihat pada Gambar 8.

Pada Tabel 4 dan Gambar 9 terlihat bahwa pada hari ke-21 (pasca vaksinasi) nilai total leukosit pada kelompok ikan yang divaksin mengalami peningkatan yang lebih tinggi dibandingkan dengan yang terjadi pada kelompok ikan kontrol. Analisa statistik terhadap nilai total leukosit menunjukkan bahwa pemberian vaksin KV3 berpengaruh nyata terhadap nilai total leukosit ( $P < 0,01$ ). Nilai rata-rata total leukosit pada kelompok ikan yang divaksin adalah sebesar (50416,67±1206,58 sel/mm<sup>3</sup>), sedangkan pada kelompok ikan kontrol sebesar (31716,67±3071,78 sel/mm<sup>3</sup>). Dari kedua rata-rata nilai yang sangat berbeda tersebut menandakan bahwa vaksin KV3 bersifat imunogen sehingga mampu meningkatkan respon pertahanan selular dari ikan yaitu berupa peningkatan total leukosit.

Tabel 4. Nilai Rataan Total leukosit (sel/mm<sup>3</sup>) ikan uji selama pengujian vaksin KV3

Perlakuan	Ulangan	Pengambilan sampel (hari ke-)			
		Periode induksi		Periode uji tantang	
		0	21	7	14
Vaksin	1	23050	49400	44650	61200
	2	19750	51750	42250	58300
	3	22950	50100	40600	56250
	Rataan	<b>21916,67</b>	<b>50416,67</b>	<b>42500</b>	<b>58583,33</b>
Kontrol	1	20600	34250	19750	21450
	2	23750	28300	23700	26500
	3	23100	32600	21200	23750
	Rataan	<b>22483,33</b>	<b>31716,67</b>	<b>21550</b>	<b>23900</b>



Gambar 8. Pola perubahan nilai total leukosit ikan uji selama pengujian vaksin KV3

Pada Gambar 9 terlihat pula bahwa pada hari ke-7 (periode ujiantang), secara umum terjadi penurunan nilai total leukosit yang nyata pada kedua kelompok ikan uji. Pada akhir periode ujiantang terlihat bahwa peningkatan nilai total leukosit pada kelompok ikan yang divaksin lebih tinggi dibandingkan dengan yang terjadi pada kelompok ikan kontrol. Fakta ini merupakan indikator bahwa vaksin KV3 bersifat imunogenik dan sangat berperan dalam meningkatkan sistem kekebalan tubuh ikan terhadap adanya infeksi KHV. Sifat imunogenik dari bahan vaksin mampu memicu peningkatan leukosit lebih tinggi pada ikan yang divaksin. Peningkatan sel leukosit merupakan refleksi keberhasilan sistem imunitas ikan dalam mengembangkan respon imunitas selular (nonspesifik) sebagai pemicu untuk mengembangkan respon pertahanan selanjutnya yaitu pertahanan spesifik (antibodi).

#### Indeks fagositosis

Nilai rata-rata indeks fagositosis pada kelompok ikan yang divaksin berkisar antara 6,00-21,00%; sedangkan kelompok ikan kontrol berkisar antara 7,00-12,00%. Nilai persentase indeks fagositosis selengkapnya disajikan pada Tabel 5. Pola perubahan indeks fagositosis selama periode induksi dan ujiantang dapat dilihat pada Gambar 9.

Aktivitas fagositosis merupakan pertahanan pertama dari respon selular dan dilakukan oleh monosit/makrofag dan granulosit. Proses fagositosis meliputi pengenalan material yang akan dieliminasi, tahap kemotaksis, tahap perlekatan, tahap penguraian sel dan melakukan digesti internal dengan beberapa mekanisme antimikrobia. Sirkulasi sel darah putih (monosit/makrofag, dan granulosit) membentuk suatu kesatuan jaringan pertahanan yang mampu mengeliminasi berbagai patogen penyerang dan sekresinya, melalui fagositosis tanpa suatu aktivasi awal.

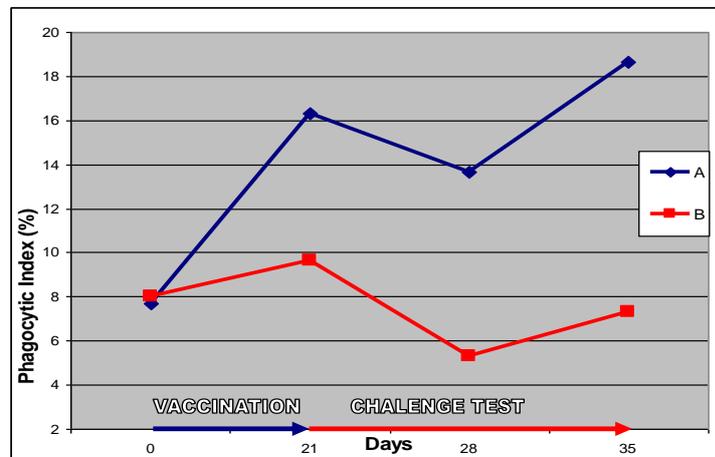
Tabel 5. Nilai Indeks Fagositosis (%) ikan uji selama pengujian vaksin KV3

Perlakuan	Ulangan	Pengambilan sampel (hari ke-)			
		Periode induksi		Periode ujiantang	
		0	21	7	14
Vaksin	1	6	16	14	21
	2	9	19	16	19
	3	8	14	11	16
	Rataan	<b>7.67</b>	<b>16.33</b>	<b>13.67</b>	<b>18.67</b>
Kontrol	1	8	8	5	9
	2	7	9	7	6
	3	9	12	4	7
	Rataan	<b>8</b>	<b>9.67</b>	<b>5.33</b>	<b>7.33</b>

Pada Tabel 5 dan Gambar 9 terlihat bahwa pada hari ke-21 pasca vaksinasi, nilai persentase indeks fagositosis pada kelompok ikan yang divaksin mengalami peningkatan lebih tinggi (16.33%) dibandingkan dengan kelompok ikan kontrol (9.67%). Analisa statistik terhadap nilai-nilai tersebut menunjukkan bahwa pemberian vaksin berpengaruh nyata terhadap peningkatan indeks fagositosis ( $P < 0.01$ ).

Pada hari ke-7 (periode ujiantang) secara umum terjadi penurunan nilai persentase indeks fagositosis baik pada kelompok ikan yang divaksin maupun kelompok ikan kontrol, lalu diikuti dengan peningkatan kembali persentase indeks fagositosis pada akhir periode ujiantang (Gambar 10). Namun pada

gambar tersebut juga tampak bahwa peningkatan kembali presentase indeks fagositosis pada akhir periode ujiantang yang terjadi pada kelompok ikan yang divaksin lebih tinggi (18.67%) dibandingkan dengan kelompok ikan kontrol (7.33%). Analisa statistik terhadap nilai rata-rata presentase indeks fagositosis pada akhir periode ujiantang menunjukkan bahwa pemberian vaksin memberikan perbedaan yang nyata dibandingkan dengan kontrol ( $P < 0.01$ ).



Gambar 9. Pola perubahan nilai prosentase indeks fagositosis ikan uji selama pengujian vaksin KV3

Fenomena peningkatan nilai rata-rata presentase indeks fagositosis yang nyata pada kelompok ikan yang divaksin, baik selama periode induksi maupun ujiantang mengindikasikan bahwa vaksin KV3 bersifat imunogenik sehingga memiliki kemampuan untuk menstimulasi aktivitas berbagai sel fagosit (terutama sel monosit). Peningkatan aktivitas sel fagosit selanjutnya diikuti oleh proliferasi berbagai sel fagosit, yang pada akhirnya akan meningkatkan nilai indeks fagositosis. Meningkatnya indeks fagositosis menunjukkan adanya peningkatan kekebalan tubuh. Setelah proses ujiantang terlihat adanya peningkatan nilai rata-rata indeks fagositosis yang nyata pada kelompok ikan yang divaksin, hal tersebut sangat berkaitan dengan keberhasilan “mekanisme memori pengenalan virion KHV” oleh sistem kekebalan tubuh ikan yang telah divaksinasi. Pola peningkatan prosentase indeks fagositik ini merupakan fungsi dari peningkatan total leukosit maupun prosentase masing-masing jenis leukosit seperti limfosit, monosit dan neutrofil.

Nilai indeks fagositosis yang tinggi pada kelompok ikan yang divaksin juga merupakan isyarat bahwa proses fagositosis yang terjadi akan berkontribusi besar dalam mekanisme penyajian antigen (*antigen presenting cells*) untuk menstimulasi respon sel limfosit (Almendras, 2001). Partikel antigen yang difagosit, diproses dan dipresentasikan sebagai peptide antigen yang berasosiasi dengan molekul MHC kelas II pada permukaan sel fagosit. Sub populasi sel limfosit T yang disebut sel *T-helper* akan mengenali peptide antigen 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 virus. Pengikatan MHC II dengan limfosit (*T-helper*) akan memberi sinyal supaya limfosit B berproliferasi dan berdiferensiasi untuk membentuk antibodi. Antibodi akan mengikat antigen, membentuk kompleks antigen-antibodi yang akan mengaktifasi komplemen dan mengakibatkan hancurnya virion.

## Simpulan

- Vaksin anti-KHV KV3 memiliki efektivitas yang tinggi sebagai salah satu produk biologi yang prospektif untuk digunakan dalam pengendalian penyakit koi herpesvirus (KHV) pada ikan mas.
- Efektivitas vaksin tersebut terlihat pada capaian rataan nilai kelangsungan hidup kelompok ikan yang divaksin sebesar 89,11% dibandingkan dengan kelompok ikan kontrol yang hanya sebesar 5,33%.
- Penggunaan vaksin KV3 pada pengujian ini diperoleh nilai *relative percent survival* (RPS) sebesar 88,50% dan nilai tersebut termasuk dalam kategori efektif.
- Secara umum vaksin KV3 termasuk dalam kategori jenis vaksin yang relatif aman terhadap komoditas target, karena tidak mengakibatkan kematian akut selama 24 jam pasca aplikasi.
- Sediaan vaksin KV3 adalah biakan virus yang telah dilemahkan (*attenuated vaccine*) yang masih memiliki potensi infeksi apabila persyaratan dan prosedur vaksinasi tidak dilakukan sesuai dengan rekomendasi produsen.

## Persantunan

Penulis mengucapkan terima kasih kepada PT. Akasopa Transpati yang telah berkenan membiayai kegiatan pengujian vaksin KV3 untuk penanggulangan penyakit koi herpesvirus (KHV) pada ikan mas.

## Senarai pustaka

- Almendras, J. M. E. 2001. Immunity and Biological Methods of Disease Prevention and Control. *in* Health Management in Aquaculture. SEAFDEC, Philippines. 187 pp.
- Ellis, A. E. 1998. *Fish Vaccination*. Academic Press Limited, London. 255 pp.
- Gardenia, L., Sunarto A., Taukhid, Koesharyani I. dan Novita H. 2005. Potensi imunogenik dan prospek vaksinasi bagi upaya pencegahan penyakit Koi Herpes Virus pada ikan mas. *Serial Bunga Rampai: Strategi Pengelolaan dan Pengendalian Penyakit KHV*, suatu upaya pemecahan dalam pembudidayaan ikan air tawar. Pusat Riset Perikanan Budidaya, Badan Riset Kelautan dan Perikanan, Departemen Kelautan dan Perikanan. Hal. 73-81.
- Gray, W.L., Mullis L., LaPatra S. E., Groff J. M. & Goodwin A. 2002. Detection of koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish. *Journal of Fish Disease*, 25: 171-178.
- Hedrick, R. P., Gilad O., Yun S., Spangenberg J. V., Marty G. D., Nordhausen R. W., Kebus M. J., Bercovier H. & Eldar A. 2000. A Herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. *Journal of Aquatic Animal Health*, 12: 44-57.
- Pokorova, D. Vesely, T, Piackova, V. Reschova, S. Hulova, J. 2005. Current knowledge on koi herpesvirus (KHV): a review. *Jurn Vet. Med-Czech.*, 50 (4): 139-147.
- Sunarto, A., Rukyani A., and Itami T. 2005. Indonesian experience on the outbreak of koi herpes virus in koi and carp (*Cyprinus carpio*). Buletin of Fisheries Research Agency, Yokohama, Japan. 86: 15-21.
- Taukhid, T. Sumiati & Koesharyani I.. 2004. Pengaruh suhu air dan total bahan organik terlarut terhadap patogenisitas Koi Herpes Virus pada ikan mas (*Cyprinus carpio*). *Serial Bunga Rampai: Strategi Pengelolaan dan Pengendalian Penyakit KHV*, suatu upaya pemecahan dalam pembudidayaan ikan air tawar. Pusat Riset Perikanan Budidaya, Badan Riset Kelautan dan Perikanan, Departemen Kelautan dan Perikanan. Hal. 83-94.
- Taukhid, Sunarto A., Koesharyani I., Supriyadi H. & Gardenia L. 2005. Strategi pengendalian penyakit Koi Herpes Virus (KHV) pada ikan mas dan koi. *Serial Bunga Rampai: Strategi Pengelolaan dan Pengendalian Penyakit KHV*, suatu upaya pemecahan dalam pembudidayaan ikan air tawar. Pusat Riset Perikanan Budidaya, Badan Riset Kelautan dan Perikanan, Departemen Kelautan dan Perikanan. Hal. 41-60.