

Studi Filogenetik Gen Penyandi Glikoprotein Virus CyHV-3 Pada Ikan Koi Di Beberapa Daerah Jawa Timur

*Phylogenetic Study of CyHV-3 Virus Glycoprotein Encoding Genes
in Koi Fish in Several Regions of East Java*

Indra Sukma Putra*² , Mohammad Fathoni², Suwarno¹ , Jola Rahmahani¹ 

¹ Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya
Kampus C Mulyorejo Surabaya, 60115 Telp. 031-5992785

² Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Surabaya I
Jl. Raya Bandara Juanda No. 23 Semabung, Gedangan, Sidoarjo Telp. 081335690974

E-mail: ahmadisukma14@gmail.com

ABSTRAK

Virus Cyprinid Herpesvirus 3 (CyHV-3) merupakan salah satu penyebab infeksi akut penyebab kematian pada ikan koi. Genom CyHV-3 mengkode lima keluarga gen: ORF2, reseptor tumor necrosis factor (TNFR), ORF22, ORF25, dan RING. Dalam pemantauan Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Surabaya I tahun 2015 ditemukan penyakit Koi Herpesvirus di beberapa daerah di Jawa Timur yaitu Malang, Madiun, Kediri dan Blitar. Sampel yang berupa ikan koi dilakukan deteksi terhadap CyHV-3 dengan metode PCR, setelah dipastikan positif terhadap virus CyHV-3, dilakukan PCR kembali pada isolat DNA dengan menggunakan primer spesifik terhadap gen penyandi glikoprotein (ORF25), selanjutnya disekuensing menggunakan metode direct sequencing sehingga diketahui sekuen nukleotida. Sekuen nukleotida selanjutnya diterjemahkan dalam bentuk asam amino. Hasil sekuen nukleotida dan asam amino di alignment menggunakan program GENETYX ver 10, serta dilanjutkan analisa filogenetik. Hasil pohon filogenetik pada gen ORF25 menunjukkan isolat Jawa Timur (Malang, Madiun, Kediri dan Blitar,) dekat kekerabatannya dengan isolat China (KP004892), Jepang (AP008984) dan Korea (JQ308816) daripada dengan isolat Amerika (NC_009127.1) dan Israel (DQ177346). Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa isolat CyHV-3 Jawa Timur (Malang, Madiun, Kediri dan Blitar) memiliki homologi dan tingkat kekerabatan yang tinggi pada sekuen nukleotida dan asam amino dan diindikasikan berasal dari China, sehingga gen ORF25 pada isolat tersebut dapat diketahui untuk mengidentifikasi asal muasal penyakit dan menentukan kebijakan sehingga dapat segera dicegah/dikendalikan penyakit KHV pada ikan koi.

Kata Kunci: CyHV-3; Gen Glikoprotein; Sekuensing; Ikan Koi; Jawa Timur

ABSTRACT

Virus cyprinid Herpesvirus 3 (CyHV-3) is one of the causes of acute infectious cause of death in koi fish. The CyHV-3 genome encodes five gene family ORF2, tumor necrosis factor receptor (TNFR), ORF22, ORF25, and RING. In monitoring Fish Quarantine, Quality Control and Safety of Fishery Class I Surabaya I 2015, Koi Herpesvirus disease is found in some areas in East Java, Malang, Madiun, Kediri, and Blitar. Samples in the form of koi fish were detected for CyHV-3 with the PCR method. After it was confirmed positive for the virus CyHV-3, then re-isolate DNA PCR was performed using specific primers to the gene coding for the glycoprotein (ORF25). Then, sequenced using direct sequencing method that is known as nucleotide sequences. The nucleotide sequences were then translated into amino acids. The results of the nucleotide and amino acid sequences were then aligned using the GENETYX ver 10 program and continued with phylogenetic analysis. The results of the phylogenetic tree of the gene ORF25 showed isolates East Java (Malang, Madiun, Kediri, and Blitar,) closely related to isolate China (KP004892), Japan (AP008984) and Korea (JQ308816) than the American isolates (NC_009127.1) and Israel (DQ177346). In this study, it can be concluded that the isolated CyHV-3 East Java (Malang, Madiun, Kediri, and Blitar) has high homology in nucleotide and amino acid sequences, and can be indicated as originating from China, so that the isolate in the ORF25 gene can be identified to identify the origin of the disease and determine policies so that KHV disease can be immediately prevented/controlled in koi fish.

Keyword: CyHV-3; Glycoprotein gene; Sequencing; Koifish; East Java

PENDAHULUAN

Produksi ikan hias merupakan komponen penting dari industri akuakultur di beberapa Negara, termasuk di Indonesia. Secara khusus Ikan koi (*Cyprinus carpio*) merupakan ikan hias yang bernilai ekonomis tinggi. Virus Cyprinid Herpesvirus 3 (CyHV-3) merupakan salah satu penyebab infeksi akut penyebab kematian pada ikan koi.

Virus ini mengakibatkan kematian massal, yaitu 80-90 % dari populasi sehingga berdampak pada kerugian ekonomi dan sosial.

Genom CyHV-3 adalah 295 kb, linear, *double stranded* Molekul DNA yang terdiri dari bagian tengah besar diapit oleh dua 22 kb daerah ulangan, disebut ulangan kiri dan kanan. Genom CyHV-3 diperkirakan mengandung 155 protein-coding

potensial open reading frame (ORFs), dimana delapan (ORF1-ORF8) adalah yang digandakan dalam ulangan terminal. Sembilan ORFs ditandai oleh adanya introns. Genom CyHV-3 mengkode lima keluarga gen: ORF2, reseptor tumor necrosis factor (TNFR), ORF22, ORF25, dan RING. Keluarga ORF25 terdiri dari 6 urutan paralogous (ORF25, ORF26, ORF27, ORF65, ORF148 dan ORF149) yang berpotensi mengkode membran glikoprotein Tipe 1 (Aoki et al., 2007).

CyHV-3 yang telah menginfeksi ikan koi telah terdaftar pada Genbank yaitu NC_009127.1 (CyHV-3 complete genom asal Amerika), AP008984 (CyHV-3 complete genom asal Jepang), KP004892 (CyHV-3 complete genom asal China), JQ308816 (CyHV-3 complete genom asal Korea), dan DQ177346 (CyHV-3 complete genom asal Israel).

Di Indonesia, penyakit Koi Herpesvirus (KHV) yang awal kalinya muncul di daerah Blitar Jawa Timur, saat ini telah menyerang budidaya ikan koi ataupun ikan cyprinid pada hampir semua wilayah di Indonesia. KHV muncul pertama kali di Indonesia pada tahun 2002, namun sampai saat ini belum ada langkah strategis untuk menanggulangi penyakit ini. Hal ini menyebabkan Indonesia belum aman dari ancaman wabah KHV. Berdasarkan hasil pemantauan hama dan penyakit ikan karantina (HPIK) yang dilakukan Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan

Hasil Perikanan Kelas I Surabaya I tahun 2015 di wilayah kerjanya telah ditemukan penyakit KHV. Gejala klinis yang utama oleh infeksi Penyakit KHV pada ikan Koi dan ikan mas pada umumnya menunjukkan tanda putih dan sel yang mati pada selaput insang. Ikan seringkali berenang di permukaan dan menunjukkan gangguan pernafasan. Tanda lainnya seperti mata tenggelam atau masuk, luka pada sekujur tubuh, lendir yang berlebihan dan kulit yang pucat. Hasil penyakit KHV yang ditemukan telah dibuktikan dengan pengujian *Polimerase Chain Reaction* (PCR). Oleh karena itu dari hasil penemuan penyakit KHV dalam pemantauan Balai KIPM Kelas I Surabaya I ini di beberapa wilayah di Jawa Timur, khususnya di Blitar tahun 2015 ini perlu dilakukan studi genotipegen penyandi glikoprotein virus penyebab penyakit KHV (yaitu *Cyprinid Herpesvirus-3* (CyHV-3)) pada ikan koi (*Cyprinid*) yang ada di sentra perikanan Jawa Timur.

BAHAN DAN METODE

Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan kegiatan penelitian ini dilakukan di Laboratorium Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Surabaya I di Surabaya dan *Institute of Tropical Disease* (ITD) Universitas Airlangga, Surabaya, selama 3 (tiga) bulan mulai

bulan Desember 2015 sampai dengan bulan Februari 2015.

Populasi dalam penelitian ini adalah ikan koi. Koleksi sampel ikan yang diduga terinfeksi penyakit KHV diperoleh dari sentra budidaya ikan wilayah pemantauan Balai KIPM Surabaya I di beberapa daerah di Jawa Timur yaitu Pasuruan, Tulungagung, Malang, Madiun, Kediri dan Blitar. Jumlah sampel yang diambil sebanyak enam sampai sepuluh ekor, dari total populasi tiap kolam 100-250 ekor (Modifikasi Amoz (1985) dalam Pusat Karantina Ikan, 2010) dan semua sampel diambil secara acak kemudian dijadikan satu dalam pengujiannya. Ikan yang diduga terinfeksi CyHV-3 atau menunjukkan gejala klinis spesifik terhadap penyakit KHV yang ditandai dengan tubuh berwarna kemerahan, insang busuk serta diperkuat dengan hasil PCR konvensional spesifik terhadap *Koi Herpesvirus* (KHV) dan dinyatakan positif, selanjutnya dilakukan PCR kembali dengan primer gen ORF25 CyHV-3 kemudian dilakukan sekuensing DNA.

Pemeriksaan dengan uji *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Ekstraksi DNA TRI Reagent :

Insang sebanyak 50-100 mg dipotong kecil-kecil dan digerus halus dengan pisau bedah atau gunting steril. Untuk menghindari kontaminasi, setiap sampel harus diproses dengan menggunakan tempat dan alat yang berbeda. Selanjutnya sampel tersebut

dilakukan ekstraksi DNA. Pertama dengan menambahkan 1 ml Tri Reagent® ke dalam Eppendorf yang berisi 50 mg sampel, dicampur sampai homogen dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm pada suhu ruang selama 5-10 menit. Tahapan selanjutnya, dengan memindahkan supernatan ke dalam tabung baru, dan ditambahkan 0,5 ml ethanol 100% dicampur homogen. Kemudian supernatan disentrifugasi pada 10.000 rpm, suhu ruang, selama 5 menit. Supernatan kemudian dibuang, pellet dicuci dengan cara ditambahkan 1 ml alkohol 90%. Pencucian dengan 1 ml alkohol 90% ini dilakukan sebanyak 3 kali atau sampai warna pigmen kekuningan hilang. Selama proses pencucian, supernatan disentrifugasi pada 10.000 rpm, suhu ruang, selama 5 menit. Tahap terakhir, supernatan dibuang, pellet DNA dikeringkan dan dilarutkan dengan ddH₂O atau *Nuclease Free Water* dan dilakukan amplifikasi (Pusat Karantina Ikan, 2008).

Amplifikasi

Amplifikasi pertama dilakukan untuk memastikan adanya virus KHV berdasarkan OIE tahun 2012. Primer mix dan *template control* diletakkan di atas es, untuk menghilangkan sifat aerosol serta mencampur dilakukan spin cepat atau sentrifugasi. Reaksi menggunakan kontrol negatif dari *template* atau *water blank* dan satu kontrol positif (*template* kontrol positif

adalah positif untuk KHV). Selanjutnya ditambahkan 7 µl ddH₂O, 1 µl primer mix (0,75 µl primer *Bercovier TK primers*= Forward : 5'-GGG-TTA-CCT-GTA-CGA-G-3' Reverse : 5'-CAC-CCA-GTA-GAT-TAT-GC-3' Product size = 409 bp), 12,5 µl master mix, dan 4 µl DNA template DNA. Kemudian dicampur dengan vortek spindown. Selanjutnya dilakukan amplifikasi : denaturasi pada 94°C selama 5 menit (1 siklus), *annealing* pada 95°C selama 1 menit, 55 °C selama 1 menit, 72 °C selama 1 menit (40 siklus), dan *extension* 72 °C selama 10 menit (1 siklus) (OIE, 2012).

Selanjutnya hasil ektraksi DNA dilakukan amplifikasi lagi dengan menggunakan primer spesifik CyHV-3 ORF25, untuk melihat sekuen produk PCR-nya agar bisa dianalisa homologi molekulernya. Primer mix dan *template*

diletakkan di atas es, untuk menghilangkan sifat aerosol serta mencampur dilakukan spin cepat atau sentrifugasi. Reaksi menggunakan *isolate/template* hasil isolasi DNA sampel yang dinyatakan positif PCR CyHV-3. Selanjutnya ditambahkan 7µl ddH₂O, 12,5µl master mix, 4µl DNA template yang telah dinyatakan positif CyHV-3 dan 1,5µl primer mix (@ 0,75 µl primer Forward/Reverse). Adapun untuk masing-masing primer dilakukan proses amplifikasi dengan pengaturan suhu yaitu denaturasi pada 95°C selama 30 detik (1 siklus), *annealing* pada 95°C selama 30 detik, 61°C (I), 59°C (II), 62°C (III) selama 60 detik, 72 °C selama 90 detik (30 siklus), dan *extension* pada 72 °C selama 7 menit (1 siklus) (Modifikasi Han *et. al.*, 2013).

Tabel 1. Posisi dan Sekuens Nukleotida dari Primer CyHV-3

PRIMER	SEKUEN NUKLEOTIDA	LOKUS	AMPLICON
CyHV-3 <i>Bercovier TK primers</i>(OIE, 2012)			
F1	5' GGG-TTA-CCT-GTA-CGA-G 3'	96087-96103	409 bp
R1	5' CAC-CCA-GTA-GAT-TAT-GC 3'	96479-96496	
CyHV-3 ORF 25 (Han, 2013)			
25F1	5' ATG-ACG-GGT-TGT-GGG-GTT-TGG 3'	45570-45590	1,806 bp
25R1	5' TTA-GGG-CCT-CCG-GGA-AAC-CTG 3'	47355-47375	

Tabel 2. Posisi dan Sekuens Nukleotida dari Primer CyHV-3

PRIMER	SEKUEN NUKLEOTIDA	LOKUS	AMPLICON
ORF 25			
(I)25F1	5' ATGACGGGTTGTGGGGTTTGG 3'	45570-45590	696 bp
(I)R1	5' TCACGTCAAAGGGACAGTCG 3'	46246-46266	
(II)F2	5' GCGTCTCGGGAGATACTTTG 3'	46140-46160	645 bp
(II)R2	5' GGGCACTCCATCTCAAAGAC 3'	46765-46785	
(III)F3	5' AGGGCACCGTCTTTGAGATG 3'	46757-46777	618 bp
(III)25R1	5' TTAGGGCCTCCGGGAAACCTG 3'	47355-47375	

Visualisasi Hasil Amplifikasi

Produk hasil PCR divisualisasikan dengan metode elektroforesis yang menggunakan gel agarose 2% yang mengandung ethidium bromide dengan menggunakan buffer TAE. Marker yang digunakan 100 bp DNA *ladder*. Tahap elektroforesis dilakukan pada 100 volt selama kurang lebih 20-30 menit. Selanjutnya untuk visualisasi dengan UV-transluminator pada panjang gelombang 302 nm (Nawan *et al.*, 2012).

Purifikasi produk PCR

Purifikasi produk PCR dilakukan dengan menggunakan QLAquick Gel Extration Kit, fragmen DNA dari gel agarose dipotong dengan menggunakan scalpel yang bersih dan tajam. Potongan gen kemudian dimasukkan ke dalam mikrotube 1,5 ml dan ditimbang dan selanjutnya ditambah 3x volume gel dengan Buffer QG. Tube berisi potongan gel dan

buffer selanjutnya diinkubasi pada suhu 50°C selama 10 menit pada waterbath. Setelah gel larut sempurna ditambah dengan isopropanol sebanyak 1x volume gel, kemudian larutan tersebut dimasukkan ke dalam QLAquick spin column dan disentrifus dengan kecepatan 17.900 g selama 1 menit. Cairan pada bagian bawah kemudian dibuang dan selanjutnya ditambah 500 µl buffer QG kedalam QLAquick spin column dan disentrifus dengan kecepatan 17.900 g selama 1 menit. Cairan pada bagian bawah kemudian dibuang selanjutnya ditambah 750 Buffer PE kedalam QLAquick spin column dan setrifus dengan kecepatan 17.900 g selama 1 menit. QLAquick spin column dimasukkan kedalam tube 1,5 ml dan ditambah Buffer EB sebanyak 30 µl dibiarkan dahulu selama 3 menit pada suhu ruang. Selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 17.900 g selama 1

menit. Hasil purifikasi produk PCR ini kemudian dilanjutkan dengan sekuensing (Hendriyanto, 2013).

Sekuensing DNA

Sekuensing nukleotida ini dilakukan melalui tiga tahap, tahap pertama adalah melakukan tahap *labelling* yaitu DNA yang sudah murni dilabel dengan Big Dye Terminator kit versi 3.1. Penambahan reagen ini bertujuan untuk memberikan fluoresensi yang digunakan untuk membedakan urutan nukleotida. Pada tahap ini mesin *thermocycler* diprogram dalam keadaan suhu initial denaturation 96°C selama 1 menit, kemudian sebanyak 5 siklus pada 96°C selama 10 detik, 50°C selama 5 detik dan 60°C selama 4 menit. Tahap kedua yaitu melakukan hasil purifikasi cycle sequencing menggunakan Big Dye X Terminator yang bertujuan untuk memurnikan nukleotida dan menghilangkan *Big Dye Label* yang tersisa. Setelah itu, tahap terakhir yaitu melakukan sekuensing genome CyHV-3 dengan menggunakan mesin *sequencer* ABI 3500 xL GENETIC ANALYSER (Applied Biosystems, Inc.). Kegiatan Sekuensing dilakukan oleh PT. Genetika Science.

Analisis Data Molekuler

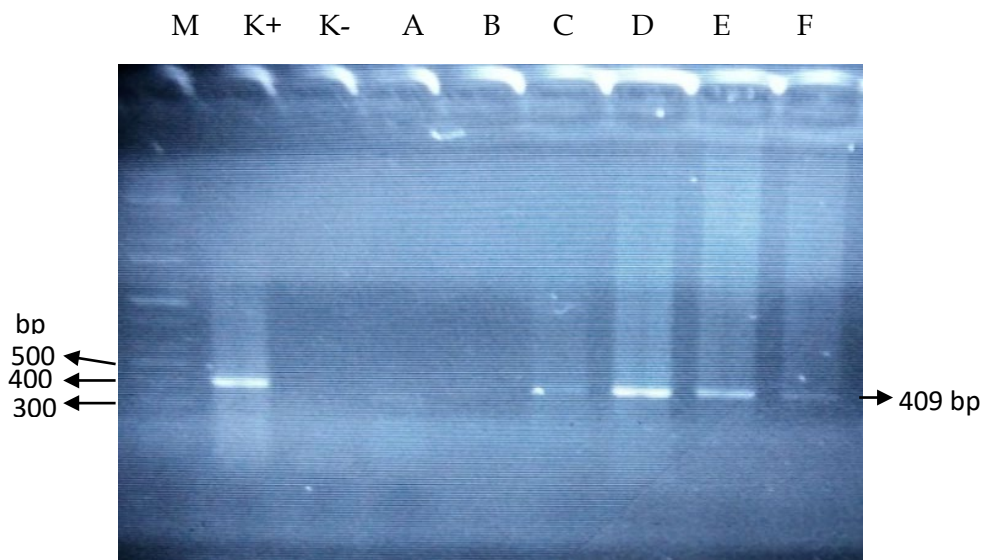
Data yang terkumpul dari hasil sekuensing yaitu data urutan

nukleotida CyHV-3 potongan gen penyandi ORF25 tersebut, kemudian dianalisis dan disambungkan serta dibandingkan dengan referensi menggunakan *software* GENETYX-Win versi 10. Sekuen nukleotida gen penyandi ORF25 CyHV-3 yang didapatkan dihomologikan dengan urutan nukleotida dari berbagai genotipe dari *GeneBank*, menggunakan program *software* GENETYX-Win versi 10.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Pemeriksaan Virus CyHV-3

Untuk memastikan adanya infeksi penyakit KHV pada ikan koi, perlu dilakukan pemeriksaan dengan teknik PCR. Pengujian dengan menggunakan teknik PCR merupakan Gold Standar untuk deteksi penyakit KHV. Prosedur dan kondisi PCR merujuk pada pengujian *Office International des Epizooties* (OIE) tahun 2012 dengan menggunakan primer spesifik CyHV-3 (Bercovier, 2005) yang menghasilkan produk pada 409 bp. Hasil dari elektroforesis menunjukkan bahwa untuk ikan yang menunjukkan gejala klinis penyakit KHV diperoleh pita pada 409 bp atau sejajar dengan kontrol positif, yaitu sampel ikan koi yang berasal dari daerah Malang, Madiun, Kediri dan Blitar. Gambar hasil elektroforesis disajikan pada Gambar 1.

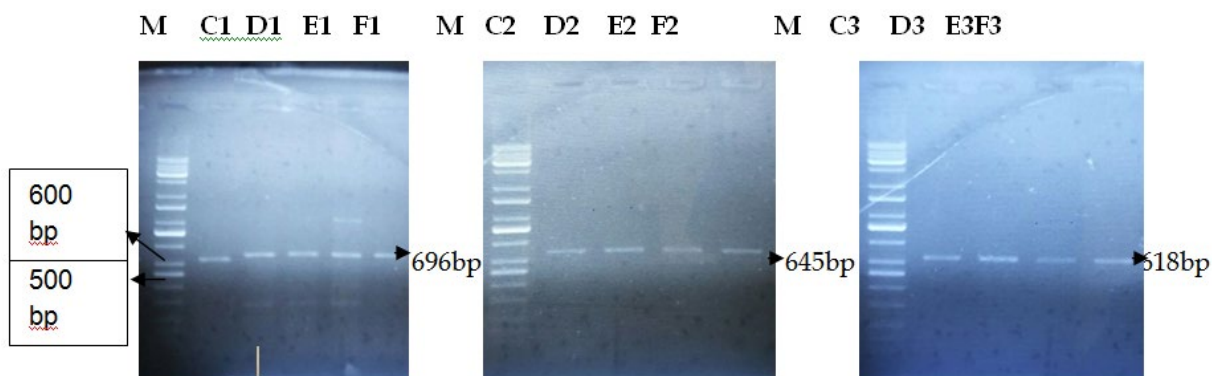


Gambar 1. Hasil elektroforesis Virus CyHV-3 sampel C (Malang), sampel D dari ikan koi (Madiun), sampel E (Kediri) dan sampel F (Blitar), K- adalah kontrol negatif, K+ adalah kontrol positif dan M adalah marker.

Hasil Pemeriksaan ORF25 CyHV-3

Hasil dari deteksi PCR terhadap virus penyebab penyakit *Koi Herpesvirus Disease* (CyHV-3) dilanjutkan untuk pemeriksaan terhadap gen penyandi glikoprotein virus tersebut. Hasil Ekstraksi dari sampel yang positif dilakukan amplifikasi lagi dengan menggunakan primer spesifik ORF25 CyHV-3.

Adapun Hasil dari elektroforesis menunjukkan bahwa semua ikan yang menunjukkan gejala klinis terdapat pita (*band*) yang spesifik dengan ORF25 CyHV-3 dengan bp yang sesuai dengan primer masing-masing. Hasil elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil elektroforesis ORF25 CyHV-3 a). primer 1 (C1, D1, E1, F1), b). primer 2 (C2, D2, E2, F2) dan c). primer 3 (C3, D3, E3, F3).

Hasil Sekuensing Nukleotida Gen ORF25 Virus CyHV-3

Hasil PCR masing- masing fragmen DNA selanjutnya disekuensing dengan menggunakan ABI 35000 xL Genetic Analyzer sehingga dapat diketahui susunan nukleotida dari potongan gen ORF 25CyHV-3 sampel ikan koi tersebut di atas. Urutan nukleotida

yang diperoleh dari hasil sekuensing DNA CyHV-3 isolat lokal selanjutnya dilakukan *multiple alignment* susunan nukleotida dengan isolat lain yang didapatkan dari *GenBank*. Hasil dari *multiple alignment* susunan nukleotida ORF25CyHV-3 terdapat beberapa perbedaan, yaitu dapat dilihat pada Gambar 3.

NC_009127.1-USA CyHV3	1	ATGACGGGTTGTGGGGTTTGGTGGACGACCGGCCTGGCGTTGCTGGTCATCGCCGTCTCC	60
Sampel C	1	60
Sampel D	1G.....	60
Sampel E	1G.....	60
Sampel F	1G.....	60
AP008984-Japan CyHV3 (TUMST1)	1	60
JQ308816-Korea CyHV3 (SNUKHV)	1	60
KP004892-China CyHV3 (HZ419)	1	60
GU815502-USA CyHV3 (FL)	1	60
DQ657948-USA CyHV3 (KHV-U)	1	60
DQ177346-Israel CyHV3 (KHV-I)	1	60
KJ627438-China CyHV3 (GZ11)	1	60
NC_009127.1-USA CyHV3	61	CCATCT---CAGCAGACCACGGCCCTCAACATAAACTCTTTGGTCTACTCTGTGAGCTAC	117
Sampel C	61CTG.....	120
Sampel D	61CTG.....	120
Sampel E	61CTG.....	120
Sampel F	61CTG.....	120
AP008984-Japan CyHV3 (TUMST1)	61CTG.....	120
JQ308816-Korea CyHV3 (SNUKHV)	61---	117
KP004892-China CyHV3 (HZ419)	61CTG.....	120
GU815502-USA CyHV3 (FL)	61---	117
DQ657948-USA CyHV3 (KHV-U)	61---	117

DQ177346-Israel CyHV3 (KHV-I)	61---	117
KJ627438-China CyHV3 (GZ11)	61---	117
NC_009127.1-USA CyHV3	1438	ACCACCCACCCCGACCCCTGCCAGTCA	CCACACCAAGACGACGACGCTCAGGACTACA	1497
Sampel C	1441G.....	1500
Sampel D	1441	1500
Sampel E	1441	1500
Sampel F	1441	1500
AP008984-Japan CyHV3 (TUMST1)	1441	1500
JQ308816-Korea CyHV3 (SNUKHV)	1438	1497
KP004892-China CyHV3 (HZ419)	1441	1500
GU815502-USA CyHV3 (FL)	1438	1497
DQ657948-USA CyHV3 (KHV-U)	1438	1497
DQ177346-Israel CyHV3 (KHV-I)	1438	1497
KJ627438-China CyHV3 (GZ11)	1438	1497
NC_009127.1-USA CyHV3	1558	ACCTCGCTTCGGACGACGTTT	CACACCCCGACGCTGACCGTCGC-----	1609
Sampel C	1561A.-AGG.....C.....CG.G.TTC.AC...GT..A.AA.....	1617
Sampel D	1561A.-AGG.....C.....CG.G.TTC.AC...GT..A.AA.....	1617
Sampel E	1561A.-AGG.....C.....CG.G.TTC.AC...GT..A.AA.....	1617
Sampel F	1561A.-AGG.....C.....CG.G.TTC.AC...GT..A.AA.....	1617
AP008984-Japan CyHV3 (TUMST1)	1561A.-AGG.....C.....CG.G.TTC.AC...GT..A.AA.....	1617
JQ308816-Korea CyHV3 (SNUKHV)	1558A.-AGG.....C.....CG.G.TTC.AC...GT..A.AA.....	1614
KP004892-China CyHV3 (HZ419)	1561A.-AGG.....C.....CG.G.TTC.AC...GT..A.AA.....	1617
GU815502-USA CyHV3 (FL)	1558	1609
DQ657948-USA CyHV3 (KHV-U)	1558	1609
DQ177346-Israel CyHV3 (KHV-I)	1558	1609
KJ627438-China CyHV3 (GZ11)	1558A.-AGG.....C.....CG.G.TTC.AC...GT..A.AA.....	1614
NC_009127.1-USA CyHV3	1610	-----	AGGGATCCAGCGGCGGCTGGTGGTGCATCGTCATAACCGTGTTT	1656
Sampel C	1618	GTCGCCCCCGACG.....	1677
Sampel D	1618	GTCGCCCCCGACG.....	1677
Sampel E	1618	GTCGCCCCCGACG.....	1677
Sampel F	1618	GTCGCCCCCGACG.....	1677
AP008984-Japan CyHV3 (TUMST1)	1618	GTCGCCCCCGACG.....	1677
JQ308816-Korea CyHV3 (SNUKHV)	1615	GTCGCCCCCGACG.....	1674
KP004892-China CyHV3 (HZ419)	1618	GTCGCCCCCGACG.....	1677
GU815502-USA CyHV3 (FL)	1610	-----	1656
DQ657948-USA CyHV3 (KHV-U)	1610	-----	1656
DQ177346-Israel CyHV3 (KHV-I)	1610	-----	1656
KJ627438-China CyHV3 (GZ11)	1615	GTCGCCCCCGACG.....	1674
NC_009127.1-USA CyHV3	1777	TTCCGGGGCCAGGTTTCCCGAGGCCCTAA	1806
Sampel C	1798	1827
Sampel D	1798G.....	1827
Sampel E	1798A.....	1827
Sampel F	1798A.....	1827
AP008984-Japan CyHV3 (TUMST1)	1798	1827
JQ308816-Korea CyHV3 (SNUKHV)	1795	1824
KP004892-China CyHV3 (HZ419)	1798	1827
GU815502-USA CyHV3 (FL)	1777	1806
DQ657948-USA CyHV3 (KHV-U)	1777	1806
DQ177346-Israel CyHV3 (KHV-I)	1777	1806
KJ627438-China CyHV3 (GZ11)	1795	1824

Keterangan : Sampel C: ikan koi Malang, Sampel D: ikan koi Madiun, Sampel E :ikan koi Kediri dan Sampel F : ikan koi Blitar

Gambar 3. *Multiple alignment* susunan nukleotida dari isolat lokal CyHV-3 pada gen ORF25 dari Jawa Timur dibandingkan dengan isolat CyHV-3 lain dari GenBank.

Urutan nukleotida isolat Jawa Timur (Malang, Madiun, Kediri dan Blitar) selanjutnya diterjemahkan dalam bentuk asam amino menggunakan software GENETYX ver. 10 kemudian

dibandingkan dengan urutan asam amino isolat lain yang didapatkan dari GenBank dan hasil dari multiple alignment susunan asam amino dapat dilihat pada Gambar 4.

NC_009127-USA	1	MTGCGVWWTGLALLVIAVSPS-QQTTALNINSLVYSVSVSPRFGVNGLPYEISATFT	59
Sampel C	1L.....	60
Sampel D	1L.....	60
Sampel E	1L.....	60
Sampel F	1L.....	60
AP008984-Japan CyHV3 (TUMST1)	1L.....	60
JQ308816-Korea CyHV3 (SNUKHV)	1-	59
KP004892-China CyHV3 (HZ419)	1L.....	60
GU815502-USA CyHV3 (FL)	1-	59
DQ657948-USA CyHV3 (KHV-U)	1-	59
DQ177346-Israel CyHV3 (KHV-I)	1-	59
KJ627438-China CyHV3 (GZ11)	1-	59
NC_009127-USA	480	TTTTPTLPVTTPKTTTLRTTTTLPAPTITTTTPGSSTGAGTS-----LPTTFPTPLTV	533
Sampel C	481R.....QGPSTA.....	540
Sampel D	481QGPSTA.....	540
Sampel E	481QGPSTA.....	540
Sampel F	481QGPSTA.....	540
AP008984-Japan CyHV3 (TUMST1)	481QGPSTA.....	540
JQ308816-Korea CyHV3 (SNUKHV)	480QGPSTA.....	539
KP004892-China CyHV3 (HZ419)	481QGPSTA.....	540
GU815502-USA CyHV3 (FL)	480-----	533
DQ657948-USA CyHV3 (KHV-U)	480-----	533
DQ177346-Israel CyHV3 (KHV-I)	480-----	533
KJ627438-China CyHV3 (GZ11)	480QGPSTA.....	539
NC_009127-USA	594	GAQVSRRP	601
Sampel C	601	608
Sampel D	601G.....	608
Sampel E	601	608
Sampel F	601	608
AP008984-Japan CyHV3 (TUMST1)	601	608
JQ308816-Korea CyHV3 (SNUKHV)	600	607
KP004892-China CyHV3 (HZ419)	601	608
GU815502-USA CyHV3 (FL)	594	601
DQ657948-USA CyHV3 (KHV-U)	594	601
DQ177346-Israel CyHV3 (KHV-I)	594	601
KJ627438-China CyHV3 (GZ11)	600	607

Keterangan asam amino : A: Alanin; C: Sistein; D: Asam aspartat; E: Asam glutamat; F: Fenilalanin; G: Glisin; H: Histidin; I: Isoleusin; K: Lisin; L: Leusin; M: Metionin; N: Aspargin; P: Prolin; R: Arginin; V: Valin; S: Serin; T: Treonin.

Gambar 4. Multiple alignment urutan asam amino dari isolat Jawa Timur (sampel C (Malang), sampel D (Madiun), sampel E (Kediri), sampel F (Blitar)) dari gen ORF25 dibandingkan dengan isolat ORF25 CyHV3 lain dari GenBank.

Adapun hasil dari *multiple alignment* susunan nukleotida ORF25 secara utuh dari masing - masing sampel CyHV-3

setelah diketahui beberapa perbedaannya, ditampilkan sebagai berikut pada Gambar 5.

A. Sampel Malang

LOCUS BASE COUNT ORIGIN	351 a	640 c	517 g	319 t		
1	ATGACGGGTT	GTGGGGTTTG	GTGGACGACC	GGCCTGGCGT	TGCTGGTCAT	CGCCGTCTCC
61	CCATCTCTGC	AGCAGACCAC	GGCCCTCAAC	ATAAACTCTT	TGGTCTACTC	TGTGAGCTAC
121	TCGGTGCCCA	GATTCTGCGG	GGTCAACGGG	CTGCCCTACG	AGATCTCGGC	CACCTTCACC
181	TTGACAAGT	ACAACGTGAG	CAGCGTCGAG	TGGCTAGCGC	CAGTCACACC	CTTACCATCG
241	ACACCGGGTT	CGAGGACCAA	CGTCACTGG	GCCTGGGGA	GGCCGCACCG	CACGACGCTC
301	TCGTTCAGGC	CTTTCGCTT	CACGGACGCC	ACCCGGCCCT	ACGCCGTGAG	GGCCATGGGA
361	GAAATCATCG	ACGTGGGGCT	CATCAAGCGC	TACGACGACT	TGCCCTGGG	ATCCGTGAAG
421	GCCGCCTTGC	TGAGGGTGCA	GGCGGTCGGC	TTCGACCCCG	TCACATCGTA	CGCGATCCTC
481	AAGTGCCTGC	CTTCATGTTT	CATCCGCCAG	GATCTCCGGT	TCGTGTGGTT	CAACTACGAC
541	CAGGTGCAGC	CCGGCGTCTC	GGGAGATACT	TTGACAACGA	CGGTCCAGGG	ACGCTACATG
601	TGCGGCGTCG	CCGGGTCCCA	GCCTTCTTCC	AAACCCATCT	GGGTAGGAGA	GCCCGTCTTC
661	GACTGTCCCT	TTGACGTGAG	GGCCTGGTGT	CCGTCGGGTA	CGTCCAAAA	GTACGAGAAC
721	GAGTACCCCG	GCCGCTACAC	GGAGGACGAC	CTCAGACAGC	CCGGGACCGT	GCTGGCCTGC
781	AACGAGACCA	AGGCTGTCTC	GACCCTGGGC	ATGTGCGCCG	AGCGCACCGT	CTGCAACGTC
841	GAGGCCACCA	ACCAGTGCTC	CGACTTCTCA	CCC GCCGTCT	ACACCTCCTG	CAACAACACG
901	GCTGTGCACA	AGTTCTGTCC	CGACAGCCTG	CCCTTCGTCT	GGACCAGCTC	GACGCCGTGG
961	GTCGTGAGCA	CGGTTGACTC	CAACAACATA	GCTTTCACAG	ACGTGCCGGG	CACCACCTCC
1021	GTGATCAACA	CTTCTGCGG	CGCCGAGACC	AACGTGTACC	TGCTATGCGG	CACCCCGGAG
1081	CAGGCCGTGT	CGGCTGCCCG	ACCCCGGCC	GTCCTCTCCA	TACCCACTCT	GGACACCATG
1141	ACCGTCGCCA	ACGGAGACGG	CGTCGTGCC	GAACGTGCGG	TGGTGC GCGA	GGGCACCGTC
1201	TTTGAGATGG	AGTGCCCAAG	CCCCAACCTG	GTGGTGTACT	GGCGCAGGGG	AAACCTGAGG
1261	ATGGCCGTGA	GCCTCGGCTC	CTCCAACGTG	AGGATCCTCC	GCAAAACCTT	CACTCGCGAG
1321	GACCTCAACG	CCACCTGGAG	CTGCGTGGGT	TTCGACAGCT	ACAACGCCAT	CACGGCCACC
1381	CTCTTCAGGT	CCGTCTACCT	GACGGACGTG	AAGCCTACAA	CGCCAGCGCC	GGCGACGAGC
1441	ACCACCACCA	CCCCGACCCT	GCCAGTCACC	ACACCAAAGA	GGACGACGCT	CAGGACTACA
1501	ACCCTACCAG	CACCGCCGAC	CATAACCACC	ACCCTCCCG	GGTCTCGAC	CGGC GCCGGG
1561	ACCTCACAGG	GACCGTCCAC	CGCGCTTCCG	ACGACGTTCA	CAACCCCGAC	GCTGACCGTC
1621	ACCCCCGACG	AGGGATCCAG	CGGCGCGCTG	GTGGTGCTCA	TCGTCATAAC	CGTGTTTGAG
1681	GCGCTGATCA	TCGTATTCTG	GATCGTGGTG	TGCGGCTGCT	ATTACTACAA	GCACAACCCC
1741	GAACTCAGG	ACCGGTGGA	AGAGTTTACG	CGAAAGGCCA	AGGAGGACAT	AAAACGCTTC
1801	GGGGCCAGG	TTTCCCGGG	GCCCTAA			

B. Sampel Madiun

LOCUS BASE COUNT ORIGIN	350 a	641 c	518 g	318 t		
1	ATGACGGGTT	GTGGGGTTTG	GTGGACGACC	GGCCTGGCGT	TGCTGGTCAT	CGCCGTCTCC
61	CCATCTCTGC	AGCAGACCAC	GGCCCTCAAC	ATAAACTCTT	TGGTCTACTC	TGTGAGCTAC
121	TCGGTGCCCA	GATTCTGCGG	GGTCAACGGG	CTGCCCTACG	AGATCTCGGC	CACCTTCACC
181	TTGACAAGT	ACAACGTGAG	CAGCGTCGAG	TGGCTAGCGC	CAGTCACACC	CTTACCATCG
241	ACACCGGGTT	CGAGGACCAA	CGTCACTGG	GCCTGGGGA	GGCCGCACCG	CACGACGCTC
301	TCGTTCAGGC	CTTTCGCTT	CACGGACGCC	ACCCGGCCCT	ACGCCGTGAG	GGCCATGGGA
361	GAAATCATCG	ACGTGGGGCT	CATCAAGCGC	TACGACGACT	TGCCCTGGG	ATCCGTGAAG
421	GCCGCCTTGC	TGAGGGTGCA	GGCGGTCGGC	TTCGACCCCG	TCACATCGTA	CGCGATCCTC
481	AAGTGCCTGC	CTTCATGTTT	CATCCGCCAG	GATCTCCGGT	TCGTGTGGTT	CAACTACGAC
541	CAGGTGCAGC	CCGGCGTCTC	GGGAGATACT	TTGACAACGA	CGGTCCAGGG	ACGCTACATG
601	TGCGGCGTCG	CCGGGTCCCA	GCCTTCTTCC	AAACCCATCT	GGGTAGGAGA	GCCCGTCTTC
661	GACTGTCCCT	TTGACGTGAG	GGCCTGGTGT	CCGTCGGGTA	CGGTCCAAAA	GTACGAGAAC
721	GAGTACCCCG	GCCGCTACAC	GGAGGACGAC	CTCAGACAGC	CCGGGACCGT	GCTGGCCTGC
781	AACGAGACCA	AGGCTGTCTC	GACCC TGGGC	ATGTGCGCCG	AGCGCACCGT	CTGCAACGTC
841	GAGGCCACCA	ACCAGTGCTC	CGACTTCTCA	CCC GCCGTCT	ACACCTCCTG	CAACAACACG
901	GCTGTGCACA	AGTTCTGTCC	CGACAGCCTG	CCCTTCGTCT	GGACCAGCTC	GACGCCGTGG
961	GTCGTGAGCA	CGGTTGACTC	CAACAACATA	GCTTTCACAG	ACGTGCCGGG	CACCACCTCC
1021	GTGATCAACA	CTTCTGCGG	CGCCGAGACC	AACGTGTACC	TGCTATGCGG	CACCCCGGAG
1081	CAGGCCGTGT	CGGCTGCCCG	ACCCCGGCC	GTCCTCTCCA	TACCCACTCT	GGACACCATG
1141	ACCGTCGCCA	ACGGAGACGG	CGTCGTGCC	GAACGTGCGG	TGGTGC GCGA	GGGCACCGTC
1201	TTTGAGATGG	AGTGCCCAAG	CCCCAACCTG	GTGGTGTACT	GGCGCAGGGG	AAACCTGAGG
1261	ATGGCCGTGA	GCCTCGGCTC	CTCCAACGTG	AGGATCCTCC	GCAAAACCTT	CACTCGCGAG
1321	GACCTCAACG	CCACCTGGAG	CTGCGTGGGT	TTCGACAGCT	ACAACGCCAT	CACGGCCACC
1381	CTCTTCAGGT	CCGTCTACCT	GACGGACGTG	AAGCCTACAA	CGCCAGCGCC	GGCGACGAGC
1441	ACCACCACCA	CCCCGACCCT	GCCAGTCACC	ACACCAAAGA	CGACGACGCT	CAGGACTACA
1501	ACCCTACCAG	CACCGCCGAC	CATAACCACC	ACCCTCCCG	GGTCTCGAC	CGGC GCCGGG
1561	ACCTCACAGG	GACCGTCCAC	CGCGCTTCCG	ACGACGTTCA	CAACCCCGAC	GCTGACCGTC
1621	ACCCCCGACG	AGGGATCCAG	CGGCGCGCTG	GTGGTGCTCA	TCGTCATAAC	CGTGTTTGAG
1681	GCGCTGATCA	TCGTATTCTG	GATCGTGGTG	TGCGGCTGCT	ATTACTACAA	GCACAACCCC
1741	GAACTCAGG	ACCGGTGGA	AGAGTTTACG	CGAAAGGCCA	AGGAGGACAT	AAAACGCTTC
1801	GGGGCCAGG	TTTCCCGGG	GCCCTAA			

C. Sampel Kediri

LOCUS	BASE COUNT	352 a	641 c	516 g	318 t		
ORIGIN	1	ATGACGGGGT	GTGGGGTTTG	GTGGACGACC	GGCCTGGCGT	TGCTGGTCAT	CGCCGTCTCC
	61	CCATCTCTGC	AGCAGACCAC	GGCCCTCAAC	ATAAACTCTT	TGGTCTACTC	TGTGAGCTAC
	121	TCGGTGCCCA	GATTCTGCGG	GGTCAACGGG	CTGCCCTACG	AGATCTCGGC	CACCTTCACC
	181	TTGACAAAGT	ACAACGTGAG	CAGCGTCGAG	TGGCTAGCGC	CAGTCACACC	CTTACCATCG
	241	ACACCGGGTT	CGAGGACCAA	CGTCACCTGG	GCCTGGGGA	GGCCGCACC	CACGACGCTC
	301	TCGTTCAAGC	CCTTCGTCCT	CACGGACGCC	ACCCGGCCCT	ACGCCGTGAG	GGCCATGGGA
	361	GAAATCATCG	ACGTGGGGCT	CATCAAGCGC	TACGACGACT	TGCCCTGGG	ATCCGTGAAG
	421	GCCGCTTGC	TGAGGGTGCA	GGCGGTCGGC	TTCGACCCCG	TCACATCGTA	CGCGATCCTC
	481	AAGTGCCTGC	CCTCATGTTC	CATCCGCCAG	GATCTCCGGT	TCGTGTGGTT	CAACTACGAC
	541	CAGGTGCAGC	CCGGCGTCTC	GGGAGATACT	TTGACAACGA	CGGTCCAGGG	ACGCTACATG
	601	TGCGGCGTCG	CCGGGTCCCA	GCTCTTCTCC	AAACCCATCT	GGGTAGGAGA	GCCCGTCTTC
	661	GACTGTCCCT	TTGACGTGAG	GGCCTGGTGT	CCGTCGGGTA	CGGTCAAAA	GTACGAGAAC
	721	GAGTACCCGC	GCCGCTACAC	GGAGGACGAC	CTCAGACAGC	CCGGGACCCT	GCTGGCCTGC
	781	AACGAGACCA	AGGCTGTCTC	GACCCCTGGG	ATGTGCGCCG	AGCGCACCTG	CTGCAACGTC
	841	GAGGCCACCA	ACCAAGTCTC	CGACTTCTCA	CCCGCCGTCT	ACACCTCTTG	CAACAACACG
	901	GCTGTGCACA	AGTTCTGTCC	CGACAGCCTG	CCCTTCGTCT	GGACCAGCTC	GACGCCGTGG
	961	GTCGTGAGCA	CGGTTGACTC	CAACAACATA	GTCCTCACAG	ACGTGCCGGG	CACCACCTCC
	1021	GTGATCAACA	CCTTCTGCGG	CGCCGAGACC	AACGTGTACC	TGCTATGCGG	CACCCCGGAG
	1081	CAGGCCGTGT	CGGCTGCCCG	ACCCCGGCC	GTCCTTCTCA	TACCCACTCT	GGACACCATG
	1141	ACCGTGCACA	ACGGAGACGG	CGTCTGCCCC	GAACGTGCGG	TGGTGCAGCA	GGGCACCCTC
	1201	TTTGAGATGG	AGTGCCCCAG	CCCCAACCTG	GTGGTGTACT	GGCGCAGGGG	AAACCTGAGG
	1261	ATGGCCGTGA	GCCTCGGCTC	CTCCAACGTG	AGGATCCTCC	GCAAAACCTC	CACCTCGGAG
	1321	GACCTCAACG	CCACCTGGAG	CTGCGTGGGT	TTCGACAGCT	ACAACGCCAT	CACGGCCACC
	1381	CTCTTCAGGT	CCGTCTACCT	GACGGACGTG	AAGCCTACAA	CGCCAGCGCC	GGCGACGAGC
	1441	ACCACACCA	CCCCGACCCT	GCCAGTCACC	ACACCAAAGA	CGACGACGCT	CAGGACTACA
	1501	ACCCTACCAG	CACCGCCGAC	CATAACCACC	ACCACCTCCG	GGTCTCGAC	CGGCACCCTG
	1561	ACCTACACAG	GACCGTCCAC	CGCGCTTCCG	ACGACGTTCA	CAACCCCGAC	GCTGACCGTC
	1621	GCCCCGACG	AGGGATCCAG	CGGCGCGCTG	GTGGTGTCTA	TCGTCATAAC	CGTGTGTTGAG
	1681	GCGCTGATCA	TCGTATTCTG	GATCGTGGTG	TGCGGCTGCT	ATTACTACAA	GCACAACCCC
	1741	GAACTCAGGC	ACGCGGTGGA	AGAGTTTACG	CGAAAGGCCA	AGGAGGACAT	AAAACGCTTC
	1801	GGGGCCAGG	TTTCCCGAAG	GCCTTAA			

D. Sampel Blitar

LOCUS	BASE COUNT	352 a	641 c	516 g	318 t		
ORIGIN	1	ATGACGGGGT	GTGGGGTTTG	GTGGACGACC	GGCCTGGCGT	TGCTGGTCAT	CGCCGTCTCC
	61	CCATCTCTGC	AGCAGACCAC	GGCCCTCAAC	ATAAACTCTT	TGGTCTACTC	TGTGAGCTAC
	121	TCGGTGCCCA	GATTCTGCGG	GGTCAACGGG	CTGCCCTACG	AGATCTCGGC	CACCTTCACC
	181	TTGACAAAGT	ACAACGTGAG	CAGCGTCGAG	TGGCTAGCGC	CAGTCACACC	CTTACCATCG
	241	ACACCGGGTT	CGAGGACCAA	CGTCACCTGG	GCCTGGGGA	GGCCGCACC	CACGACGCTC
	301	TCGTTCAAGC	CCTTCGTCCT	CACGGACGCC	ACCCGGCCCT	ACGCCGTGAG	GGCCATGGGA
	361	GAAATCATCG	ACGTGGGGCT	CATCAAGCGC	TACGACGACT	TGCCCTGGG	ATCCGTGAAG
	421	GCCGCTTGC	TGAGGGTGCA	GGCGGTCGGC	TTCGACCCCG	TCACATCGTA	CGCGATCCTC
	481	AAGTGCCTGC	CCTCATGTTC	CATCCGCCAG	GATCTCCGGT	TCGTGTGGTT	CAACTACGAC
	541	CAGGTGCAGC	CCGGCGTCTC	GGGAGATACT	TTGACAACGA	CGGTCCAGGG	ACGCTACATG
	601	TGCGGCGTCG	CCGGGTCCCA	GCTCTTCTCC	AAACCCATCT	GGGTAGGAGA	GCCCGTCTTC
	661	GACTGTCCCT	TTGACGTGAG	GGCCTGGTGT	CCGTCGGGTA	CGGTCAAAA	GTACGAGAAC
	721	GAGTACCCGC	GCCGCTACAC	GGAGGACGAC	CTCAGACAGC	CCGGGACCCT	GCTGGCCTGC
	781	AACGAGACCA	AGGCTGTCTC	GACCCCTGGG	ATGTGCGCCG	AGCGCACCTG	CTGCAACGTC
	841	GAGGCCACCA	ACCAAGTCTC	CGACTTCTCA	CCCGCCGTCT	ACACCTCTTG	CAACAACACG
	901	GCTGTGCACA	AGTTCTGTCC	CGACAGCCTG	CCCTTCGTCT	GGACCAGCTC	GACGCCGTGG
	961	GTCGTGAGCA	CGGTTGACTC	CAACAACATA	GTCCTCACAG	ACGTGCCGGG	CACCACCTCC
	1021	GTGATCAACA	CCTTCTGCGG	CGCCGAGACC	AACGTGTACC	TGCTATGCGG	CACCCCGGAG
	1081	CAGGCCGTGT	CGGCTGCCCG	ACCCCGGCC	GTCCTTCTCA	TACCCACTCT	GGACACCATG
	1141	ACCGTGCACA	ACGGAGACGG	CGTCTGCCCC	GAACGTGCGG	TGGTGCAGCA	GGGCACCCTC
	1201	TTTGAGATGG	AGTGCCCCAG	CCCCAACCTG	GTGGTGTACT	GGCGCAGGGG	AAACCTGAGG
	1261	ATGGCCGTGA	GCCTCGGCTC	CTCCAACGTG	AGGATCCTCC	GCAAAACCTC	CACCTCGGAG
	1321	GACCTCAACG	CCACCTGGAG	CTGCGTGGGT	TTCGACAGCT	ACAACGCCAT	CACGGCCACC
	1381	CTCTTCAGGT	CCGTCTACCT	GACGGACGTG	AAGCCTACAA	CGCCAGCGCC	GGCGACGAGC
	1441	ACCACACCA	CCCCGACCCT	GCCAGTCACC	ACACCAAAGA	CGACGACGCT	CAGGACTACA
	1501	ACCCTACCAG	CACCGCCGAC	CATAACCACC	ACCACCTCCG	GGTCTCGAC	CGGCACCCTG
	1561	ACCTACACAG	GACCGTCCAC	CGCGCTTCCG	ACGACGTTCA	CAACCCCGAC	GCTGACCGTC
	1621	GCCCCGACG	AGGGATCCAG	CGGCGCGCTG	GTGGTGTCTA	TCGTCATAAC	CGTGTGTTGAG
	1681	GCGCTGATCA	TCGTATTCTG	GATCGTGGTG	TGCGGCTGCT	ATTACTACAA	GCACAACCCC
	1741	GAACTCAGGC	ACGCGGTGGA	AGAGTTTACG	CGAAAGGCCA	AGGAGGACAT	AAAACGCTTC
	1801	GGGGCCAGG	TTTCCCAGG	GCCTTAA			

Gambar 5. Urutan nukleotida hasil sekuensing DNA secara utuh ORF25 CyHV-3 Ikan Koi Jawa Timur (A. Malang, B. Madiun, C. Kediri dan D. Blitar).

Analisis Sekuen Nukleotida dan Asam Amino Gen ORF25 CyHV-3 Isolat Lokal

Setelah diketahui masing-masing hasil nukleotida dari PCR dengan primernya, dilakukan penggabungan dengan program GENETYX ver. 10 menunjukkan nukleotidanya sepanjang 1827 bp. Panjang nukleotida yang dihasilkan berbeda dengan referensi *GenBank* NC_009127.1-USA CyHV-3. Menurut referensi *GenBank*, nukleotida NC_009127.1-USA gen ORF25 CyHV-3 sepanjang 1806 bp, perbedaan ini ditunjukkan dengan adanya insersi dan delesi terhadap nukleotida sampel isolat lokal. Bila dibandingkan referensi NC_009127.1 CyHV3 dari USA, insersi untuk isolat sampel dari Malang, Madiun, Kediri dan Blitar ada pada beberapa sekuen yaitu : setelah sekuen ke- 67 → CTG ; sekuen ke-1594 → AA ; sekuen ke-1604 → CTGACCGTCGCCCGACG, sedangkan untuk nukleotida yang mengalami delesi pada sekuen ke-1565,1572,1573 (T,G,A). Adanya penambahan dan pengurangan basa nukleotida ini mengakibatkan bedanya strain isolat lokal dengan USA, Berbeda lagi jika dibandingkan dengan isolate dari referensi china KP004892 CyHV3-China (HZ149) yang memiliki kesamaan sekuennya. Selain itu, jika dibandingkan dengan referensi *GenBank* (nukleotida NC_009127.1-USA gen ORF25 CyHV-3), nukleotida sampel isolat malang ini juga mengalami mutasi titik yaitu pada sekuen ke-1478

(C→G), 1563 (G→A), 1566 (T→A), 1567 (C→G),1568 (C→G), 1577 (T→C), 1581 (A→C), 1582 (A→G), 1584 (C→G), 1586 (C→T), 1587 (G→T), 1588 (A→C), 1591 (C→A), 1592 (T→C), 1596 (C→G), 1597 (G→T), 1600 ((G→A). Selanjutnya untuk isolat sampel dari Madiun mengalami mutasi titik pada sekuen Ke-9 (T→G), 1563 (G→A), 1566 (T→A), 1567 (C→G),1568 (C→G), 1577 (T→C), 1581 (A→C), 1582 (A→G), 1584 (C→G), 1586 (C→T), 1587 (G→T), 1588 (A→C), 1591 (C→A), 1592 (T→C), 1596 (C→G), 1597 (G→T), 1600 (G→A), 1819 (A→G). Hal lain juga telah diketahui bahwa isolat sampel dari Kediri dan Blitar yang mempunyai persamaan sekuen, namun berbeda dengan referensi yaitu selain delesi dan insersi juga terjadi mutasi titik yaitu pada sekuen ke-9 (T→G), 1563 (G→A), 1566 (T→A), 1567 (C→G),1568 (C→G), 1577 (T→C), 1581 (A→C), 1582 (A→G), 1584 (C→G), 1586 (C→T), 1587 (G→T), 1588 (A→C), 1591 (C→A), 1592 (T→C), 1596 (C→G), 1597 (G→T), 1600 (G→A) DAN 1818 (G→A).

Selanjutnya untuk analisis sekuen asam aminonya dengan menggunakan program GENETYX ver. 10 menunjukkan asam amino keempat sampel Jawa Timur sepanjang 608. Panjang asam amino yang dihasilkan berbeda dengan referensi *GenBank* NC_009127.1-USA CyHV-3. Menurut referensi *GenBank*, asam amino NC_009127.1-USA gen ORF25 CyHV-3 sepanjang 601 asam amino, perbedaan ini ditunjukkan dengan adanya insersi dan mutasi titik terhadap asam amino

sampel isolat dari ikan koi Jawa Timur. Bila dibandingkan referensi NC_009127.1 CyHV3 dari USA, insersi untuk isolat sampel dari Malang, Madiun, Kediri dan Blitar ada pada beberapa sekuen yaitu : setelah sekuen ke- 22 → L ; sekuen ke-521 →QGPSTA, sedangkan untuk nukleotida yang mengalami mutasi titik pada sekuen ke-493 dari T→ R pada isolat Malang dan pada sekuen 600 pada referensi USA berubah dari R→ G pada isolat Madiun. Berbeda lagi jika dibandingkan dengan isolate dari referensi china KP004892 CyHV3-China (HZ149) yang memiliki kesamaan sekuennya, hanya berbeda mutasi titik pada sampel Malang (titik 494, T→ R) dan Madiun (titik 607, R→ G). Hal lain juga telah diketahui bahwa isolat sampel dari Kediri dan Blitar yang mempunyai persamaan sekuen, dimana sekuen asam aminonya sama

identik dengan sampel referensi China KP004892 CyHV3-China (HZ149) dan dari Japan AP008984-Japan CyHV-3 (TUMST1) untuk regio gen ORF25nya. Hal ini membuktikan bahwasanya sampel yang khususnya ada di Blitar dan Kediri serta umumnya di wilayah sentra ikan koi Jawa Timur menunjukkan virus penyebab awalnya penyakit KHV berasal dari Negara Cina ataupun Jepang.

Hasil Analisis Homologi Gen ORF25 Virus CyHV3 Ikan Koi Jawa Timur

Susunan nukleotida dan asam amino dari isolat CyHV3 dari Ikan Koi asal Jawa Timur (Malang, Madiun, Kediri dan Blitar) dihomologikan dengan beberapa isolat CyHV-3 lain yang diambil dari *Gene Bank*. Homologi menggunakan program BLAST dan hasilnya dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Nilai homologi nukleotida isolat Jawa Timur padan gen ORF25 terhadap isolat CyHV3 lain dari *Gene Bank*.

Isolat Pemanding	Nilai Homologi (%)			
	Isolat sampel C (Malang)	Isolat sampel D (Madiun)	Isolat sampel E (Kediri)	Isolat Sampel F (Blitar)
sampel C (Malang)	-	99,9	99,7	99,7
sampel D (Madiun)	99,9	-	99,8	99,8
sampel E (Kediri)	99,7	99,8	-	100
sampel F (Blitar)	99,7	99,8	100	-
NC_009127.1-USA CyHV3	98,8	98,7	98,5	98,5
AP008984-Japan CyHV3(TUMST1)	99,9	99,9	99,7	99,7
DQ177346-Israel CyHV3(KHV-I)	98,8	98,7	98,5	98,5
DQ657948-USA CyHV3(KHV-U)	98,8	98,7	98,5	98,5

GU815502-USA CyHV3(FL)	98,8	98,7	98,5	98,5
JQ308816-Korea CyHV3(SNUKHV)	99,8	99,7	99,6	99,6
KJ627438-China CyHv3(GZ11)	99,8	99,7	99,6	99,6
KP004892-China CyHV3(HZ419)	99,9	99,9	99,7	99,7

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa hasil identifikasi molekuler terlihat fragmen ORF 25 CyHV-3 masing-masing sepanjang 696bp, 645 bp dan 618 bp. Masing-masing hasil elektroforesis selanjutnya disekuensing serta digabungkan menjadi sepanjang 1827 bp. CyHV-3 dari ikan Koi daerah Kediri dan daerah Blitar mempunyai sekuen yang identik 100% pada gen ORF25. Untuk isolat Malang, Madiun dan Blitar pada gen ORF25 memiliki homologi sekuen nukleotida hampir mirip sebesar $\pm 99\%$, yaitu sekuen isolat Malang dengan Kediri dan Blitar homologi sebesar 99,7%, isolat Malang dengan Madiun sebesar 99,9% dan isolat Madiun dengan Blitar homologi 99,8%. Ketiga isolat Jawa Timur ini memiliki homologi sekuen lebih mirip dengan isolat referensi Asia yaitu dari Jepang, China dan Korea ($\pm 99\%$) daripada isolat referensi Israel ataupun Amerika ($\pm 98\%$) untuk sekuen gen ORF25-nya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih kepada Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas kesempatan berharga yang diberikan kepada penulis untuk menempuh pendidikan di Program Studi Magister Vaksinologi dan Imunoterapetika Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Serta kepada Kepala Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Surabaya I yang telah mengizinkan menggunakan Laboratoriumnya untuk kegiatan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimous. 2012. Fisiologi Ikan Koi. Online.
<https://zonaikan.wordpress.com/2012/07/01/fisiologi-ikan-koi/>.
- Aoki, T., Hirono, I., Kurokawa, K., Fukuda, Nahary, R., Eldar, A., Davison, A.J., Waltzek, T.B., Bercovier, H., and Hendrick, R.P. 2007. Genome Sequences of Three Koi herpesvirus Isolates

- Representing the Expanding Distribution of an Emerging Disease Threatening Koi and Common Carp Worldwide. *J. Virol.* 81, 5058-5056.
- Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Surabaya I. 2015. Laporan Pemantauan Tahun 2015. Surabaya
- Balai Uji Standar, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan. 2011. Metode Standar Penggunaan Squencer ABI 3130. Jakarta.
- Bercovier, Y. Fishman, R. Nahary, S. Sinai, A. Zlotkin, M. Eyngor, O. Gilad, A. Eldar, R.P. Hedrick. 2005. Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. *BMC Microbiol.* 5, pp. 13-22.
- Dishon A, M. Davidovich, M. Ilouze, M. Kotler. 2007. Persistence of cyprinid herpesvirus 3 in infected cultured carp cells. *J. Virol.*, 9, pp. 4828-4836
- Fusianto, Cahya Kurnia. 2013. Kloning Gen, Ekspresi dan Purifikasi Protein ORF25 Koi herpesvirus Sebagai Kandidat Vaksin. Tesis UGM.
- Gotesman M, Soliman H, El-Matbouli M. 2013. Antibody screening identifies 78 putative host proteins involved in Cyprinid herpesvirus 3 infection or propagation in common carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Diseases.*, 36:721-733.
- 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 Diseases.* 25, 171-178.
- Han, J.E., Kim, J.H., Renault, T., Casiano Jr., C., Shin, S.P., Jun, J.W. and Park, S.C. 2013. Identifying the Viral Genes Encoding Envelope Glycoproteins for Differentiation of Cyprinid herpesvirus 3 Isolates. *Viruses.* 5, 568-576.
- Hedrick, R.P., Marty, G.D., Nordhausen, R.W., Kebus, M., Bercovier, H., Eldar, A. 1999. A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, *Cyprinus carpio*. *Fish Health Newsletter. Fish Health Section. American Fisheries Society* 27:7.
- Hendrianto, Eryk. 2013. Stabilitas Gen Pengkode Protein Envelope (E) Virus Dengue Serotipe 1 Sebagai Kandidat Vaksin Isolat Indonesia. Surabaya. Tesis. Magister Biologi Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Airlangga.
- Hutoran, M., Ronen, A., Perelberg, A., Ilouze, M., Dishon, A., Bejerano, I., Chen, N. & Kotler, M. 2005. Description of an as yet unclassified DNA virus from diseased *Cyprinus carpio* species. *J. Virol.* 79, 1983-1991.
- Kepmen Kelautan dan Perikanan. 2013. *Kep.26/Men/2013*. Tentang Penetapan Jenis-jenis Hama dan Penyakit Ikan Karantina, Golongan, Media Pembawa dan Sebarannya.
- Michel, B., Leroy, B., Stalin Raj, V., Lieffrig, F., Mast, J., Wattiez, R., Vanderplasschen, A.F., and Costes, B. 2010. The Genome of Cyprinid 68

- Herpesvirus 3 Encodes 40 Proteins Incorporated in Mature Virions. *J. Gen Virol.* 91, 452-462.
- Murwantoko. 2009. Cloning ORF2 Membrane Protein of Koi herpesvirus Lake Toba, Indonesian Isolate. *HAYATI Journal of Biosciences.* 16, 49-53.
- Nelson , D.L and Cox, M.M. 2008, *Lehninger Principles of Biochemistry.* Fourth Edition. New York: Macmillan co ltd, Pp 10-15.
- Office International des Epizooties (OIE). 2012. *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animal.* Office International des Epizooties.
- Ouyang P, Rakus K, Boutier M, Reschner A, Leroy B, Ronsmans M, Fournier G, Scohy S, Costes B, Wattiez R, Vanderplasschen A. 2013. The IL-10 homologue encoded by cyprinid herpesvirus 3 is essential neither for viral replication in vitro nor for virulence in vivo. *Vet Res.* 44:53.
- Perelberg, A., Smirnov, M., Hutoran, M., Diamant, A., Bejerano, Y., Kotler, M. 2003. *Epidemiological Description of A new Viral Disease Afflicting Cultured Cyprinus carpio in Israel.*
- Pikarsky E., Ronen A., Abramowitz J., Jevavi-sivan B., Hutoran M., Shapira Y., Steinitz M., Perelberg A., Soffer D. and Kotler M. 2004. *Pathogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus.* *J. Virol.*, 78, 9544–9551.
- Pusat Karantina Ikan. 2010. Pengambilan Contoh Media Pembawa Hidup Air Tawar/Payau/.Laut. Penerbit Puskari. Jakarta
- Pusat Karantina Ikan. 2008. Metode Standar Pemeriksaan HPIK Golongan Virus Koi Herpesvirus (KHV). Penerbit Puskari. Jakarta.
- Rahmawati, Zulfa, Uun Y., Diana A. 2016. Analisis Histopatologi Otot Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang terinfeksi Koi Herpesvirus (KHV) pada kolam pemeliharaan Ikan Mas. Prosiding Seminar Nasional Kelautan 2016. Universitas Trunojoyo. Madura
- Rakus K., I. Irnazarow, M. Adamek, L. Palmeira, Y. Kawana, I. Hirono, H. Kondo, M. Matras, D. Steinhagen, B. Flasz, G. Brogden, A. Vanderplasschen, T. Aoki. 2012. Gene expression analysis of common carp (*Cyprinus carpio* L.) lines during Cyprinid herpesvirus 3 infection yields insights into differential immune responses. *Dev. Comp. Immunol.* 37, pp. 65–76.
- Rakus K., P. Ouyang, M. Boutier, M. Ronsmans, A. Reschner, A. Vancsok, J. Jazowiecka-Rakus and A. Vanderplasschen. 2013. Cyprinid herpesvirus 3: an interesting virus for applied and fundamental research. *Veterinary Research.* 44:85.
- Ronen, A. Perelberg, J. Abramowitz, M. Hutoran, S. Tinman, Y. Bejerano, M.

- Steinitz, M. Kotler. 2003. Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*. *Vaccine*. 21, pp. 4677-4684.
- Rosenkranz D, Klupp BG, Teifke JP, Granzow H, Fichtner D, Mettenleiter TC, Fuchs W. 2008. Identification of envelope protein pORF81 of koi herpesvirus. *J Gen Virol*.89:896-900.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sunarto, A., Mc Coll, K. A., Crane, M. St. J., Sumiati, T. , Hyatt, A. D., Barnes, A. C., and Walker, P. J., 2011. Isolation and Characterization of Koi herpesvirus (KHV) from Indonesia: Identification of a New Genetic Lineage. *Fish Dis J*. 34, 87-101.
- Sunarto, A., Rukyani, A., Cameron, A., and Subasinghe, R. 2004. Outbreak of Disease Causing Mass Mortality in Koi and Common Carp in Indonesia. Workshop on Koi Herpesvirus. London.
- Wahidi, Budi Rianto. 2013. Analisis Filogenetik Gen *Thymidin Kinase* Koi Herpesvirus (KHV) Beberapa Ikan Air Tawar di Sentra Budidaya Provinsi Jawa Timur. Tesis. Program Pascasarjana. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Walker, J.P., 2000. *Molecular epidemiology of viral infection*. CSIRO Tropical Agriculture, Indooroopilly, Queensland, Australia.
- Waltzek T.B., Kelley G.O., Stone D.M., Way K., Hanson L., Fukuda H., Hirono I., Aoki T., Davison A.J. & Hedrick R.P. 2005. Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family *Herpesviridae*. *J. Gen. Virol.* **86**,1659-1667.
- Yuasa K., Sano M., Kurita J., Ito T. & Iida T. 2005. Improvement of a PCR method with the Sph 1-5 primer set for the detection of koi herpesvirus (KHV). *Fish Pathol.***40**, 37-39.
- Yusuf, K. Z. 2010. *POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)* . Saintek Vol 5, No 6. Universitas Negeri Gorontalo.
- Yuwono, T. 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Andi Offset.