

## Isolasi koi herpesvirus (KHV) dari beberapa organ target dengan menggunakan kultur sel KT-2

Tuti Sumiati<sup>1, ✉</sup>, Agus Sunarto<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Pusat Penelitian dan Pengembangan Perikanan Budi Daya

### Abstrak

Kasus kematian masal pada ikan mas dan koi yang disebabkan oleh infeksi Koi herpesvirus masih terjadinya sampai saat ini. Pengambilan sampel yang tepat untuk deteksi penyakit ini akan sangat menentukan dalam mengidentifikasi penyebab infeksi. Adapun tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui organ yang menjadi target infeksi virus KHV dengan mengisolasi menggunakan kultur sel. Organ target (antara lain: otak, mata, insang, ginjal limpa, hepato pancreas, jantung dan usus, serta dengan *pooled* dari organ insang, ginjal dan limpa) terlebih dahulu dibuat ekstrak jaringan kemudian diinokulasikan ke dalam kultur sel. Sel diinkubasi selama 14 hari sambil dilakukan pengamatan terjadinya kerusakan pada kultur sel (*cytopathic effect*, CPE). Hasil pengamatan menunjukkan terjadi CPE pada kultur sel yang diinokulasi dengan ekstrak jaringan dari insang, ginjal dan *pooled* organ. Hasil uji PCR dari sel dan supernatan menunjukkan bahwa kultur sel yang mengalami CPE terindikasi terinfeksi KHV. Hal lain yang ditemukan selama penelitian juga dibahas dalam paper ini.

Kata kunci: CPE, KHV, kultur sel, organ target, PCR.

### Pendahuluan

Perikanan budi daya menjadi harapan bagi peningkatan produksi perikanan dalam memenuhi permintaan pasar baik domestik maupun internasional. Sejalan dengan perkembangan budi daya ikan, kasus kejadian penyakit menjadi kendala dan sangat mengkhawatirkan pembudi daya. Adanya wabah penyakit ikan telah mengakibatkan kerugian yang signifikan baik dari aspek ekonomi maupun sosial. Hal ini sangat berdampak bagi industri perikanan budi daya di Indonesia. Salah satunya adalah kasus kematian masal pada ikan mas dan koi akibat infeksi koi herpesvirus, KHV (Sunarto *et al.*, 2005<sup>a</sup>).

Penyakit KHV pertama kali dilaporkan terjadi di Israel dan Amerika Serikat pada tahun 1998 (Hedrick *et al.*, 2000), selanjutnya menyebar ke berbagai negara (Hoffman *et al.*, 2002; Way *et al.*, 2002; Sano *et al.*, 2004; Tu *et al.*, 2004). Di Indonesia kasus kematian masal pada ikan mas dan koi pertama kali dilaporkan terjadi pada tahun 2002 di daerah Blitar (Sunarto *et al.* 2005<sup>a</sup>). Wabah ini terus berlanjut dan menyebar hampir ke seluruh wilayah di Indonesia, dari Sumatra sampai ke Papua (Sunarto & Cameron, 2005) dan masih terus berlanjut hingga saat ini.

Koi herpesvirus merupakan penyakit paling mematikan pada budi daya ikan air tawar di Indonesia. Penyakit ini dapat menyebabkan kematian ikan mas dan koi antara 80-95% dalam waktu dua minggu (Perelberg *et al.*, 2003). Gejala klinis dari ikan yang terinfeksi KHV ditandai dengan produksi lendir yang berlebihan, adanya kerusakan insang dan terjadi pendarahan pada sirip, kulit serta internal organ. Infeksi bakteri *Flexibacter columnaris* dan *Aeromonas hydrophila* juga dapat menyebabkan kerusakan insang ikan mas (Sugiani *et al.* 2005). Oleh karena itu, pemilihan sampel yang tepat sangat penting untuk deteksi dan identifikasi penyakit KHV. Selain itu, dengan diketahui organ yang menjadi target serangan KHV diharapkan dapat memudahkan dalam isolasi virus untuk kajian lebih lanjut. Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui jaringan yang menjadi target infeksi KHV dengan cara isolasi virus dari beberapa organ target dengan menggunakan kultur sel ikan KT-2.

## Bahan dan metode

### *Kultur sel*

Kultur sel yang dipakai dalam penelitian ini adalah kultur sel KT-2 yang dikembangkan di laboratorium kesehatan ikan (Sunarto *et al.*, 2005<sup>b</sup>). Kultur sel ditumbuhkan dalam kultur cawan 12 (*12 multiwell plates*) dengan media Leibovitz's L-15 yang mengandung Fetal Bovine Serum (FBS) 10%, Penicillin 250 IU, Streptomycin 250 µg/ml, Kanamycin Sulfat 250 µg/ml dan L-glutamin 2mM. Untuk pasase isolat murni, sel dikultur pada cawan kultur (*flask*) dengan luas permukaan 25 cm<sup>2</sup>.

### *Ikan sampel*

Ikan yang dipakai untuk isolasi virus adalah ikan mas sakit yang diambil dari Waduk Cirata, Jawa Barat yang sedang mengalami kasus kematian masal dengan gejala klinis berenang di permukaan, lemah, adanya kerusakan insang dan terjadi kerusakan pada sirip.

### *Isolasi virus*

Ekstrak jaringan (*tissue extract*) disiapkan berdasarkan Fresney (2004). Organ yang dipakai untuk pembuatan ekstrak jaringan meliputi otak, mata, insang, ginjal, limpa, hepatopankreas, jantung, usus, dan dari gabungan (*pooled*) ginjal, limpa dan insang (3:1:1). Sebanyak 1 g organ diambil secara aseptik yang dikumpulkan dari 5 ekor ikan, masing-masing dihomogenkan dan diencerkan dengan *Hank's balanced salts solution* (HBSS) dengan perbandingan 1:10. Suspensi jaringan disentrifugasi pada kecepatan 1500 xg selama 15 menit pada suhu 4 °C. Supernatan diencerkan dengan HBSS plus serum 2% dengan perbandingan 1:5 dan disaring dengan filter 0,45 µm. Sebanyak 0,2 ml supernatan dari masing-masing ekstrak jaringan diinokulasikan pada kultur sel yang ditanam pada kultur cawan 12. Untuk kontrol, kultur sel diinokulasi dengan larutan HBSS dengan volume yang sama. Kultur diinkubasi selama 1 jam, selanjutnya 1,5 ml media L-15 ditambahkan ke dalam setiap sumur. Kultur sel diinkubasi pada suhu 25°C selama 14 hari. Parameter yang diamati adalah waktu terjadinya (*onset*) dan jenis kerusakan sel (*cytopathic effects*, CPE). Pasase kultur virus dilakukan untuk konfirmasi bahwa CPE disebabkan oleh infeksi virus, bukan karena toksisitas inokulum ekstrak jaringan. Pasase berseri dilakukan sebanyak 3 kali.

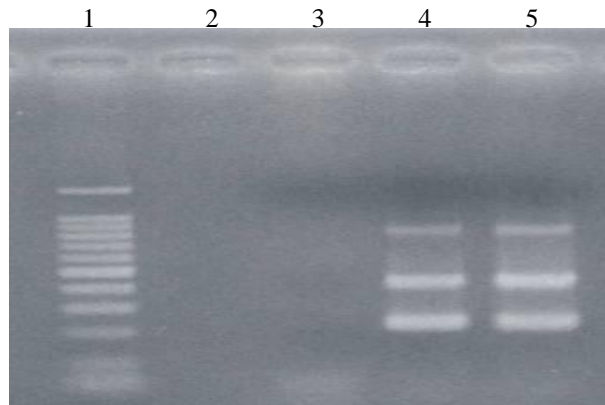
### *Polymerase chain reaction (PCR)*

Uji PCR dilakukan dengan menggunakan kits KHV (IQ-2000, Taiwan) yang menghasilkan produk PCR pada 229 bp dan 440 bp. Tes ini dilakukan untuk memastikan bahwa ikan sampel yang dipakai untuk isolasi benar-benar terinfeksi KHV, sampel uji diambil dari gabungan (*pooled*) insang, ginjal dan limpa. Tes PCR juga dilakukan untuk konfirmasi terhadap supernatan dan sel yang mengalami kerusakan (CPE) setelah diinokulasi dengan ekstrak jaringan ikan sakit.

## Hasil dan pembahasan

Ikan yang dipakai untuk isolasi virus adalah ikan mas sakit yang diambil dari Waduk Cirata yang sedang mengalami kasus kematian masal dengan indikasi terinfeksi KHV. Hal ini ditandai dengan gejala klinis seperti produksi lendir yang berlebihan, insang putih dan rusak (OATA, 2001). Hasil konfirmasi dari

uji PCR dengan menggunakan primer spesifik KHV memperlihatkan hasil yang positif. Hal ini menunjukkan bahwa kematian masal pada kolam budidaya tersebut disebabkan oleh KHV (Gambar 1).

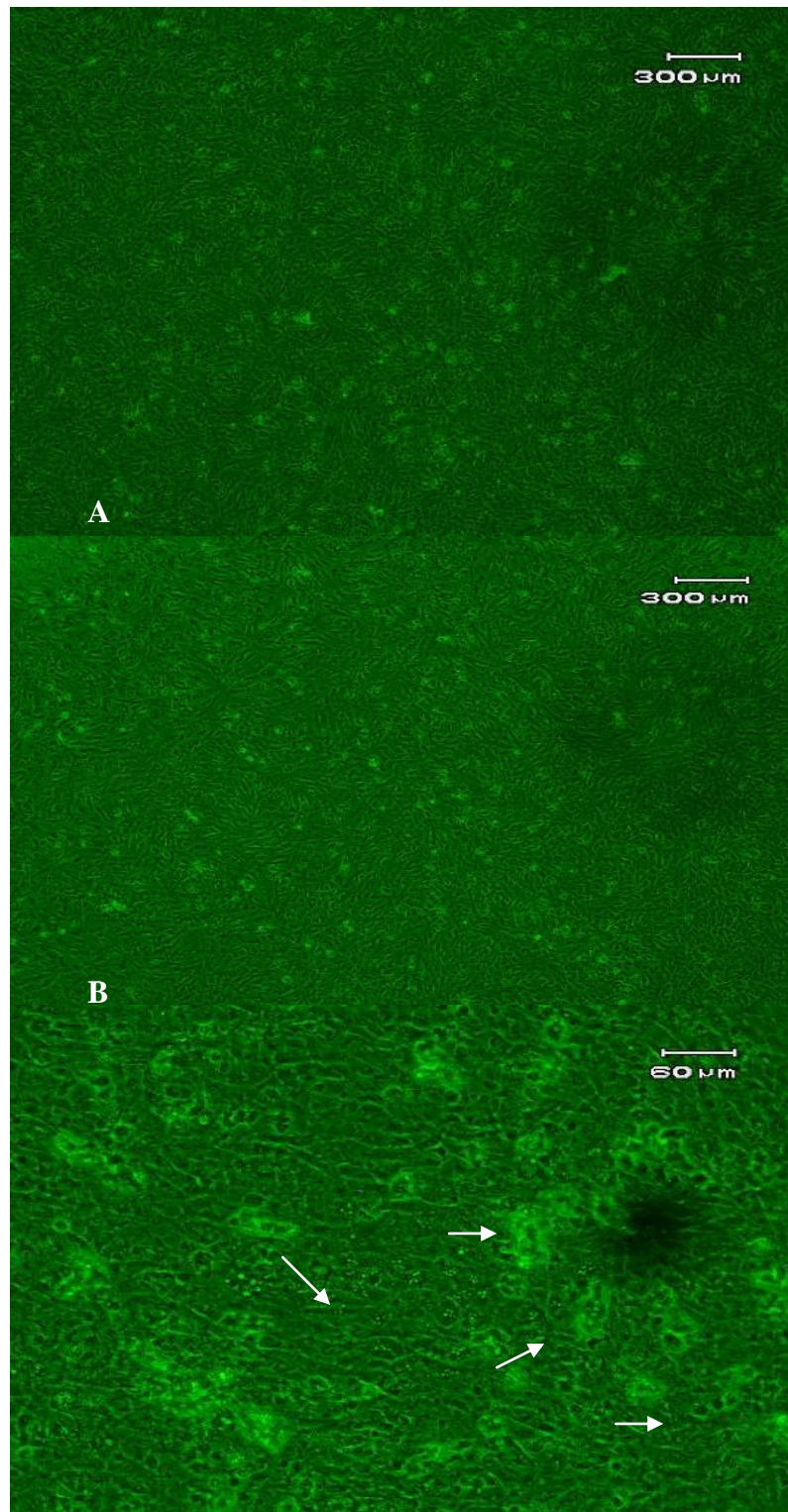


Gambar 1. Hasil uji PCR untuk deteksi KHV dari ekstrak jaringan ikan mas sakit yang digunakan untuk isolasi virus. DNA KHV tidak terdeteksi dari sampel ikan sehat (nomor 3) tapi terdeteksi pada sampel dari ikan sakit (nomor 4). 1. marker DNA 100 bp, 2. kontrol negatif, 3. ikan mas sehat, 4. ikan mas sakit, 5. kontrol positif.

Hasil pengamatan pada kultur sel, kondisi sel masih normal pada semua kultur sampai hari kelima setelah inokulasi. Adanya perubahan mulai tampak pada hari ke-6 pada kultur yang diinokulasi dengan ekstrak jaringan insang, ginjal dan gabungan organ insang, ginjal dan limpa (Gambar 2). Perubahan yang teramati antara lain terlihat adanya bakal vakuola pada kultur sel. Pada hari ke-7 sampai hari ke-10 mulai terlihat adanya kerusakan sel di beberapa tempat dengan terbentuknya vakuola yang agak besar. Setelah hari ke-11 vakuolisasi semakin membesar dan penyebarannya merata pada seluruh permukaan kultur. Vakuolisasi ini diikuti dengan terjadinya pelepasan (*detachment*) sel dari permukaan cawan kultur. Pada hari ke-14 sekitar 95% dari kultur sel mengalami *detachment*. Sampai akhir masa pengamatan (14 hari) tidak ditemukan adanya kultur sel yang menunjukkan CPE pada kultur yang diinokulasi dengan ekstrak jaringan dari otak, mata, limpa, hepatopankreas, jantung, dan usus (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil isolasi virus dari beberapa target organ pada ikan mas

No	Target Organ	Kerusakan sel (CPE)
1.	Otak	-
2.	Mata	-
3.	Insang	+
4.	Ginjal	+
5.	Limpa	-
6.	Hepatopankreas	-
7.	Jantung	-
8.	Usus	-
9.	Gabungan insang, ginjal dan limpa	+
10.	Kontrol (medium HBSS)	-



Gambar 2. Isolasi virus dengan kultur sel KT-2. (A) Kultur sel KT-2 yang diinokulasi dengan medium HBSS (kontrol). (B) Kultur sel KT-2 yang diinokulasi ekstrak jaringan tetapi tidak menunjukkan CPE. (C) Kultur sel yang diinokulasi dengan ekstrak jaringan dan menunjukkan CPE pada hari ke-7 setelah inokulasi (tanda panah menunjukkan vakuola-vakuola kecil)

Hasil pengamatan pada kultur sel yang diinokulasi dengan isolat murni (kontrol positif) dan dari hasil pasase menunjukkan CPE. CPE teramati pada hari ke-4 setelah inokulasi, tiga hari lebih cepat dari

CPE yang terjadi pada saat isolasi virus (kultur sel yang diinokulasi dengan ekstrak jaringan). CPE tersebut ditandai dengan adanya vakuola kecil di beberapa tempat, kemudian berkembang secara ekstensif. *Detachment* terjadi mulai hari ke-7. Hasil yang sama dijumpai pada pasase yang dilakukan berulang dari pasase ke-1 sampai pasase ke-3. Hasil Uji PCR dengan menggunakan primer spesifik KHV pada supernatan dan sel yang menunjukkan CPE memperlihatkan hasil positif. Hal ini menunjukkan bahwa kultur sel benar-benar terinfeksi KHV (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil uji PCR pada supernatan dan sel dari kultur yang menunjukkan CPE

No.	Pasase virus	Uji PCR	
		Sel	Supernatan
1.	Inokulasi dengan ekstrak jaringan	+	+
2.	Pasase 1	+	+
3.	Pasase 2	+	+
4.	Pasase 3	+	+

Isolasi koi herpesvirus pertama kali dilakukan dari kasus kematian masal pada budi daya ikan mas di Israel dan Amerika (Hedrick *et al.*, 2000). Meskipun penyebarannya sangat cepat, penyakit ini dilaporkan hanya menyerang pada ikan mas dan koi (Perelberg *et al.*, 2003). Di Indonesia, KHV pertama kali berhasil diisolasi dari gabungan insang, ginjal, dan limpa dari ikan koi yang berasal dari kolam yang sedang mengalami kasus kematian masal di Jawa Barat dengan menggunakan kultur sel KT-2 (Sunarto *et al.*, 2005<sup>b</sup>). CPE teramati pada hari ke-6 setelah inokulasi. Demikian halnya dengan penelitian ini, CPE mulai teramati pada hari ke-6 setelah inokulasi pada kultur yang diinokulasi dengan ekstrak jaringan dari insang, ginjal dan *pooled organ*.

Usaha isolasi virus dari otak, mata, limpa, hati, jantung, dan usus belum berhasil dilakukan, namun hal ini tidak bisa dikatakan bahwa organ-organ tersebut bukan merupakan target organ infeksi KHV. Berdasarkan uji PCR yang pernah dilakukan, selain insang, ginjal dan limpa, KHV juga terdeteksi hampir dari semua organ ikan (Hedrick *et al.*, 2000; Gray *et al.*, 2002; Gilad *et al.*, 2003; Gilad *et al.*, 2004). Meskipun Hedrick *et al.* (2005) melaporkan telah berhasil mengisolasi KHV dari berbagai organ antara lain insang, ginjal, limpa, usus, dan hati, tetapi dinyatakan juga bahwa isolasi virus dengan menggunakan kultur sel sangat sulit dilakukan. Hal seperti ini dilaporkan juga dari beberapa negara termasuk Jepang (Sano *et al.*, 2004) dan Taiwan (Tu *et al.*, 2004). Hal ini diduga karena virus KHV sangat rentan, sehingga sampel untuk keperluan isolasi virus diperlukan penanganan khusus (Gilad *et al.*, 2004).

Berdasarkan hasil riset ini, untuk keperluan diagnosis dan isolasi virus hidup, sebaiknya digunakan organ insang, ginjal atau gabungan organ (insang, ginjal dan limpa) seperti dinyatakan juga oleh Hedrick *et al.* (2000), Gray *et al.* (2002) dan Gilad *et al.* (2003). Keberhasilan isolasi virus dari sampel insang, ginjal dan gabungan sampel insang, ginjal dan limpa, mungkin disebabkan karena konsentrasi virus di insang, ginjal dan limpa sangat tinggi yaitu  $10^8$ - $10^9$  virus per  $10^6$  sel ikan (Gilad *et al.*, 2004).

Sampai saat ini belum ada obat yang efektif untuk penanggulangan wabah KHV, untuk pengendalian lebih difokuskan pada strategi pengendalian. Upaya penanggulangan harus berbasis ramah lingkungan, untuk itu upaya pencegahan dengan metode vaksinasi menjadi solusi alternatif yang bisa dilakukan. Keberhasilan dalam isolasi KHV di Indonesia dengan menggunakan kultur sel diharapkan dapat dijadikan acuan dalam program vaksinasi untuk penanggulan penyakit KHV.

## Simpulan

Koi herpesvirus berhasil diisolasi dari sampel insang, ginjal dan gabungan insang, ginjal dan limpa ikan mas dari Waduk Cirata. Hasil uji PCR dari supernatan dan sel yang memperlihatkan CPE menunjukkan bahwa CPE disebabkan oleh KHV. Untuk keperluan isolasi virus KHV disarankan menggunakan gabungan sampel dari organ insang, ginjal, dan limpa.

## Senarai pustaka

- Freshney, R. I. 1994. Culture of animal cells: A manual of basic technique. 3<sup>rd</sup> ed. Wiley-Liss. Inc. USA. 486pp
- Gilad, O., Yun S., Andree K. B., Adkison M. A., Way K., Willits N. H., Bercovier H., & Hedrick R. P. 2003. Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, the koi herpes virus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. *J. Gen. Virol.*, 84: 1-8.
- Gilad, O., Yun S., Zagmutt-Vergara F., Leutenegger CM, Bercovier H, & Hedrick RP. 2004. Concentrations of a herpes-like virus (KHV) in tissues of experimentally-infected *Cyprinus carpio koi* as assessed by real-time TaqMan PCR. *Dis. Aquat. Org.*, 60: 179-187.
- Gray, W. L., Mullis L., LaPatra S. E., Groff J. M., & Goodwin A. 2002. Detection of koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish. *J. Fish. Dis.*, 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 a common carp. *J. Aquat. Anim. Health.*, 12: 44-57.
- Hedrick, R. P., Gilad O., Yun S. C., McDowell T. S., Waltzek T. B., Kelley G. O. & Adkison M. A. 2005. Initial isolation and characterization of a herpes-like virus (KHV) from koi and common carp. *Bull. Fish. Res. Agen. Suppl. 2*: 1-7.
- Hoffman, R. W., Just J., & El-Matbouli M. 2002. Koi herpesvirus infection in koi and common carp in Germany. Abstract of 10 International Conference of the European Association of Fish Pathologist, Dublin, Germany. 131p.
- Ornamental Aquatic Trade Association (OATA). 2001. Koi Herpes Virus (KHV). OATA, Wetsbury, Wilts, UK, p.4-33
- Perelberg A., Smirnov M., Hutoran M., Diamant A., Bejerano I., & Kotler M. 2003. Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured *Cyprinus carpio* in Israel. *Isr. J. Aquacult. Bamidgeh* 55: 5-12.
- Sano M., Ito T., Kurita J., Yuasa K., Miwa S., & Iida T. 2004. Experience on common carp mass mortality in Japan. 2004. In: Lavilla-Pitogo CR & Nagasawa K. (eds.). *Transboundary fish Disease in Southeast Asia: Occurrence, Surveillance, Research and Training*. SEAFDEC Aquaculture Department, Ilo-Ilo, Philippines, 13-21.
- Sugiani D., Sunarto A., & Supriyadi H. 2005. Peran *Flexibacter columnaris* dalam kasus kematian massal ikan mas (*Cyprinus carpio*) di Indonesia. In: Supriyadi H & Priyono B. (eds). *Strategi Pengelolaan dan Pengendalian Penyakit KHV: suatu upaya dalam pembudidayaan ikan air tawar*. PRPB. DKP. 67 – 71.
- Sunarto, A. & Cameron A. 2005. Response to mass mortality of carp: an Indonesian experiences. In: Subasinghe, R. P. & Arthur J. R. (eds.). *Regional Workshop on Preparedness and Response to Aquatic Animal Health Emergencies in Asia. FAO Fisheries Proceedings. No. 4. Rome*. pp. 87-106.
- Sunarto, A., Taukhid, Rukyani A., Koesharyani I., Supriyadi H., Huminto H., Agungpriyono D. R., Pasaribu F. H., Widodo, Herdikiawan D., Rukmono D., & Prayitno S. B. 2005a. Field investigation on serious disease outbreak among koi and common carp (*Cyprinus carpio*) in Indonesia. In: Walker PJ, Lester R. G., & Bondad Reantaso M. G. (eds). *Diseases in Asian Aquaculture V*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, 125-136.
- Sunarto A., Sumiati T., Koesharyani I., Hyatt A., & Itami T. 2005b. Development of cell line from tail of koi (*Cyprinus carpio*) and isolation of koi herpesvirus from Indonesia aquaculture. Abstracts of 6<sup>th</sup> Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, 25-28 October 2005. Colombo. Srilanka. 74pp

- Tu, C., Lin S. Y., & Sung H. T. 2004. Current status of Koi herpesvirus disease in Taiwan. 2004. *In: Lavilla-Pitogo CR & Nagasawa K. (eds.). Transboundary fish Disease in Southeast Asia: Occurrence, Surveillance, Research and Training*. SEAFDEC Aquaculture Department, Ilo-Ilo, Philippines, 13-21.
- Way, K., Le Deuff R. M., Ecclestone L., Feist S. W., Dixon P. F., Wildgoose W. H., & Hedrick R. P. 2002. Isolation of a herpesvirus during disease outbreaks in adults koi carp, *Cyprinus carpio*, in the UK. *Abstract of 10<sup>th</sup> International Conference of the European Association of Fish Pathologist*, Dublin, Germany. 129p.