

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/ma>

## APLIKASI REAL TIME–QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-qPCR) DALAM KUANTIFIKASI KOI HERPES VIRUS PADA IKAN MAS (*Cyprinus carpio*)

Isti Koesharyani<sup>\*)#</sup>, Lila Gardenia<sup>\*)</sup>, Tatik Mufidah<sup>\*)</sup>, dan Ayi Santika<sup>\*)</sup>

<sup>\*)</sup> Pusat Riset Perikanan

<sup>\*)</sup> Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan

<sup>\*)</sup> Balai Budidaya Perikanan Air Tawar Sukabumi

(Naskah diterima: 7 April 2017; Revisi final: 21 Juli 2017; Disetujui publikasi: 21 Juli 2017)

### ABSTRAK

Koi Herpes Virus (KHV) di Indonesia sejak tahun 2002 merupakan penyakit mematikan yang menyerang ikan koi *Cyprinus carpio* koi dan ikan mas *Cyprinus carpio carpio*, dan sampai saat ini, infeksi KHV dilaporkan sudah menyebar hampir di seluruh dunia. Untuk mengetahui adanya infeksi KHV perlu cara diagnosa yang sangat akurat/sensitif, sehingga keberadaan KHV dapat diketahui secara pasti dengan tingkat sensitivitas yang lebih baik pada ikan budidaya. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengaplikasikan teknik deteksi dengan *real time quantitative polymerase chain reaction* (RT- qPCR/qPCR) guna mengetahui adanya infeksi KHV secara kuantitatif pada ikan mas dengan mengetahui kandungan virus (*viral load*). Sebanyak masing-masing 3 ekor sampel diperoleh dari sentra budidaya ikan mas di Cirata-Jawa Barat, Maninjau-Sumatera Barat, dan Banjarmasin-Kalimantan Selatan. Sampel-sampel tersebut selanjutnya dianalisa keberadaan KHV-nya dengan RT-qPCR menggunakan SYBR Green. Hasil pengujian menunjukkan bahwa jumlah tertinggi (*viral load*) diperoleh dari ikan mas asal Cirata-3 dengan nilai *Threshold Cycle* (Ct.) 18,24 atau setara dengan  $3,4 \times 10^7$  kopi, dan terendah dari ikan mas asal Banjarmasin-3 dengan nilai Ct. 33,39 atau  $1,8 \times 10^2$  kopi. Dua standar yang digunakan dalam pengujian ini berupa plasmid dengan jumlah kopi  $2 \times 10^4$  (Ct 27,24) dan  $2 \times 10^3$  (Ct 30,24) dan kontrol atau *Non Template Control* (NTC) adalah  $3,1 \times 10$  atau dengan nilai Ct 35,65. Uji aplikasi deteksi KHV dengan metode RT-qPCR ini memberikan hasil yang lebih sensitif, di mana sampel yang tidak terdeteksi dengan metode PCR konvensional dapat dideteksi dan dihitung jumlah kopi DNA (*DNA copy*).

**KATA KUNCI:** ikan mas; Koi Herpesvirus; *Real Time–Quantitative Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR); SYBR Green

**ABSTRACT:** *Detection of KHV in carp (Cyprinus carpio) by SYBR Green Quantitative-Real Time Polymerase Chain Reaction (Q-RT PCR). By: Isti Koesharyani, Lila Gardenia, Tatik Mufidah, and Ayi Santika*

Since 2002, Koi herpesvirus (KHV) in Indonesian has been a malignant diseases, now recognized as a worldwide cause of mortality among populations of koi *Cyprinus carpio* koi and common carp *Cyprinus carpio carpio*. To determine the presence of infection is required the KHV diagnosis method with highly accurate and sensitive, so that the existence KHV can be known exactly with high sensitivity level in fish farming. The objective of this study was to develop and evaluate the infection by Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT- qPCR/qPCR). Sample were taken from Carp culture in West Java, West Sumatra, and South Kalimantan. The assay was done by SYBR Green RT-qPCR. The analysis result of KHV in carp revealed that the carp from Cirata-3 had the highest viral load with Ct. value 18.24 equal with  $3.4 \times 10^7$  copies, and the lowest one was the carp from Banjarmasin-3 at Ct. value 33.39 ( $1.8 \times 10^2$  copies), while two standards plasmid and Non Template Control (NTC) had Ct value of 27.24 ( $2 \times 10^4$  copies), 30.24 ( $2 \times 10^3$  copies), and 35.65 ( $3.1 \times 10$  copies), respectively. Application KHV test by q-PCR has more advantages and sensitive than that of conventional PCR, and it can be used to detect and calculate the copy number of DNA.

**KEYWORDS:** *Cyprinus carpio carpio; Koi Herpesvirus; Real Time–Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-q PCR), SYBR Green*

# Korespondensi: Pusat Riset Perikanan. Gedung Balitbang KP 2, Jl. Pasir Putih 2, Ancol Timur, Jakarta Utara, Indonesia.  
Tel.: + (021) 64700928  
E-mail: [istisugama@yahoo.com](mailto:istisugama@yahoo.com)

## PENDAHULUAN

Koi Herpesvirus (KHV) pertama kali terjadi di United Kingdom (UK) pada tahun 1996, kemudian secara definitif kasus ini terjadi di Israel dan Jerman pada tahun 1998 (OIE, 2016). KHV ini selanjutnya menyebar ke beberapa negara dan dilaporkan sampai saat ini ada sekitar 28 Negara meliputi Eropa, Amerika, dan Asia (Hedrick *et al.*, 2000; OIE, 2016) dan Canada (Garver *et al.*, 2010). Di Asia kasus KHV ini ditemukan di China (Hong Kong), Chinese Taipei, Indonesia, Jepang, Korea, Malaysia, Singapore (melalui ikan yang diimpor dari Malaysia) dan Thailand (Haenen *et al.*, 2004; Ilouze *et al.*, 2011; Pikulkaew *et al.*, 2009; Sano *et al.*, 2004; Sunarto, 2004, OIE, 2016). Sedangkan di Indonesia KHV mulai terjadi di Blitar-Jawa Timur pada tahun 2002 yang selanjutnya menyebarluas ke seluruh Pulau Jawa, Bali, Sumatera Selatan, Kalimantan Timur, dan Sulawesi Tengah (Sunarto *et al.*, 2005). Gejala khas infeksi KHV ini adanya necrosis/haemorrhages/inflamasi pada insang, sirip, ekor, luka pada permukaan kulit, letargic, dan kehilangan lendir. Secara histopatologi, kerusakan virion sel yang ditandai dengan adanya vakuolasi akibat KHV ini sama seperti yang dilaporkan oleh negara yang mengalami outbreak KHV (Sunarto *et al.*, 2005, Sunarto *et al.*, 2011). Cepatnya penyebaran virus ini salah satunya disebabkan oleh transportasi perdagangan ikan mas dan koi antar daerah atau pulau di Indonesia dan total kerugian akibat adanya KHV pada tahun 2002 dan 2003 berturut-turut mencapai lebih dari US\$ 10 juta dan US\$ 15 juta (Sunarto, 2005). Ikan mas merupakan sumber protein masyarakat yang relatif murah yang dimanfaatkan untuk memenuhi gizi masyarakat di Indonesia. Sedangkan penghobi ikan hias koi yang mempunyai harga mahal dengan adanya kasus infeksi KHV ini, bisa menimbulkan kerugian yang mencapai ratusan juta rupiah. Kasus KHV ini biasanya sering terjadi pada saat perubahan musim atau pada saat suhu air rendah berkisar 18-28°C. Suhu tersebut merupakan suhu *permissive* untuk berkembangbiaknya virus KHV (Gilad *et al.*, 2004). Di Indonesia biasanya *outbreak* KHV sering terjadi pada perubahan musim. Dengan diketahuinya suhu *permissive* KHV tersebut maka pola budidaya/waktu budidaya perlu diperhatikan dengan cermat dan baik untuk menghindari infeksi KHV. Di samping itu di dalam budidaya, yang perlu diperhatikan adalah kualitas induk dan bibit yang sehat dan bebas infeksi KHV. Untuk mengetahui adanya infeksi KHV ini dapat dilakukan dengan berbagai metode atau cara. Metode diagnosis yang umum dan sudah banyak diaplikasikan adalah dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) berbasis DNA molekuler menggunakan spesifik primer KHV (Gray *et al.*, 2002; Yuasa *et al.*, 2005; Gilad *et al.*, 2002). Metode ini relatif cepat, tepat, dan sensitif dibandingkan metode lain. Diagnosa PCR merupakan

teknik perbanyak (replikasi) DNA secara enzimatik tanpa menggunakan organisme. Dalam proses amplifikasi PCR digunakan sepasang spesifik sekuen primer atau oligonukleotida. Proses PCR ini berlangsung dengan tiga tahap siklus berbasis temperatur yang berurutan yaitu *denaturation* pada suhu (94°C–95°C), *annealing* (penempelan) pasangan primer pada untai ganda DNA target pada suhu (50°C–60°C) dan pemanjangan (72°C). Dengan berkembangnya metode diagnosa, akhir-akhir ini ada metode yang lebih sensitif dibandingkan dengan PCR konvensional dan masih berbasis DNA molekuler yaitu dengan metode *Real Time Quantitative-Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR) atau sering disebut sebagai metode q-PCR. Diagnosa dengan q-PCR mempunyai keunggulan yang lebih yaitu tingkat sensitivitasnya yang lebih tinggi dan mengamplifikasi (memperbanyak) sekaligus menghitung (kuantifikasi) jumlah target molekul DNA hasil amplifikasi (Gilad *et al.*, 2004). Analisa q-PCR ini reaksinya hampir sama dengan PCR menggunakan sepasang primer dan hasilnya dapat diamati pada saat reaksi masih berlangsung, keberadaan DNA hasil amplifikasi dapat diamati pada grafik yang muncul sebagai hasil akumulasi fluoresensi dari penanda SYBR Green, di samping itu tahap elektroforesis yang menggunakan bahan karsinogenik (ethidium bromida) tidak perlu lagi dilakukan. Dengan berbagai keunggulannya yang lebih ini maka dilakukan penelitian tentang percobaan aplikasi diagnosis KHV berbasis molekuler yang lebih sensitif menggunakan Real Time-Quantitative PCR dengan SYBR Green pada budidaya ikan mas. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengaplikasikan teknik deteksi dengan *real time quantitative polymerase chain reaction* (RT- qPCR/qPCR) guna mengetahui adanya infeksi KHV secara kuantitatif pada ikan mas dengan mengetahui kandungan virus (*viral load*). Diharapkan penelitian ini dapat diaplikasikan untuk pencegahan dengan melakukan deteksi dini guna menghindari timbulnya penyakit sehingga KHV dapat ditekan penyebarannya.

## METODOLOGI

### Sampel Ikan

Sampel ikan mas “sehat” masing-masing diambil 3 ekor yang diperoleh dari lokasi budidaya jaring apung di Danau Cirata-Jawa Barat, Maninjau-Sumatra Barat, dan Banjarmasin-Kalimantan Selatan, dengan ukuran bobot berkisar antara 150-1000 g. Sampel berupa jaringan (insang) disimpan dalam larutan pengawet ethanol 95%. Untuk selanjutnya dianalisa di laboratorium. Menurut Gilad *et al.* (2004), insang, limfa, dan ginjal adalah target organ yang sangat baik untuk pengujian KHV.

### Ekstraksi DNA

Masing-masing dari sampel ikan uji diambil jaringan insang seberat  $\pm 10$  mg, dilisis/dihancurkan dalam (2 mL) mikro tube Precellys Ceramic ditambahkan 250  $\mu$ L Lysis buffer (*mole product*), kemudian di hancurkan (*stroked*) dengan alat Homogenization PeqLab dengan kekuatan 5000 rpm selama 3 menit sebanyak 3 kali, inkubasikan pada suhu 37°C selama 1 jam. Tambahkan 10  $\mu$ LRNase A (DNase & Protease Free) 10mg/mL untuk menghilangkan RNA dan protein sebagai penghambat amplifikasi, inkubasikan kembali pada suhu 37°C selama kurang dari 1 jam. Lysate (supernatan) diproses selanjutnya untuk mendapatkan DNA dalam Gen Mole secara Robotik, proses ini memakan waktu selama 45 menit, kemudian DNA di *eluted* dengan 100  $\mu$ L pelarut DNA. Selanjutnya kuantitas DNA diukur menggunakan nanodrop, dan kemurnian DNA-nya diukur pada panjang gelombang antara ( $OD_{260/280} = 1,8-2,0$ ). Di samping itu untuk memastikan mendapatkan kualitas DNA yang baik, maka dilakukan elektroforesis DNA pada 1,5% Agarose campuran (5  $\mu$ L DNA hasil ekstraksi + 4  $\mu$ L Loading Dye + 2  $\mu$ L H<sub>2</sub>O) dalam 1 x TAE (Tris-EDTA), selama 45 menit, marker yang digunakan adalah *EcoRI* + *HindIII* (546 bp–21226 bp). Hanya gambaran DNA dengan garis tegas saja yang selanjutnya digunakan dalam uji PCR dan Real-Time PCR. DNA kemudian diukur secara pasti untuk diencerkan dengan pelarut DNA atau H<sub>2</sub>O sampai menjadi 10 ng -25 ng/ $\mu$ L setiap sampel.

### Polymerase Chain Reaction (PCR) KHV

Analisa PCR konvensional KHV dilakukan menggunakan sepasang primer spesifik yaitu *Sph 1-5* dari Gray *et al.* (2002) yang telah disempurnakan oleh Yuasa *et al.* (2005). Adapun susunan sekuen primer forward: 5'gAC ACC ACA TCT gCA Agg Ag 3' dan primer reverse: 5' gAC ACA TgT TAC AAT ggT CgC 3', dengan target berat molekul 290 bp. Sedangkan konsentrasi primer yang digunakan adalah 20 pMol.

### Amplifikasi & Elektroforesis PCR

Siapkan total 10  $\mu$ L mastermix yang terdiri atas (2  $\mu$ L) 5x Green Go Taq Flexi (Promega), (1,4  $\mu$ L) 25 mM MgCl<sub>2</sub>, (0,2  $\mu$ L) 10 mM dNTP mix, (0,1  $\mu$ L) Go Taq DNA polymerase, (2  $\mu$ L) primer reverse/forward 290 bp. (20 pMol),(1  $\mu$ L) DNA *template* dan ditambahkan H<sub>2</sub>O sampai 10  $\mu$ L. Campuran selanjutnya di amplifikasi atau diperbanyak dengan mesin Speedy Cyler-Jena dengan kondisi siklus: Intial denaturasi pada suhu 94°C selama 120 detik, 40 kali: denaturasi 94°C selama 10 detik; *annealing* 63°C selama 10 detik; *extensión* 72°C selama 20 detik, selanjutnya final *extensión* 1 x dengan

suhu 72°C selama 120 detik. Hasil amplifikasi atau perbanyak DNA target selanjutnya dielektroforesis pada 2% agarose menggunakan 1 X TAE Buffer dan diamati menggunakan UV-Transilluminator.

### Real-Time Quantitative PCR-SYBR Green

Analisa *Real-Time Quantitative* PCR-SYBR Green menggunakan IQ SYBR Green Supermix 2x (Biorad). Campuran atau mastermix yang digunakan untuk setiap sampel adalah dengan total 25  $\mu$ L. terdiri atas: 12,5 IQ SYBR Green *supermix* 2x (100 mM KCL, 40 mM tris HCK, pH 8, 0,4 mM masing-masing dNTP (dATP, dGTP, dan dTTP, Taq Polymerase 50 units/mL, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, SYBR Green I, 20 nM fluorescen dan stabilizer) masing-masing 1  $\mu$ L primer reverse dan forward (20 pMol), 2  $\mu$ L DNA *template* dan ditambahkan H<sub>2</sub>O sampai dengan 25  $\mu$ L. Campuran tersebut disiapkan sesuai dengan jumlah sampel dan ditambah kontrol sampel yang terukur (20.000, 2.000 *copy DNA*) serta blank sampel atau Non Template Control (NTC). Tes dilakukan dengan dua kali pengulangan (*duplo*) untuk setiap sampel uji, selanjutnya dimasukkan dalam mesin Real-Time PCR: Rotor Gene Q 5-plex (Qiagen). Profil *Cycle condition* Real-Time PCR: Intial denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, 45 kali : denaturasi 94°C selama 30 detik; *annealing* 63°C selama 30 detik; *extensión* 72°C selama 30 detik, selanjutnya *final extensión* 1 x dengan suhu 72°C selama 7 menit. Analisa data berupa jumlah *copy DNA* dari masing-masing sampel dihubungkan dengan nilai Ct.

### HASIL DAN BAHASAN

Ikan sampel yang diperoleh dalam pengujian ini mempunyai ukuran yang bervariasi dan kondisi ikan semua terlihat 'sehat'. Sampel ikan dari Waduk Cirata berukuran sekitar (150 g), sedangkan ikan mas yang berasal dari Maninjau berukuran (300 g). Sampel ikan dari kedua lokasi Waduk Cirata dan Maninjau pada saat itu terindikasi sudah mulai terjadi kematian tetapi belum diketahui penyebabnya. Sedangkan ikan yang berasal dari Banjarmasin berukuran relatif lebih besar ( $\pm 1$  kg) yang merupakan ikan sisa wabah KHV yang masih bertahan hidup (Gambar 1).

### Ekstraksi DNA

DNA hasil ekstraksi diukur konsentrasi dan kemurniannya secara kuantitatif dengan Nanodrop pada panjang gelombang ( $OD_{260/280} = 1,8-2,0$ ), kualitas DNA hasil ekstraksi dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil ekstraksi DNA telah memenuhi syarat untuk dilakukan uji PCR selanjutnya. Sedangkan untuk kualitas DNA secara kualitatif bisa juga dilakukan dengan



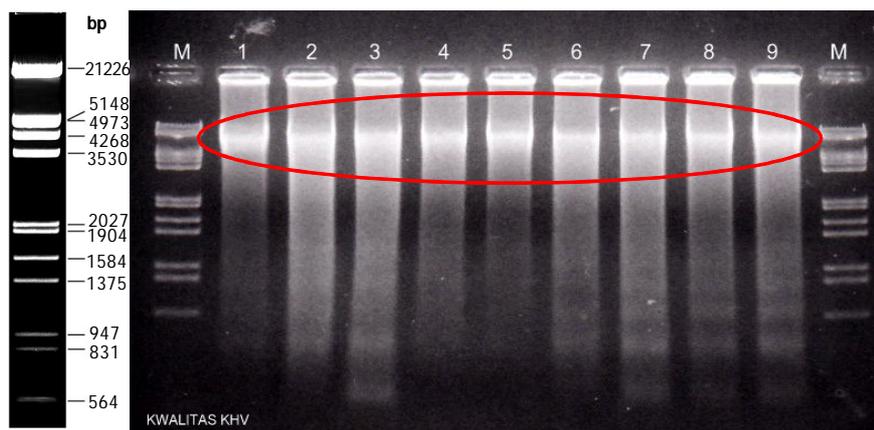
Gambar 1. Lokasi sampling di Sungai Awangbangkal di Kecamatan Karangintan, Banjarmasin, Kalimantan Selatan (A), pengambilan sampel jaringan insang (B), ikan mas yang berukuran ± 1 kg (C).

Figure 1. Sampling location in Awangbangkal River at Karangintan, Banjarmasin district South Kalimantan (A), gill tissue sampling (B), common carp with weighting 1 kg (C).

Tabel 1. Jumlah dan kualitas ekstraksi DNA dari sampel ikan mas dari berbagai daerah diukur dengan Nanodrop pada panjang gelombang (OD<sub>260/280</sub> = 1,8–2,0)

Table 1. Quantity and quality DNA carp from different area by Nanodrop at wavelength (OD<sub>260/280</sub> = 1.8–2.0)

Sampel	Quantity (ng/μL)	Quality (OD <sub>260/280</sub> )
Cirata 1	165.3	1.85
Cirata 2	225.8	1.85
Cirata 3	147.4	1.84
Banjarmasin1	133.5	1.87
Banjarmasin2	169.2	1.85
Banjarmasin3	134.0	1.82
Maninjau 1	203.4	1.84
Maninjau 2	213.4	1.88
Maninjau 3	260.2	1.85



0.5 μg/lané, 8 cm length gel, 1X TAE, 7 V/cm, 45 min

Gambar 2. Kualitas DNA ikan mas yang berasal dari berbagai daerah (M: Marker *EcoRI* + *HindIII* (564 bp-21 226 bp); (1). Cirata 1, (2). Cirata 2, (3). Cirata 3, (4). Banjarmasin 1, (5). Banjarmasin 2, (6). Banjarmasin 3, (7). Maninjau 1, (8). Maninjau 2, (9). Maninjau 3.

Figure 2. DNA quality of carp from different area (M: Marker *EcoRI* + *HindIII* (564 bp-21 226 bp); (1). Cirata 1, (2). Cirata 2, (3). Cirata 3, (4). Banjarmasin 1, (5). Banjarmasin 2, (6). Banjarmasin 3, (7). Maninjau 1, (8). Maninjau 2, (9). Maninjau 3.

mengelektroforesis DNA pada 1,5% agarose, di mana garis *band* yang terlihat tegas pada ukuran sekitar 5000 bp. Dengan marker *EcoRI* + *HindIII* (Gambar 2, dengan lingkaran merah).

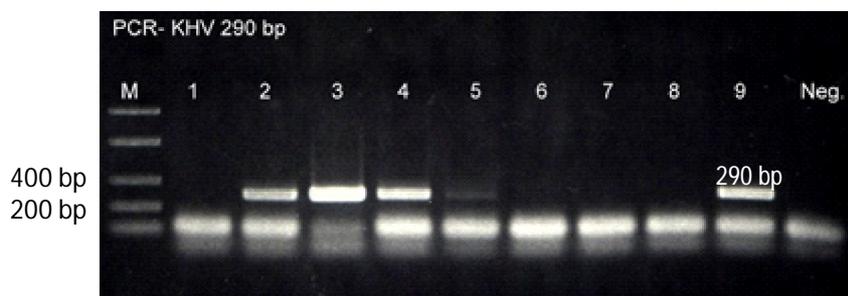
### Analisa PCR

Dari semua sampel uji ikan yang terlihat 'sehat' setelah dilakukan tes PCR konvensional ternyata ada dua sampel dari Cirata positif KHV dari tiga sampel ikan yang diuji, kondisi ini karena pada saat pengambilan sampel di daerah tersebut sudah mulai terjadi kematian tanpa diketahui penyebabnya. Kemungkinan pada saat itu infeksi virus sudah mulai terjadi walaupun belum terjadi *outbreak* yang parah, Infeksi sekunder bakteri sepertinya terlihat karena ditemukan adanya luka pada permukaan tubuh ikan dan kematian ikan yang tidak massal pada kawasan budidaya di Waduk Cirata sehingga dapat mempengaruhi kondisi ikan yang menjadi lemah sehingga infeksi virus sangat mudah masuk. Sedangkan sampel uji yang berasal dari Banjarmasin menunjukkan ada 2 ekor terlihat positif KHV, keadaan ini disebabkan ikan mas tersebut adalah *survivor* dari *outbreak* yang pernah terjadi sehingga virus KHV masih terdapat dalam tubuh ikan walau tidak mematikan karena ukuran ikan relatif besar yaitu sekitar 1 kg sehingga pertahanan diri adanya infeksi lebih baik. Tetapi keadaan ini sangat membahayakan di mana bila terjadi perubahan lingkungan terutama suhu air 23-28°C yang merupakan suhu *permissive* untuk KHV (Gilad *et al.*, 2004) dapat menjadi sumber penyakit. Akibat lanjut kondisi ini bisa menyebabkan *outbreak* dan menyebarkan virus pada suatu kawasan budidaya seperti lokasi budidaya di Karangintan di mana sepanjang sungai terdapat keramba yang membudidayakan ikan mas. Sedangkan sampel uji yang berasal dari Maninjau hanya ada satu sampel uji ikan

mas yang positif KHV, di mana di daerah tersebut merupakan daerah endemi KHV. Gambaran hasil PCR dengan spesifik primer KHV dapat dilihat pada Gambar 3.

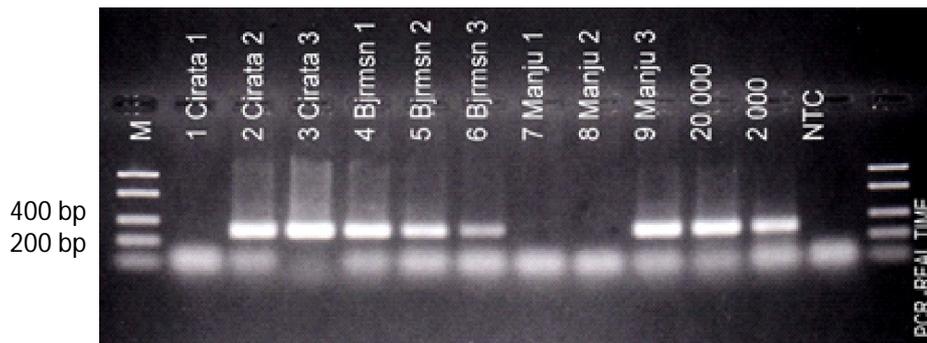
### Real-Time Quantitative PCR

Analisa dengan metode Real-Time PCR ada dua cara yaitu bisa menggunakan dye fluorescent yang berbeda seperti SYBR *Green* dan menggunakan Probe (seutas oligonukleotida yang dilabel dengan *fluorescent* tertentu). Diagnosa atau deteksi *Real-Time* yang menggunakan SYBR *Green* ternyata lebih sederhana dan murah, cepat serta sensitif dibandingkan menggunakan probe karena tidak perlu melakukan labeling oligonukleotida. Dalam melakukan analisa RT-qPCR ini syaratnya harus selalu mempunyai positif kontrol yang terukur sebagai standar, karena hasil kuantifikasi sampel uji akan selalu dibandingkan dengan positif kontrol yang terukur. Dalam uji ini sebagai positif kontrol digunakan DNA KHV yang berasal dari CEFAS England yang sudah terukur dalam satuan 20.000 *copies* dan 2.000 *copies* DNA. Hasil analisa deteksi dan kuantifikasi KHV dari berbagai daerah budidaya ikan mas, ternyata sampel yang berasal dari Banjarmasin-3 Kalimantan yang negatif pada PCR konvensional ternyata dapat terdeteksi dengan metode q-PCR dengan jumlah *viral load*  $1,8 \times 10^2$  (Ct 33,39) yang dapat dilihat dari hasil gel profil pada Gambar 4. Uji sensitivitas *Real-Time* yang pernah dilakukan pada deteksi dan sensitivitas virus udang IHHNV dan WSSV menggunakan SYBR *Green* dapat mendeteksi 100–2000 kali lebih sensitif dibandingkan dengan PCR konvensional (Dhar *et al.*, 2001). Aplikasi q-PCR menggunakan SYBR *Green* ini juga dapat digunakan untuk mendeteksi virus dan bakteri (Nam *et al.*, 2005; Granja *et al.*, 2006; Dhar *et al.*, 2001).



Gambar 3. Amplifikasi PCR menggunakan primers dengan target berat molekul 290 bp. Marker Low Range Molekul Ladder, (1). Cirata 1, (2). Cirata 2, (3). Cirata 3, (4). Banjarmasin 1, (5). Banjarmasin 2, (6). Banjarmasin 3, (7). Maninjau 1, (8). Maninjau 2, (9). Maninjau 3, dan negatif kontrol.

Figure 3. Amplification of PCR by using primers molecular target at 290 bp. Marker Low Range Molekul Ladder, (1). Cirata 1, (2). Cirata 2, (3). Cirata 3, (4). Banjarmasin 1, (5). Banjarmasin 2, (6). Banjarmasin 3, (7). Maninjau 1, (8). Maninjau 2, (9). Maninjau 3, and negative control.



Gambar 4. Hasil amplifikasi *Real-Time Quantitative* PCR-SYBR Green gambaran pada agarose gel menggunakan primers KHV dengan target berat molekul 290 bp. Marker Low Range Molekul Ladder, (1). Cirata 1, (2). Cirata 2, (3). Cirata 3, (4). Banjarmasin 1, (5). Banjarmasin 2, (6). Banjarmasin 3, (7). Maninjau 1, (8). Maninjau 2, (9). Maninjau 3, Standar 20.000 kopi, Standar 2.000 kopi dan negatif kontrol (NTC).

Figure 4. Agarose Gel profile amplified SYBR Green Real-Time by using primers molecular target 290 bp. Marker Low Range Molekul Ladder, (1). Cirata 1, (2). Cirata 2, (3). Cirata 3, (4). Banjarmasin 1, (5). Banjarmasin 2, (6). Banjarmasin 3, (7). Maninjau 1, (8). Maninjau 2, (9). Maninjau 3, Standar 20,000 copies, Standard 2,000 copies and negative control (NTC).

#### Analisa Real-Time Quantitative PCR - SYBR Green

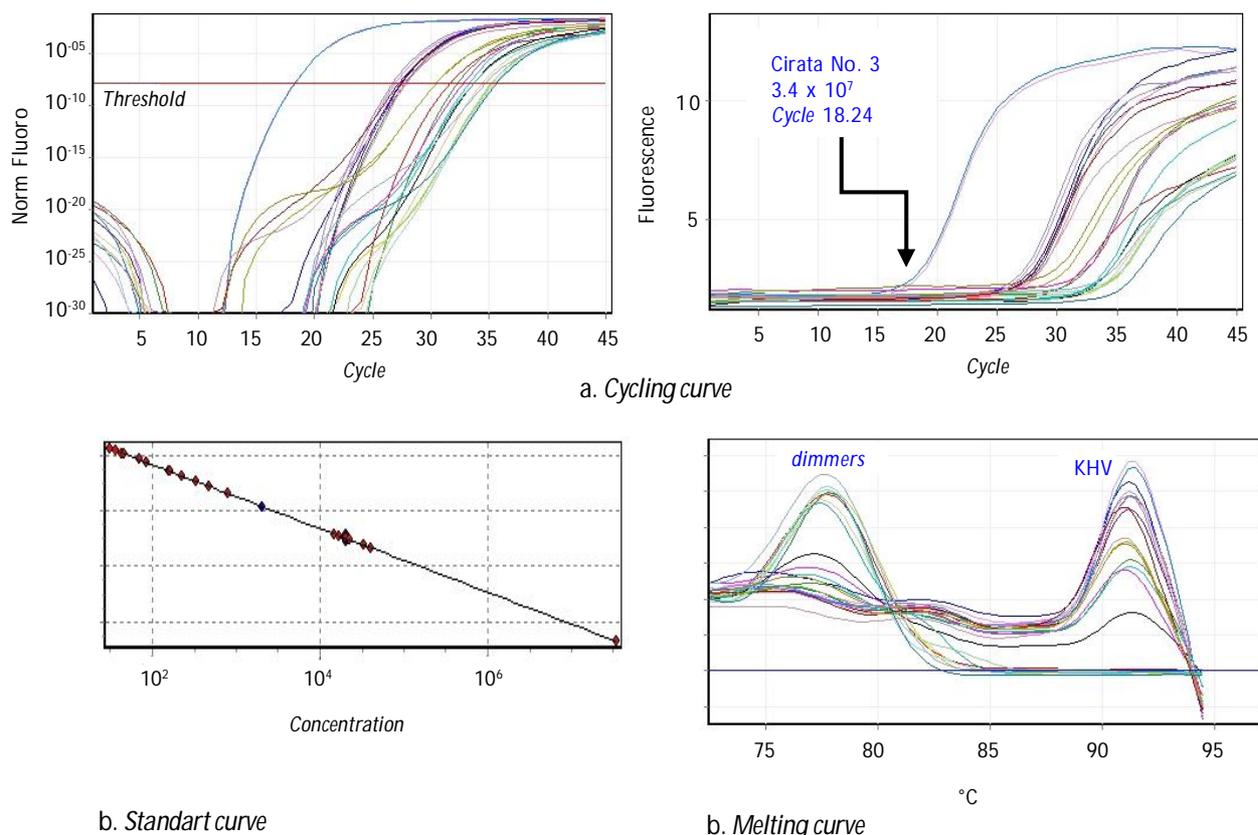
Data sampel uji setelah dianalisa dengan menggunakan *softwear* dan dibandingkan dengan standar kopi DNA yang digunakan, diperoleh grafik berupa *amplification curve*, *standart curve* dan *melting curve* (Gambar 4). Hasil pengujian ini mempunyai batas deteksi untuk seluruh sampel terendah adalah  $1,8 \times 10^2$  copies ( $Ct= 33,39$ ) sampai dengan tertinggi  $3,4 \times 10^7$  ( $Ct= 18,24$ ), dengan nilai  $R^2= 0,979$  pada nilai slop ( $Y= -2,880$ ). Di mana dilaporkan bahwa analisa dikatakan valid jika memiliki nilai koefisien ( $R^2$ ) > 0,95. Pada pengujian ini standar copies 20000 dan 2000 mempunyai nilai  $Ct$  berturut-turut 27,54 ( $2,0 \times 10^4$  copies) dan 30,24 ( $2,0 \times 10^3$  copies). Pada pengujian ini hanya menggunakan 2 standar kopi, tetapi untuk hasil yang lebih akurat sedikitnya harus menggunakan 3 standar kopi sehingga didapat nilai kurva standar yang lebih baik. Sebaiknya standar dibuat selalu baru setiap saat melakukan pengujian, standar pada pengujian dengan q-PCR ini sangat penting karena dapat mempengaruhi tingkat sensitivitas diagnosa itu sendiri (Sritunyalucksana *et al.*, 2006). Hasil analisa kuantitatif dari beberapa sampel uji ikan mas ini dapat dilihat pada Tabel 2. Analisa q-PCR ini ternyata lebih sensitif, ini dibuktikan dari data di Tabel 2 bahwa sampel dari Banjarmasin 3 terlihat positif pada analisa q-PCR tetapi pada hasil konvensional PCR hasilnya negatif. Oleh karena itu diagnosa dengan metode ini sangat baik diterapkan untuk mendeteksi adanya KHV pada taraf infeksi awal atau pada ikan karier. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Bergmann *et al.* (2009),

ada beberapa jenis ikan yang bersifat karier seperti ikan *gold fish* (*C. auratus*), *grass carp* (*Ctenopharyngodon idella*), dan *Ancistrus sp.*, hasil uji coba infeksi buatan bahwa ikan-ikan tersebut tidak bisa terinfeksi oleh KHV tetapi bisa terdeteksi adanya DNA KHV dengan menggunakan *nested-PCR*. Dalam hal ini analisa q-PCR bisa juga diaplikasikan pada ikan karier yang ada di Indonesia, seperti banyak dilaporkan bahwa ikan nila, gurame, dan ikan-ikan lain yang dibudidayakan kemungkinan menjadi karier adanya KHV. Indonesia saat ini banyak juga melakukan impor ikan koi yang kebanyakan didatangkan dari negara Asia terutama Jepang, kondisi ini harus selalu dilakukan uji adanya KHV menggunakan metode q-PCR yang lebih sensitif. Mekanisme penularan KHV bisa melalui beberapa cara seperti, paparan dengan air yang mengandung ikan yang terinfeksi berat, ikan sehat dicampur dengan ikan yang terinfeksi dan melalui penyuntikan atau perendaman supernatan kultur sel KHV (Bergmann *et al.*, 2009). Jenis KHV yang ada di Indonesia dari hasil analisa pilogenitas atau kekerabatan KHV menggunakan gen Thymidin kinase, ternyata isolat KHV yang ada di Indonesia ini kekerabatannya lebih dekat dengan isolat KHV asal Asia dari pada isolat asal Eropa (Sunarto *et al.*, 2011). Sehingga dapat disimpulkan kemungkinan penyebaran KHV ke Indonesia ini melalui lalu lintas perdagangan ikan koi terutama yang digunakan untuk pameran Internasional sehingga mekanisme penyebaran KHV yang telah disebutkan di atas bisa terjadi di Indonesia dan akhirnya KHV menyebar ke seluruh penjuru Indonesia. Secara ekonomi metode deteksi

Tabel 2. Nilai rata-rata Ct, copy DNA serta profile produk Real-Time PCR dan PCR konvensional pada agaroe dari sampel KHV ikan mas dari berbagai daerah budidaya  
 Table 2. Average Ct value of copy DNA and profile product Real-Time PCR and conventional PCR sample KHV from different carp culture area on gel agarose

Sample	CT value	Copies DNA	Gel-Profile q-PCR	Gel-Profile PCR
Cirata 1	35.17	4.5 x 10	-	-
Cirata 2	27.24	2.1 x 10 <sup>4</sup>	+	+
Cirata 3	18.24	3.4 x 10 <sup>7</sup>	+	+
Banjarmasin 1	27.85	1.5 x 10 <sup>4</sup>	+	+
Banjarmasin 2	32.46	3.9 x 10 <sup>2</sup>	+	+
Banjarmasin 3	33.39	1.8 x 10 <sup>2</sup>	+	-
Manijau 1	34.81	6.3 x 10	-	-
Manijau 2	35.05	5.2 x 10	-	-
Manijau 3	26.81	3.6 x 10 <sup>4</sup>	+	+
Standar 20 000 copies	27.54	2.0 x 10 <sup>4</sup>	+	NT
Standar 2 000 copies	30.24	2.0 x 10 <sup>3</sup>	+	NT
NTC	35.65	3.1 x 10	-	NT

NT: No Tested



Gambar 5. Kurva/grafik hasil analisa Real Time Quantitatif Polymerase Chain Reaction, (a) kurva amplifikasi dan (b) kurva standar (c) kurva melting sampel ikan mas dari berbagai daerah budidaya.

Figure 5. Analyzed curves/chart of Real Time Quantitatif Polymerase Chain Reaction, (a) amplification curve and (b) standard curve (c) melting curve carp sample from different culture area.

menggunakan qPCR ini relatif lebih mahal dibandingkan dengan PCR konvensional, akan tetapi metode ini lebih sensitif, terkuantifikasi dan terhindar dari kontaminasi silang selama proses deteksi pada proses *post* PCR.

Data-data analisa *Real-Time* disajikan dalam bentuk kurva/grafik terlihat jelas status dari masing-masing setiap sampel uji. Sampel yang mempunyai kandungan atau *loading* DNA virus terbanyak dapat dilihat garis/*line* kurva muncul di awal, seperti pada Gambar 5a, bahwa pada Ct 18,24 sudah terbentuk garissigmoid dan ini terjadi pada sampel No. 3 yang berasal dari Waduk Cirata. Sedangkan *standar curve* (Gambar 5b) dapat diketahui dari nilai R<sup>2</sup> pada 0,979 di mana di setiap titik adalah hubungan antara konsentrasi DNA dan nilai Ct. Sedangkan pada Gambar 5c berupa data *Melting curve* di mana terdapat dua puncak yang dominan. Pada uji ini puncak yang tinggi merupakan nilai *melting curve* amplifikasi untuk spesifik KHV terjadi pada suhu sekitar 91°C, ini sesuai dengan *melting* amplifikasi standar KHV yang digunakan. Sedangkan puncak *melting curve* untuk primer-dimer yang merupakan non-spesifik amplifikasi terjadi pada suhu di bawah 80°C.

## KESIMPULAN

Dengan metode qPCR ini diketahui bahwa secara kuantitatif infeksi KHV tertinggi diperoleh dari ikan mas Cirata-3 dengan nilai Ct 3,4 x 10<sup>7</sup> kopi sedangkan kuantifikasi KHV terendah diperoleh dari ikan mas asal Banjarmasin-3 dengan nilai 1,8 x 10<sup>2</sup> kopi. Metode qPCR ini lebih sensitif dibandingkan PCR konvensional di samping itu hasilnya lebih cepat diketahui karena secara *real time* bisa dilihat langsung dan terhindar dari kontaminasi silang.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada seluruhnya yang mendukung dalam pelaksanaan penelitian ini, yaitu HKI Germany yang memfasilitasi dalam melakukan ekstraksi dan pengujian DNA, kemudian team patologi BBAT, Sukabumi dalam melakukan pengujian terutama penggunaan alat *Real Time* PCR dan teman-teman patologi P4 yang membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

## DAFTAR ACUAN

Bergmann, S.M., Schütze, H., Fischer, U., Fichtner, D., Riechardt, M., Meyer, K., Schrudde, D., & Kempter, J. (2009). Detection of koi herpes virus (KHV) genome in apparently healthy fish. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 29(5), 145-152.

Dhar, A.K., Roux, M.M., & Klimpel, K.R. (2001). Detection and quantification of Infection Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus and White

Spot Virus in shrimp using Real-Time Quantitative PCR and SYBR Green chemistry. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(8), 2835-2845.

- Gilad, O., Yun, S., Andree, K.B., Adkitson, M.A., Zlotkin, A., Bercovier, H., Eldar, A., & Hedrick, R.P. (2002). Initial characteristics of koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio koi*. *Dis. Aquat. Org.*, 48, 101-108.
- Gilad, O., Yun, S., Zagmutt-Vergara, F.J., Leutenegger, C.M., Bercovier, H., & Hedrick R.P. (2004). Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio koi* as assessed by real-time TaqMan PCR. *Diseases of Aquatic Organisms*, 60, 179-187.
- Gray, W.L., Mullis, L., La Patra, S.E., Groff, J.M., & Goodwin, A. (2002). Detection of koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish. *Journal of Fish Diseases*, 25, 171-178.
- Garver, K.A., Al-Hussiney, L., Hawley, L.M., Schroeder, T., Edes, S., LePage, V., Contador, E., Russell, S., Lord, S., Stevenson, R.M.W., Souter, B., Wright, E., & Lumsden, J.S. (2010). Mass Mortality Associated With Koi Herpesvirus In Wild Common Carp In Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, 46(4), 1242-1251.
- Granja, C.B., Vidal, O.M., Parra, G., & Salazar, M. (2006). Hyperthermia reduces viral load of white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei* Diseases of Aquatic Organisms, 68, 175-180.
- Haenen, O.L.M., Way, K., Bergmann, S.M., & Ariel, E. (2004). The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 24, 293-307.
- 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.
- Ilouze, M., Davidovich, M., Diamant, A., Kotler, M., & Dishon, A. (2011). The outbreak of carp disease caused by CyHV-3 as a model for new emerging viral diseases in aquaculture: a review. *Ecol. Res.*, 26, 885-892.
- Nam, H.M., Srinivasan, V., Gillespie, B.E., Murinda, S.E., & Oliver, S.P. (2005). Application of SYBR green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 161-171.
- OIE. (2016). Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals.

- Pikulkaew, S., Meeyam, T., & Banlunara, W. (2009). The outbreak of Koi herpesvirus (KHV) in Koi (*Cyprinus carpio koi*) from Chiang Mai Province, Thailand. *Thai J. Vet. Med.*, 39, 53–58.
- Sano, M., Ito, T., Kurita, J., Yanai, T., Watanabe, N., Miwa, S., & Iida, T. (2004). First detection of koi herpesvirus in cultured common carp *Cyprinus carpio* in Japan. *Fish Pathol.*, 39, 165–167.
- Sunarto, A. (2004). Epidemiology, diagnostic and preventive practices for Koi Herpesvirus (KHV) in Indonesia. KHV: Present status and future prospects for prevention. Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo-Japan, 32 pp.
- Sunarto, A., Rukyani, A., & Itami, T. (2005). Indonesian experience on the outbreak of koi herpesvirus in koi and carp (*Cyprinus carpio*). *Bull Fish Res Agen*, 2, 15-21.
- Sunarto, A., Mccoll, K.A., Crane, M.S., Sumiati, T., Hyatt, A.D., Barnes, A.C., & Walker, P.J. (2011). Isolation and characterization of koi herpesvirus (KHV) from Indonesia: identification of a new genetic lineage. *J. Fish. Dis.*, 34, 87–101.
- Sritunyalucksana, K., Srisala, J., McColl, K., Nielsen, L., & Flegel, T.W. (2006). Comparison of PCR testing methods for white spot syndrome virus (WSSV) infections in penaeid shrimp. *Aquaculture*, 255, 95–104.
- Yuasa, K., Sano, M., Kurita, J., Ito, T. & Iida, T. (2005). Improvement of a PCR method with sph 1-5 primer set for detection of koi herpesvirus (KHV). *Fish Pathology*, 40(1), 37-39, 3.