

Examination Technique of KHV in *Cyprinus rubrofuscus* by PCR Method at BKIPM Surabaya I, East Java

Aprista Widhiya Rahmawati^{1*}, Andini Nur Setyawati¹, Rizqi Fitria Firdausi¹, Laras Mariska Dewi¹, Shafira Dwi Akmalia¹, Pratiwi Dwi Rahmawati¹, Arif Habib Fasya¹

¹Program studi Akuakultur, Fakultas Ilmu Kesehatan, Kedokteran, dan Ilmu Alam, Universitas Airlangga Banyuwangi



ARTICLE INFO

Received: June 19, 2024
Accepted: July 01, 2024
Published: July 03, 2024

*) Corresponding author:
E-mail: aprista.widhiya.rahmawati-2020@fpk.unair.ac.id

Keywords:

Virus;
PCR;
KHV;
Cyprinus;
Infectious diseases

Keywords:

Virus;
PCR;
KHV;
Cyprinus;
Penyakit infeksius.

DOI:

<http://dx.doi.org/10.56630/jago.v4i3.666>



This is an open access article under the CC BY license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Abstract

The development of koi fish production has increased, thus spurring koi fish farmers to develop their cultivation business. Along with the development of koi fish farming activities, of course there must be many problems that can interfere with the cultivation process, one of which is a disease caused by a virus. The group of viruses that often infect Koi fish (*Cyprinus rubrofucus*) is Koi Herpes Virus (KHV) which causes considerable losses. Therefore, it is necessary to check for KHV in Koi fish to prevent the spread of KHV. This activity was carried out at the Surabaya I Fish Quarantine, Quality Control, and Fisheries Product Safety Center (FQIA), East Java on June 26 to August 25, 2023. The purpose of this research activities is to find out the KHV inspection procedure and the results of the KHV inspection during the inspection process at the FQIA Surabaya I. The work method used in this research activities is a descriptive method with data collection with primary data and secondary data. Data collection is done by interview, observation, active participation and literature study. KHV examination at FQIA Surabaya I uses conventional PCR methods consisting of DNA extraction, DNA amplification, electrophoresis, and visualization of results. Based on the results of the examination during the research activities, there were 2 positive samples of KHV in Koi fish (*C. rubrofuscus*) out of 48 samples examined.

Abstrak

Perkembangan produksi ikan koi mengalami peningkatan sehingga memacu pembudidaya ikan koi untuk mengembangkan usaha budidayanya. Salah satu masalah yang dapat mengganggu proses budidaya ikan koi adalah penyakit virus. Golongan virus yang sering menginfeksi ikan koi (*Cyprinus rubrofucus*) yaitu Koi Herpes Virus (KHV) yang menyebabkan kerugian cukup besar. Oleh karena itu diperlukan pemeriksaan KHV pada ikan koi untuk mencegah persebaran KHV. Kegiatan ini dilaksanakan di Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu, Dan Keamanan Hasil Perikanan (BKIPM) Surabaya I, Jawa Timur pada tanggal 26 Juni sampai 25 Agustus 2023. Tujuan dari kegiatan ini yaitu untuk mengetahui prosedur pemeriksaan KHV dan hasil pemeriksaan KHV selama proses pemeriksaan di BKIPM Surabaya I. Metode kerja yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode deskriptif dengan pengambilan data dengan data primer dan data sekunder. Pengambilan data dilakukan dengan cara wawancara, observasi, partisipasi aktif dan studi pustaka. Pemeriksaan KHV di BKIPM Surabaya I menggunakan metode PCR konvensional yang terdiri dari tahap ekstraksi DNA, amplifikasi DNA, elektroforesis, dan visualisasi hasil. Berdasarkan hasil pemeriksaan selama penelitian ditemukan 2 sampel positif KHV pada ikan koi (*Cyprinus rubrofuscus*) dari 48 sampel yang diperiksa

Cara mensitasi artikel:

Rahmawati, A. W., Setyawati, A. N., Firdausi, R. F., Dewi, L. M., Akmalia, S. D., Rahmawati, P. D., Fasya, A. H. 2024. Examination Technique of KHV in *Cyprinus rubrofuscus* by PCR Method at BKIPM Surabaya I, East Java. *JAGO TOLIS : Jurnal Agrokomples Tolis*. 4(3): 223-233). <http://dx.doi.org/10.56630/jago.v4i3.666>

PENDAHULUAN

Kawasan perikanan berperan penting dalam meningkatkan perekonomian. Komoditas ikan hias air tawar termasuk hasil perikanan air tawar yang berkontribusi cukup besar dalam devisa negara. Hal tersebut didukung oleh data penjualan ikan hias global sebanyak 1.600 jenis dan sekitar 46% (750 jenis) bersumber dari ikan air tawar (Dahrudin, 2011). Jenis ikan hias air tawar yang cukup banyak dibudidayakan salah satunya yaitu ikan koi (*Cyprinus rubrofuscus*). Produksi ikan koi mengalami peningkatan di tahun 2019 yaitu mencapai 523.775

ekor dari total sasaran produksi sebanyak 350.000 ekor (DJPB 2019). Seiring berkembangnya industri budidaya ikan koi, tentu saja ditemukan berbagai permasalahan yang dapat menghambat budidaya (Yanuhar et al., 2019). Permasalahan yang sering muncul pada kegiatan budidaya ikan koi salah satunya penyakit. Penyakit dapat disebabkan oleh agen infeksius dan non infeksius. Virus, bakteri, parasit dan jamur merupakan beberapa contoh mikroorganisme infeksius.

Virus termasuk salah satu penyakit infeksius yang sering dijumpai di ikan koi. *Koi Herpes Virus* (KHV) merupakan penyakit virus yang paling umum menginfeksi ikan koi (Setyorini et al., 2008). KHV bersifat akut dan ganas yang dapat membunuh ikan dalam waktu singkat (Mayagi et al., 2023). KHV dapat menyebabkan 85-100% kematian pada ikan (Setyorini et al., 2008). Serangan KHV hingga saat ini masih terjadi di tempat budidaya ikan mas dan koi dan menimbulkan kerugian yang cukup besar (Yeni dkk, 2013). KHV tergolong jenis penyakit ikan karantina golongan 1 yang harus dicegah agar tidak menyebar dan menjadi endemik melalui lalu lintas hasil perikanan. Hal tersebut sesuai dengan *KEPMEN KP Nomor 17 tahun 2021 tentang Jenis Penyakit Ikan Karantina, Organisme Penyebab, Golongan, dan Media Pembawa*. Oleh karena itu, diperlukan pemeriksaan KHV pada ikan koi secara cepat dan tepat. Salah satu pemeriksaan yang dapat dilakukan yaitu dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Yuenleni, 2019). PCR merupakan metode deteksi virus secara biologi molekuler dengan cara melipat gandakan materi genetiknya (Sunandar et al., 2010).

Berdasarkan penelitian mengenai pemeriksaan virus KHV pada ikan koi dilakukan dengan metode PCR dilaksanakan di Balai Karantina Ikan dan Pengendalian Mutu (BKIPM) Surabaya I yang sudah terakreditasi secara nasional dan terakreditasi secara internasional oleh International Standard Organisation (ISO) 17025. BKIPM Surabaya I memiliki laboratorium uji level III dimana memiliki kemampuan mendiagnosa penyakit infeksius dengan teknik pemeriksaan secara biokimia, molekuler, imunologi, konvensional, histologi, dan kultur sel yang dapat dipertanggung jawabkan keakuratan dan kebenarannya dalam mengidentifikasi virus KHV tersebut sehingga nantinya dapat digunakan sebagai pengendalian penyakit infeksius KHV pada ikan koi

METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan (BKIPM) Kelas I Surabaya, Jawa Timur. Kegiatan penelitian ini juga telah dilakukan pada tanggal 26 Juni hingga 25 Agustus 2023.

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya sampel organ insang dari ikan yang terindikasi terinfeksi KHV, *GT buffer*, *silica kit*, alkohol 70%, DEPC ddH₂O, 2x PCR master mix; Primer forward (20 pMol) dan Primer reverse (20 pMol), *template DNA*, *Nuclease Free Water*; Agarose, TAE *buffer* 1X, pewarna DNA, dan DNA *marker*. Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya microtube 1,5 ml, microtube 0,2 ml, rak microtube, micropipet (10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl), *paste* penggerus, vortex, *centrifuge*, inkubator, *cooling block*, *Laminary Air Flow*, Thermal Cycler (PCR), mini spin down, *freezer*, cetakan agar (*chamber*), timbangan analitik, spatula, *combs*, *microwave*, *beaker glass*, gelas ukur, botol kaca, elektroforesis set, *power supply*, UV Transilluminator, dan *software* UV Transilluminator.

Rancangan penelitian

Metode penelitian yang digunakan yakni metode deskriptif. Metode deskriptif merupakan cara untuk menjelaskan suatu kejadian, gejala, dan data yang telah dikumpulkan tanpa berusaha menggeneralisasi atau menarik kesimpulan yang berlaku bagi semua orang (Zellatifanny dan Mudjiyanto, 2018). Tahapan teknik pemeriksaan KHV pada ikan koi dengan metode PCR di BKIPM Surabaya I, Jawa Timur meliputi proses nekropsi, ekstraksi, amplifikasi, elektroforesis, dan visualisasi hasil.

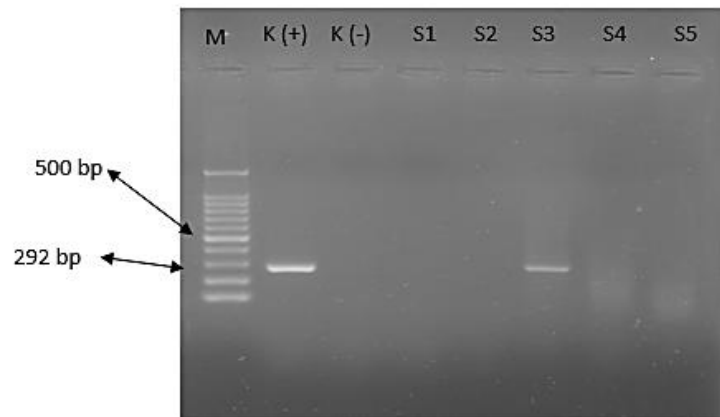
Analisis data

Hasil deteksi virus KHV pada ikan koi di Balai KIPM Surabaya I pada tanggal 26 Juni sampai dengan 25 Agustus 2023, diperoleh sebanyak 48 sampel ikan koi. Dari seluruh sampel diperoleh hasil sebanyak 2 sampel ikan koi yang teridentifikasi positif terinfeksi KHV. Identifikasi virus KHV ini dilakukan dengan metode PCR konvensional. Hasil rinci seluruh sampel yang diuji tercantum pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan KHV pada Ikan Koi dengan Metode PVR Konvensional

Tanggal	Kode Sampel	Hasil	Keterangan
26 Juni 2023	3488	-	Free
	3496	-	Free
	3539	-	Free
3 Juli 2023	3546	-	Free
	3569	-	Free
4 Juli 2023	3592	-	Free
6 Juli 2023	3624	-	Free
	3644	-	Free
10 Juli 2023	3665	-	Free
	3673	-	Free
11 Juli 2023	3700	-	Free
13 Juli 2023	3712	-	Free
	3720	-	Free
	3761	-	Free
17 Juli 2023	3774	-	Free
	3785	-	Free
18 Juli 2023	3818	-	Free
20 Juli 2023	3828	-	Free
	3836	-	Free
24 Juli 2023	3864	-	Free
	3884	-	Free
27 Juli 2023	3931	+	Infected
	3939	-	Free
31 Juli 2023	3973	-	Free
	3979	-	Free
1 Agustus 2023	3987	-	Free
	3988	-	Free
2 Agustus 2023	4023	-	Free
	4025	-	Free
3 Agustus 2023	4035	-	Free
	4041	-	Free
	4060	-	Free
7 Agustus 2023	4068	-	Free
	4074	-	Free
10 Agustus 2023	4131	-	Free
	4137	-	Free
	4152	-	Free
14 Agustus 2023	4158	-	Free
	4179	-	Free
15 Agustus 2023	4189	-	Free
16 Agustus 2023	4199	-	Free
	4211	-	Free
	4242	+	Infected
21 Agustus 2023	4249	-	Free
	4254	-	Free
	4259	-	Free
24 Agustus 2023	4280	-	Free
	4287	-	Free

Ikan koi yang dinyatakan positif KHV yaitu yang hasil visualisasinya menunjukkan ukuran *band* DNA 292 bp. Ukuran tersebut berpacu pada SNI ISO/IEC 17025:2017 yang telah digunakan sebagai acuan di Balai KIPM Surabaya I. Berdasarkan hasil visualisasi dengan bantuan UV transilluminator dapat diketahui hasil elektroforesis yang menunjukkan bahwa sampel ikan Koi yang dinyatakan positif KHV yaitu pada S3 dengan ukuran *band* DNA 292 bp, sedangkan sampel lainnya dinyatakan negatif. Hasil rinci visualisasi sampel tercantum pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil Visualisasi Positif KHV dengan Metode PCR Konvensional
M = Marker, K⁺ = Kontrol Positif KHV, K⁻ = Kontrol Negatif KHV,
S1, S2, S4 dan S5 = Sampel Negatif, S3 = Sampel Positif (292 bp).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sterilisasi Alat dan Bahan

Proses sterilisasi merupakan tahap pemusnahan segala bentuk organisme hidup, dalam hal ini mikroorganisme yang ada pada suatu benda. Proses sterilisasi melibatkan proses fisik untuk memusnahkan mikroorganisme (Putri dan Yustianara, 2023). Sterilisasi bertujuan untuk menjamin sterilitas produk maupun mutu produk, termasuk kestabilan produk yang diproduksi (Taufiq dan Najmudin, 2017).

Nekropsi

Nekropsi merupakan proses pembedahan dan pengambilan organ dari sampel yang akan digunakan untuk proses uji selanjutnya yang akan dilakukan (Rahmawati et al., 2021). Sampel yang digunakan untuk pengujian KHV adalah organ insang ikan koi. Organ insang, ginjal, otak dan hati ikan merupakan organ yang paling sering terinfeksi KHV karena memiliki prevalensi (populasi virus) yang lebih besar dibandingkan organ lainnya (Mayagi et al., 2023). Secara histopatologi, KHV menyebabkan terjadinya nekrosis pada hati, ginjal, limpa, sisik, sirip, ekor, dan ginjal serta hiperplasia dan hipertrofi sel epitel pada organ insang (Pikarsky, 2004). Sampel organ insang diambil sebanyak 20 mg dengan cara membedah ikan koi menggunakan section set. Proses tersebut dilandasi berdasarkan *Keputusan Kepala Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Nomor 32/KEP-BKIPM/2015 tentang Petunjuk Teknis Pemantauan Hama dan Penyakit Ikan Karantina, ukuran sampel yang akan diuji menentukan organ target yang akan diambil untuk diperiksa.*

Ekstraksi

Ekstraksi DNA merupakan teknik pemisahan DNA dari komponen seluler lainnya (Ariyanti dan Sianturi, 2019). Tahapan ekstraksi dimulai dari memasukkan sampel organ insang ikan koi sebanyak 20 mg kedalam microtube ukuran 1,5 ml dan melakukan lisis sampel secara fisik yaitu dengan cara menghancurkan sampel menggunakan pastle penggerus untuk memecah dinding sel dan membran sel (Nurekawati et al., 2023). Memasukkan GT Buffer 900 µl yang berfungsi untuk membantu proses lisis sel dan nukleous dapat keluar dari dalam sel (Nurekawati et al., 2023). Kemudian, melakukan sentrifugasi pada sampel dengan kecepatan

12.000 rpm selama 3 menit yang bertujuan untuk memisahkan campuran menurut berat molekul bagian penyusunnya. Supernatnya akan berada di bagian atas hasil sentrifugasi, sedangkan peletnya berada di bagian bawah (Damayanti et al., 2021). Tahap kedua yakni proses purifikasi yang dilakukan dengan cara menambahkan 40 µl silica (1 gr/ml) yang sebelumnya dicampurkan, kedalam tabung baru. Silica extraction kit merupakan suatu reagen yang terdiri dari jaringan yang diawetkan dalam larutan etanol absolut (Soelistyoadi et al., 2020). Penggunaan silica bertujuan untuk mengikat DNA (Ariyanti dan Sianturi, 2019). Memindahkan 600 µl sampel yang telah di centrifuge pada bagian atas larutan ke dalam microtube ukuran 1,5 ml yang telah berisi silica sebanyak 40 µl (1 gr/ml). Sampel kemudian di vortex hingga merata. Sampel di centrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 detik untuk memisahkan partikel berdasarkan berat molekulnya sehingga dapat diketahui supernatant dan pelet (Iqbal et al., 2016).

Tahap ketiga yakni pembuangan larutan atas dengan cara mencuci pelet silica dengan 500 µl GT *Buffer* yang bertujuan untuk mencuci DNA agar terpisah dari pengotor (Utami et al., 2013). Larutan buffer berfungsi untuk mempertahankan struktur DNA selama prosedur lisis dan pemurnian (Iqbal et al., 2016). Pelet silica di vortex hingga terlarut, kemudian di *centrifuge* dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 detik dan larutan atas dapat dibuang. Tahap keempat yaitu proses presipitasi yang dilakukan dengan cara mencuci pelet silica menggunakan 1 ml etanol 70% yang bertujuan untuk membersihkan DNA dari pengotor-pengotornya (Kurniawati et al., 2019). Sampel di vortex pelet silica hingga terlarut semua, kemudian di centrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 detik dan buang etanol hingga kering. Tahap terakhir yakni pelarutan dengan menambahkan 400 µl DEPC ddH₂O kedalam pelet silica untuk mencegah rusaknya struktur RNA dan menonaktifkan aktivitas enzim RNAase (Kurniawati et al., 2019). Sampel kemudian di vortex sampai pelet silica terlarut sempurna. Sampel diinkubasi pada suhu 55°C selama 10 menit. Setelah itu, sampel di vortex dan di *centrifuge* dengan kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit. Memindahkan 200 µl larutan atas kedalam microtube ukuran 1,5 ml baru, dan larutan siap untuk tahap reaksi. Uji kualitas dan kuantitas DNA hasil ekstraksi dengan menggunakan spektrofotometer. Hasil ekstraksi DNA yang memenuhi syarat mutu siap untuk dilakukan tahap reaksi amplifikasi.

Amplifikasi

Amplifikasi merupakan proses memperbanyak DNA target secara eksponensial sehingga dapat dianalisis dengan elektroforesis. Amplifikasi dapat menghasilkan jutaan molekul DNA selama 30-40 siklus dengan tiap satu kali siklus menghasilkan 2 DNA (Fitriatin dan Manan, 2015). Proses amplifikasi diawali dengan pembuatan master mix (reagen amplifikasi) yang dimasukkan pada microtube 1,5 ml yang dilakukan di PCR Work Station yang telah dilengkapi lampu UV sehingga kondisi lingkungan steril dan mencegah adanya kontaminasi. Pembuatan master mix dengan cara menghitung jumlah volume yang akan dibuat. Langkah pertama yakni memasukkan primer forward (20 pMol) sebanyak 0,75 µl dengan susunan basa nitrogen 5'-GAC-ACC-ACA-TCT-GCA-AGG-AG-3' dan primer reverse (20 pMol) sebanyak 0,75 µl dengan susunan basa nitrogen 5'-GAC-ACA-TGT-TAC-AAT-GGT-CGC-3'.

Master mix tersebut digunakan karena telah di design komplemen dengan basa nukleotida sesuai dengan yang dimiliki KHV. Tujuan primer adalah untuk membatasi jumlah fragmen DNA target yang akan di amplifikasi (Handoyo dan Rudiretna, 2000). Langkah kedua yaitu memasukkan reagen 2X PCR Master Mix sebanyak 12,5 µl. 2X PCR Master Mix merupakan reagen yang mengandung beberapa senyawa yang berperan penting dalam proses amplifikasi yaitu Taq polymerase, dNTPs (*deoxyribonucleotide triphosphates*), MgCl₂ dan *buffer*. Enzim Taq polymerase berfungsi sebagai katalisator pada reaksi polymerase DNA serta membantu pelekatan DNA pada primer (Wijaya, 2016). dNTPs bertindak sebagai building block DNA yang diperlukan pada proses pemanjangan untai DNA dengan cara menempel pada gugus -OH primer dan membentuk untai baru yang komplemen dengan DNA template. *Buffer* dan MgCl₂ berfungsi sebagai larutan stabilisasi ion dan sebagai kofaktor yang dapat meningkatkan aktivitas DNA Polymerase (Handoyo dan Rudiretna, 2000). Langkah ketiga yaitu memasukkan *Nuclease Free Water* sebanyak 7 µl. *Nuclease Free Water* berfungsi sebagai pelarut DNA (Yusiati,

2014). Tahap berikutnya yaitu memasukkan template DNA sebanyak 4 μ l. Kemudian, dimasukkan ke dalam Thermal Cycler untuk tahap amplifikasi dan mengatur mesin dengan memilih jenis virus yang akan diperiksa.

Total siklus dari tahap ekstraksi yaitu sebanyak 35 siklus yang dapat menghasilkan berjuta-juta DNA. Setiap siklus amplifikasi terdiri atas 3 tahapan reaksi yang berlangsung dalam 1-2 menit antara lain denaturasi, annealing, dan extension. Denaturasi merupakan proses pengubahan DNA target dari DNA beruntai ganda (*double-stranded DNA*) menjadi beruntai tunggal (*single-stranded DNA*) (Mayagi et al., 2023). Proses denaturasi DNA KHV menggunakan suhu 94°C selama 30 detik. Hal tersebut sejalan dengan pernyataan Handoyo dan Rudiretna (2000) tergantung pada panjang cetakan DNA dan fragmen DNA target, suhu dan waktu denaturasi berkisar antara 93-85°C selama 30-90 detik. Efisiensi PCR akan menurun jika suhu denaturasi terlalu tinggi, dan cetakan DNA mungkin rusak. Sebaliknya, suhu yang terlalu rendah dapat menyebabkan denaturasi parsial pada cetakan DNA.

Annealing merupakan proses menempelkan primer pada DNA untai tunggal. Primer dilekatkan pada dasar dan ujung setiap DNA untai tunggal komplementer sehingga berdekatan dengan daerah tertentu dari rangkaian DNA target (Mayagi et al., 2023). Proses Annealing di Balai KIPM Surabaya I dilakukan dengan pemanasan pada suhu 55°C selama 30 detik. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Zedta dan Setyadi (2019) bahwa waktu annealing yang biasa digunakan dalam PCR adalah 30-45 detik. Suhu annealing optimal dari primer yang digunakan untuk DNA KHV yaitu pada suhu 55°C (Novita et al., 2020).

Extention merupakan proses pemanjangan primer dengan bantuan enzyme polymerase. Dua DNA untai Tunggal baru yang saling melengkapi dengan urutan DNA target akan terbentuk pada akhir prosesnya (Mayagi et al., 2023). Proses extantion menggunakan pemanasan dengan suhu 72°C selama 60 detik. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Novita et al. (2020) suhu extation yang optimal yaitu pada suhu 72°C dengan waktu 1 menit.

Elektroforesis

Pembuatan larutan TAE Buffer 1X

Tris-acetate-EDTA *buffer* (TAE *buffer*) merupakan larutan penyangga yang biasa digunakan dalam elektroforesis (Masek et al., 2005). TAE Buffer 1X digunakan sebagai bahan pembuatan gel agarose dan merendam gel agarose saat perlakuan elektroforesis. Pembuatan TAE *Buffer* 1X sebanyak 500 ml dibuat dengan cara mencampurkan TAE *buffer* 10X 50 ml dengan 450 ml aquades steril, kemudian dihomogenkan.

Pembuatan gel agarose 1,5%

Konsentrasi agarose yang digunakan di Balai KIPM Surabaya I yaitu 1,5%. Pembuatan gel agarose diawali dengan penimbangan 1,8 gram omnipure agarose dan meletakkannya pada beaker glass. Mengukur TAE *Buffer* 1X sebanyak 120 ml dan memasukkannya pada beaker glass yang sudah terisi oleh omnipure agarose, kemudian dihomogenkan. Selanjutnya larutan tersebut dipanaskan hingga mendidih menggunakan microwave selama 4 menit. Setelah dipanaskan, larutan tersebut ditambahkan pewarna DNA sebanyak 5 μ l, kemudian dihomogenkan. Larutan agarose tersebut dituangkan kedalam cetakan (*chamber*) yang telah dipasang sisir (*chomb*) dan baki, kemudian didiamkan hingga memadat dan cukup dingin.

Elektroforesis sampel

Elektroforesis merupakan metode pemisahan fraksi suatu zat, yang didasarkan pada migrasi partikel bermuatan atau ion mikromolekul, dibawah pengaruh medan listrik dengan media gel agarose (Slamat et al., 2012). Prinsip dari elektroforesis yaitu makromolekul bermuatan listrik ditempatkan dalam media yang mengandung energi listrik. Berdasarkan muatan yang terkandung, molekul-molekul ini akan bermigrasi menuju kutub positif atau negatif. Bergantung pada muatan yang dibawahinya, molekul-molekul ini akan bergerak ke arah positif atau negatif. Sebuah molekul dengan bermuatan negatif (anion) bergerak menuju kutub positif, dan sebuah molekul dengan bermuatan positif (kation) bergerak menuju kutub negatif. Ukuran molekul DNA, kepadatan gel yang dilaluinya, dan arus listrik yang digunakan

untuk menggerakkan molekul DNA semuanya mempengaruhi seberapa cepat mereka bermigrasi. Migrasi DNA terjadi lebih lambat saat semakin kecil ukurannya dan semakin tinggi proporsinya. Semakin besar arus yang diterapkan, semakin cepat migrasi DNA. Apabila elektroforesis selesai maka hasil dapat terdeteksi melalui band yang terbentuk (Artati, 2013).

Tahapan proses running elektroforesis yaitu meletakkan gel agarose 1,5% yang sudah memadat kedalam tangki elektroforesis dengan posisi sumur berada pada kutub anoda. Menambahkan TAE *buffer* 1X ke dalam tangka elektroforesis hingga gel agarose terlihat sudah terendam sempurna. Memasukkan DNA marker sebanyak 5 μ l ke sumur paling tepi pada gel agarose sebagai penanda berat molekul DNA target. *Marker* berfungsi sebagai penanda atau acuan nilai bp (*basepare*), yang mana setiap garis putih *marker* bernilai 100. Sundari dan Priadi (2019) menambahkan bahwa untuk mengetahui perkiraan ukuran DNA sampel, DNA *marker* juga berfungsi sebagai pembanding. Memasukkan produk amplifikasi PCR kontrol positif, kontrol negatif dan sampel uji dengan urutan ke dalam sumur masing-masing sebanyak 8 μ l. Tangki elektroforesis ditutup dan dihubungkan pada *power supply*. Mengatur elektroforesis dengan voltase 120 volt dan dengan waktu 40 menit.

Visualisasi Hasil

Visualisasi hasil dilakukan setelah proses running elektroforesis. Visualisasi hasil dilakukan dengan menggunakan UV Transilluminator untuk visualisasi hasil pita band DNA sampel dengan sinar UV. Berdasarkan visualisasi hasil, didapatkan bahwa ikan koi yang diperiksa dinyatakan positif KHV. Hasil visualisasi menunjukkan ukuran band DNA 292 bp. Ukuran tersebut berpacu pada SNI ISO/IEC 17025:2017 yang telah digunakan di Balai KIPM Surabaya 1 hingga saat ini. Berdasarkan hasil visualisasi dengan bantuan UV transilluminator dapat diketahui hasil elektroforesis yang menunjukkan bahwa sampel Ikan Koi yang dinyatakan positif KHV yaitu pada S3 dengan ukuran band DNA 292 bp, sedangkan sampel lainnya dinyatakan negatif. Berdasarkan data yang terlampir terdapat 2 dari 48 Sampel ikan koi yang dinyatakan positif KHV selama dilakukan pemeriksaan. Data tersebut menunjukkan bahwa infeksi dari KHV di daerah Jawa Timur masih tergolong rendah.

KESIMPULAN

Pemeriksaan Koi Herpes Virus pada *Cyprinus rubrofasciatus* di Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Surabaya 1 dilakukan dengan metode PCR yang meliputi beberapa tahap yaitu: nekropsi, ekstraksi, amplifikasi, elektroforesis dan visualisasi hasil. Hasil pemeriksaan sampel *C. rubrofasciatus* yang diuji Koi Herpes Virus selama periode 26 Juni 2023 hingga 25 Agustus 2023 dapat disimpulkan bahwa terdapat 2 sampel ikan koi yang menunjukkan hasil positif terinfeksi KHV, sedangkan 48 sampel lainnya menunjukkan hasil negatif atau tidak terinfeksi KHV.

DAFTAR PUSTAKA

- Alim, S. dan Muahiddah, N. 2023. Analisis Kelayakan Usaha Pembudidayaan Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) di Balai Benih Ikan (Bbi) Batu Kumpang, Kecamatan Lingsar. Indonesian Journal Of Aquaculture Medium, 3(2): 58-66. <https://doi.org/10.29303/mediaakuakultur.v3i2.2638>
- Anshary, H. 2011. Identifikasi Molekuler dengan Teknik PCR-Rflp Larva Parasit *Anisakis* Spp (Nematoda: Anisakidae) Pada Ikan Tongkol (*Auxis Thazard*) dan Kembung (*Rastrelliger Kanagurta*) dari Perairan Makassar. Jurnal Perikanan Universitas Gadjah Mada, 13(2): 70-77. <https://doi.org/10.22146/jfs.3064>
- Aprianto, S. dan Prasetyo, E. 2020. Identifikasi dan Prevalensi Virus KHV (*Koi Herpes Virus*) Pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) dengan Menggunakan Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Jurnal Borneo Akuatika, 2(1): 48-60. <https://doi.org/10.35800/jplt.6.2.2018.21521>
- Ariyanti, Y. dan Sianturi, S. 2019. Ekstraksi DNA Total Dari Sumber Jaringan Hewan (Ikan Kerapu) Menggunakan Metode Kit For Animal Tissue. Journal of Science and Applicative Technology, 3(1): 40-45. <https://doi.org/10.35472/jsat.v3i1.111>

- Artati, D. 2013. Sensitivitas Gel Red Sebagai Pewarna RNA Pada Gel Elektroforesis. *Balitbang Teknik Akuakultur*, 11(1): 11-14. <http://dx.doi.org/10.15578/blta.11.1.2013.11-14>
- Arthur J. R., M. G. Bondad-Reantaso and R. P. Subasinghe. 2008. Procedures for the Quarantine Of Live Aquatic Animals: A Manual. FAO Fisheries Technical Paper, 502: 74p.
- Dahlia, D., Syahriadi, K. dan Mega, D. A. U. 2022. Perseptif Finansial Penambahan Tepung Spirulina sebagai Sumber Karotenoid dalam Pakan Juvenil Ikan Koi (*Cyprinus carpio*). *Agrokompleks*, 22(1): 51-57. <https://doi.org/10.51978/japp.v22i1.469>
- Dahrudin, H. 2011. Ikan Botia Maskotnya Ekspor Ikan Hias Asli Indonesia. *Fauna Indonesia*. 1(1): 17-21.
- [DJPB] Direktorat Jendral Perikanan Budidada. 2018. Laporan Indikator Kinerja Triwulan I. Jakarta (ID). Direktorat Jendral Perikanan Budidaya
- [DJPB] Direktorat Jendral Perikanan Budidada. 2019. Laporan Indikator Kinerja Triwulan I. Jakarta (ID). Direktorat Jendral Perikanan Budidaya.
- Damayanti, R., Fatiqin, A. dan Trismawanti, I. (2021). Teknik Ekstraksi Jaringan DNA Ikan Sidah (*Anguilla* sp.) di BRPPUPP Palembang. In *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi Terapan*, 4(1): 309-319).
- Faezan, I., Kurniawati, K., Rahmawati, A. dan Septian, I. G. N. 2023. Pengaruh Pemberian Minyak Hati Ikan pada Pakan Buatan dengan Dosis yang Berbeda terhadap Pertumbuhan Benih Ikan Koi (*Cyprinus carpio*). *Al-Aqlu: Jurnal Matematika, Teknik dan Sains*, 1(1): 46-50. <https://doi.org/10.59896/aqlu.v1i1.10>
- Fathoni, M. Z., Rahmania, R. N. R. Zakiyatul, R., M. Hamzah dan A. Fitriyah. 2019. Proses Pembuatan dan Pemanfaatan Limbah Tulang Ikan Binggul Menjadi Kerupuk Tuibee di Desa Daun Dusun Daun Barat Club Syebhen Star Sangkapura Pulau Bawean. *Journal of Community Service*, 1(1) : 18-34. <http://dx.doi.org/10.30587/dedikasimu.v1i1.1091>
- Handoyo, D. dan Rudiretna, A. 2000. Prinsip Umum dan Pelaksanaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Unitas*, 9(1): 17-29.
- Heri, H. Nasution & H. S. Pratiw. 2003. *Diagnosis Penyakit Akibat Infeksi Virus Certainty Factor*, Pp. 1-6.
- Husna, N., Kenconoajati, H., Ulkhaq M. F. dan Habib, A. 2020. Pemeriksaan Tilapia Lake Virus (Tilv) pada Komoditas Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Journal Of Aquaculture*, 5(2): 77-87. [10.31093/joas.v5i2.95](https://doi.org/10.31093/joas.v5i2.95)
- Hutoran, M., A. Ronen, A. Perelberg, M. Illouze, A. Dishon, I. Bejerano, N. Chen, M. Kotler. 2005. Description of an as Yet Unclassified DNA Virus from Diseased *Cyprinus carpio* Species. *Journal of Virology*, 79(4): 1983-1991. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.4.1983-1991.2005>
- Iqbal, M., Buwono, I. D., dan Kurniawati, N. 2016. Analisis Perbandingan Metode Isolasi DNA Untuk Deteksi *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) Pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Perikanan Kelautan*, 7(1): 54-65.
- Khofifah, A., Abida, I. W. dan Khusna, A. 2023. Pemeriksaan WSSV (White Syndrome Virus) Dengan Uji PCR (*Polymerase Chain Reaction*) Pada Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*) di UPT Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan, Pasuruan Jawa Timur. *Juvenil: Jurnal Ilmiah Kelautan Dan Perikanan*, 4(2): 142-151. [10.21107/juvenil.v4i2.16462](https://doi.org/10.21107/juvenil.v4i2.16462)
- Kilawati, Y., Kartikasari, D. P. P., Bhawiyuga, A., Maimunah, Y. dan Muttaqin, A. 2021. Memanfaatkan Internet of Aquaculture dalam Meningkatkan Kualitas Produksi pada Kelompok Pembudidaya Ikan Koi di Blitar. *Journal of Innovation and Applied Technology*, 7(2): 1321-1325.
- Kurniaji, A., Renitasari, D. P., Yunarty, Y. dan Anton, A. 2022. Gejala Klinis dan Perubahan Tingkah Laku Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang Terinfeksi Koi Herpesvirus (KHV). *Jurnal Salamata*, 3(1): 13-19. <http://dx.doi.org/10.15578/salamata.v3i1.11258>
- Kurniawati, M. D., S. Sumaryam dan I. Hayati, I. 2019. Aplikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Konvensional Dan Real Time-Pcr Untuk Deteksi Virus VNN (*Viral Nervous Necrosis*) Pada Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Techno-Fish*, 3(1): 19-30.

- Linnaeus, C. (1758). *Systema Naturae Per Regna Tria Naturae, Secundum Classes, Ordines, Genera, Species, Cum Characteribus, Differentiis, Synonymis, Locis. Editio Decima, Reformata* [10th Revised Edition], Vol. 1: 824 Pp.
- Masek, T., Vopalensky, V., Suchomelova, P. and Pospisek, M. 2005. Denaturing RNA Electrophoresis in TAE Agarose Gels. *Analytical biochemistry*, 336(1): 46-50. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.09.010>
- Mayagi, J., Kotta, R., Kurniawati, K. dan Septian, I. G. N. 2023. Studi Identifikasi Virus KHV (*Koi Herpes Virus*) Pada Ikan Koi (*Cyprinus carpio*). *Al-Aqlu: Jurnal Matematika, Teknik Dan Sains*, 1(2): 91-98. <https://doi.org/10.59896/aqlu.v1i2.24>
- McCleary, S., Ruane, N. M., Cheslett, D., Hickey, C., Rodger, H. D., Geoghegan, F. and Henshilwood, K. 2011. Detection of Koi Herpesvirus (KHV) in Koi Carp (*Cyprinus carpio* L.) Imported into Ireland. *Fish Pathol.*, 31(3): 124-128. <http://hdl.handle.net/10793/952>
- Meslilesi, M. I., Anra, H. dan Pratiwi, H. S. 2017. Penerapan Augmented Reality Sebagai Media Pembelajaran Virus Dalam Mata Pelajaran Biologi Kelas X SMA (Studi Kasus: SMA Negeri 7 Pontianak). *JUSTIN (Jurnal Sistem Dan Teknologi Informasi)*, 5(2): 80-84.
- Novita, H., Sugiani, D., Taukhid, T. dan Sumiati, T. 2020. Duplex Polymerase Chain Reaction untuk Deteksi Simultan Koi Herpesvirus dan *Aeromonas Hydrophila* Pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *Jurnal Riset Akuakultur*, 15(1): 59-67. <http://dx.doi.org/10.15578/jra.15.1.2020.59-67>
- Nurekawati, A. D., I. S. Putra dan R. N. Soelistyoadi. 2023. Deteksi Molekuler Tilv (*Tilapia Lake Virus*) Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) yang Dilalulintaskan di Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu Dan Keamanan Hasil Perikanan Surabaya I Jawa Timur. *E-Jurnal Unair*, 1(1): 1-12. [10.20473/mkh.v34i1.2023.1-12](https://doi.org/10.20473/mkh.v34i1.2023.1-12)
- Panduhariana, U. Y. 2019. Studi Kejadian Ektoparasit Pada Pembesaran Ikan Bawal Bintang (*Trachinotus blochii*) Di Balai Layanan Usaha Produksi Perikanan Budidaya (BLUPPB) Karawang, Jawa Barat. *Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia*, 7(1): 46-54. <https://doi.org/10.36706/jari.v7i1.9026>
- Pertiwi, N. P. D. dan N. L. Watiniasih. 2015. Optimasi Amplifikasi DNA Menggunakan Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) Pada Ikan Karang Anggota Famili Pseudochromidae (Dotyback) untuk Identifikasi Spesies secara Molekular. *Jurnal Biologi Udayana*, 19(2): 1-5. <https://doi.org/10.24843/JBIOUNUD.2015.vol19.i02.p01>
- Pikarsky, E., Ronen, A., Abramowitz, J., Levavi-Sivan, B., Hutoran, M., Shapira, Y. and Kotler, M. 2004. Pathogenesis of Acute Viral Disease Induced in Fish by Carp Interstitial Nephritis and Gill Necrosis Virus. *Journal of virology*, 78(17): 9544-9551. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.17.9544-9551.2004>
- Putri, P. K. P. D. dan Yustiantara, I. P. S. 2023. Efektivitas Sterilisasi Dengan Ozon (O3) Pada Peralatan Laboratorium sebagai Upaya Penjaminan Kualitas dan Mutu. *Journal Scientific Of Mandalika (Jsm)*, 4(5): 62-70. <https://doi.org/10.36312/10.36312/vol4iss5pp62-70>
- Quynh, L. T., Nguyen, N. T. T., Phu, H. V. and Tuan, H. A. 2020. Morphological Characteristics for Classification of genus *Cyprinus linnaeus*, 1758 in Phong nha-ke Bang National Park in the North Central part of Vietnam. *Studia Universitatis Moldaviae (Seria Ştiinţe Reale şi ale Naturii)*, 131(1): 140-148. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3954017>
- Rahardja, U., E. P. Harahap Dan S. Pratiwi. 2018. Pemanfaatan Mailchimp Sebagai Trend Penyebaran Informasi Pembayaran Bagi Mahasiswa Di Perguruan Tinggi. *Technomedia Journal*: 2(2): 41-54. <https://doi.org/10.33050/tmj.v2i2.323>
- Rahmawanti, A., Setyowati, N.D. Mukhlis, A. 2021. Histopatological Of Brain, Eye, Liver, Spleen Organs of Grouper Suspected VNN In Penyambuan Village, North Lombok. *Journal Biology Tropis*, 21(1): 140 – 148.
- Ristiyawan, B., S. Anggoro Dan B. Yulianto. 2013. Peranan Implementasi Kebijakan Karantina Ikan dalam Pembangunan Perikanan Berkelanjutan. In *Prosiding Seminar Nasional Pengelolaan Sumberdaya Alam dan Lingkungan*, Semarang: Universitas Diponegoro, 6-12.

- Saragih, M. Dan Junaidi. 2021. Deteksi Penyakit TILV (*Tilapia Lake Virus*) Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Dengan Metode RT-PCR di Balai KIPM Medan I. *Jurnal Perikanan Unram*, 11(2): 186-194. <https://doi.org/10.29303/jp.v11i2.254>
- Saselah, J., E. O. Langi dan F. Hatimanis. 2019. Potensi Budidaya Ikan Air Tawar di Kabupaten Kepulauan Sangihe. *Jurnal Ilmiah Tindalung*, 5(2): 43-48. <https://doi.org/10.5281/jit.v5i2.254>
- Setyorini, N., Khusnah, A., Widajatiningrum, L. dan Bangil, M. T. L. P. B. 2008. Kelangsungan Hidup Ikan Koi (*Cyprinus carpio* Koi) Yang Terinfeksi Khv (*Koi Herpesvirus*). *Berkala Ilmiah Perikanan*, 3(1): 57-65.
- Slamat, S., Marsoedi, M., Mursyid, A. dan Arfiati, D. 2016. Konservasi genetik ikan betok (*Anabas testudineus* Bloch 1792) di perairan rawa, Kalimantan Selatan. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*, 18(1): 9-15. <http://dx.doi.org/10.15578/jppi.18.1.2012.9-15>
- Soelistyoadi, R. N., Nurekawati, A. D. dan Setyawati, D. 2020. Morfologi dan Sekuensing DNA *Myxobolus koi* yang Menginfeksi Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) di Kabupaten Blitar. *Journal Of Aquaculture*, 5(1): 155-169. <https://doi.org/10.31093/joas.v5i1.89>
- Sudana, I. W. 2019. Analisis Efisiensi Pemasaran Ikan Teri Segar Hasil Tangkapan Nelayan Di Desa Sangalangit Kabupaten Buleleng. *Jurnal Pendidikan Ekonomi Undiksha*, 11(2): 637-648. <https://doi.org/10.23887/jjpe.v11i2.21872>
- Sulandari, S. Dan M. S. A. Zein. 2003. Panduan Praktis Laboratorium DNA. Bidang Zoologi Pusat Penelitian Biologi LIPI, Hal 72-87.
- Sunandar, D. Dan I. Imron. 2010. Optimalisasi Templat DNA Genom Udang Galah, *Macrobrachium rosenbergii* Dalam Proses PCR-RAPD. In *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur*, Pp. 561-565.
- Suprpto, H. dan Kartika, Y. 2012. Pemantauan Virus dengan Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) di Pantai Utara Jawa Timur. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 4(1): 65-71.
- Suryanto, H., Susilo, B. D., Aminuddin, A., Sukarni, S., Suprayitno, S., Marsono, M. dan Yanuhar, U. 2021. Pelatihan Pemeliharaan Ikan Koi untuk Pengembangan Wisata Ikan di Kawasan Bedengan, Selorejo, Malang. *Jurnal Pengabdian Pendidikan dan Teknologi (JP2T)*, 2(1): 14-22.
- Taufiq, R., dan Najmudin, N. 2017. Rancang Bangun Sistem Informasi Sterilisasi Alat Pada Unit CSSD Berbasis Java di RSUD Kota Tangerang. *Jurnal Informatika: Jurnal Pengembangan IT*, 2(1): 42-49. <https://doi.org/10.30591/jpit.v2i1.443>
- Ulfiana R, G.Mahasri, dan H.Suprpto. 2012. Tingkat Kejadian *Aeromonas* pada Ikan Koi *Cyprinus carpio* yang Terinfeksi *Myxobolus koi* Pada Derajat Infeksi Yang Berbeda. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. 4(2): 169-174.
- Utami, S. T., Kusharyati, D.F. dan Pramono, H. 2013. Pemeriksaan Bakteri *Leptospira* Pada Sampel Darah Manusia Suspect *Leptospirosis* Menggunakan Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). *Balaba*. 9(2): 74-81.
- Wijaya, S. K. 2016. Gibson Assembly Piranti Enzimatis Terbaru Dalam Teknologi Rekombinasi DNA. *Biotrends*, 6(2): 14-18.
- Wijayanto, D. S. M., Solichin, A. Dan Widyorini, N. 2013. Pengaruh Ekstrak Bawang Putih (*Allium sativum*) dengan Dosis yang Berbeda terhadap Lepasnya Suckers Kutu Ikan (*Argulus* sp.) pada Ikan Koi (*Cyprinus carpio*). *Management of Aquatic Resources Journal (MAQUARES)*, 2(2): 46-53. <https://doi.org/10.14710/marj.v2i2.4103>
- Yanuhar, U. Dan N. R. Caesar. 2020. Penyakit Virulogik pada Ikan. Universitas Brawijaya Press, 164 Hal.
- Yanuhar, U., Musa, M. dan Wuragil, D. K. 2019. Pelatihan dan Pendampingan Manajemen Kualitas Air dan Kesehatan Pada Budidaya Ikan Koi (*Cyprinus carpio*). *Jurnal Karinov*, 2(1): 69-74.
- Yeni, M., Eri, B, dan M, Untung Kurnia, A. Peranan Senyawa Metabolit Sekunder Tumbuhan Mangrove Terhadap Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila* Pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L). *Jurnal Akuatika*, 4(1): 1-9.

- Yuenleni. 2019. Langkah-Langkah Optimalisasi PCR ISSN 2655 4887 (Print), ISSN 2655 1624 (Online) ISSN 2655 4887 (Print), ISSN 2655 1624 (Online), 1(3): 51-56.
- Yusuf, Z. K. 2010. Polymerase Chain Reaction (PCR). Jurnal Saintek, 5(6): 1-6.
- Zedta, R. R. dan Setyadi, B. 2019. Optimalisasi PCR Ikan Tongkol Krai (*Auxis thazard*) Dan Lisong (*Auxis rochei*) Pada Analisis Keragaman Genetik. Bawal Widya Riset Perikanan Tangkap, 11(2): 95-102. <http://dx.doi.org/10.15578/bawal.11.2.2019.95-102>
- Zellatifanny, C. M. dan Mudjiyanto, B. 2018. Tipe penelitian deskripsi dalam ilmu komunikasi. Diakom: Jurnal Media Dan Komunikasi, 1(2): 83-90.