

Identifikasi Infeksi *Koi Herpes Virus* (KHV) pada Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR), Imunositokimia dan Imunohistokimia

Identification of Koi Herpes Virus (KHV) Infection in Koi (Cyprinus carpio) Using Polymerase Chain Reaction (PCR), Immunocytochemistry, and Immunohistochemistry Methods

S. Edi*, O. Surfianti, N. Christy, R. Wiis, Laminem, E. R. Ekoputri, M. Fathoni, A. D. Koswara, Nurhaidin¹⁾ dan U. Yanuhar²⁾

Balai Karantina Ikan Kelas I Juanda, Kementerian Kelautan dan Perikanan, Surabaya¹⁾
Dosen di Fakultas Perikanan, Universitas Brawijaya, Malang²⁾

*Korespondensi: Telp 031-8688099, Fax 031-8688118, E-mail:bkijuanda@yahoo.co.id

Abstract

Koi herpes virus (KHV) disease has been diagnosed in koi and goldfish, and KHV is believed to remain in the body of its host to survive so that goldfish have the potential as a carrier virus. The purpose of this test is to look for another alternative method in identifying a particular fish disease Koi Herpes Virus (KHV) that is more simple and practical, rapid, precise and accurate as well as the examination results are expected to match the other examination techniques. Sample testing activities are positively infected with KHV derived from Blitar marked by the characteristics of the most visible of the lesions (injuries) is congestion, bleeding on fins or body, or hemorrhagic on the basis of dorsal fins, pectoral fin, and anal fins and the operculum, necrosis and nodules (nodule) in the gills white. The result of the testing activities identification of KHV by PCR, IHC and ICC were by using PCR samples obtained 7 positive KHV with DNA quality between 1.83 to 1.98 and DNA quantity between 317.89 to 492.08 at 290 bp DNA bands. It can be concluded that the alternative examination or identification of infections of Koi Herpes Virus (KHV) in addition to the koi fish using PCR, immunohistochemistry, also can be developed using immunocytochemistry method (Streptavidin Biotin) due to simpler procedures, work more practical, lower cost, faster time, precise and accurate target.

Keywords: KHV, Koi, PCR, immunocytochemistry, immunohistochemistry

Pendahuluan

Penyakit *Koi Herpes Virus* (KHV) telah didiagnosa pada ikan koi dan ikan mas, namun spesies golongan cyprinid lainnya seperti *common goldfish* (*Carassius auratus*) dan *grass carp* (*Ctenopharyngodon idella*) menunjukkan tidak terserang KHV. Seperti halnya infeksi virus herpes lainnya, KHV diyakini berada dalam tubuh ikan mas yang terinfeksi, sehingga untuk kelangsungan hidupnya ikan mas tersebut berpotensi sebagai *carrier* virus. Amri dan Khairuman (2002) mengatakan bahwa ikan koi (*Cyprinus carpio*) lebih mudah terserang penyakit yang disebabkan oleh kondisi

lingkungan hidup yang tidak stabil dan kondisi daya tahan tubuh ikan yang menurun. Serangan KHV dapat menyebar dengan beberapa cara seperti halnya herpes virus lainnya. Penyebarannya dapat terjadi karena kontak langsung dengan ikan yang terinfeksi, air dari ikan terinfeksi dan atau melalui air atau tanah tempat ikan terinfeksi dipelihara.

Sampai saat ini di negara kita belum ada obat yang sudah teruji untuk digunakan menangkal serangan penyakit akibat *Koi Herpes Virus* (KHV), oleh karena itu perlu adanya identifikasi virus herpes yang menyerang ikan koi sejak dini yaitu terhadap ikan yang bersifat *carrier*,

sehingga sejak dini pula tindakan pencegahan dilakukan. Tindakan pencegahan yang dilakukan antara lain dengan cara mengisolasi ikan yang teridentifikasi KHV dari ikan lainnya (Amri dan Khairuman 2002).

Ada beberapa uji yang sudah sering dilakukan guna mengidentifikasi virus herpes ini yaitu dengan uji imunohistokimia dan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Untuk mengatasi permasalahan tersebut diatas, diperlukan suatu pemeriksaan penunjang alternatif lainnya, yang hasilnya diharapkan mampu mengidentifikasi KHV yang akurat seperti juga dengan kedua metode uji di atas dan pemeriksaan penunjang alternatif lain yang ingin diterapkan yaitu uji Imunositokimia menurut teknik *Streptavidin Biotin* (SB). Penelitian ini bertujuan untuk mencari alternatif lain dalam mengidentifikasi suatu penyakit ikan khususnya KHV yang tepat dan akurat selain dengan metode uji Imunohistokimia dan PCR.

Bahan dan Metode

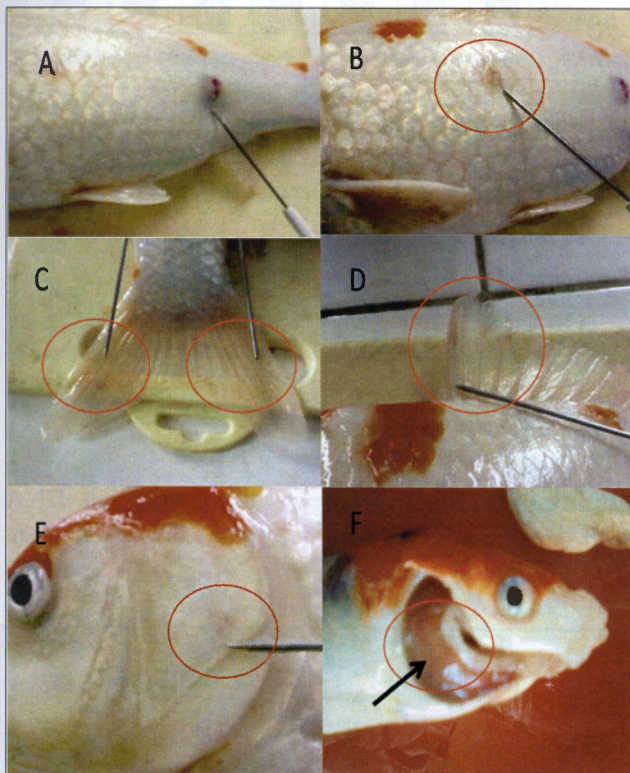
Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Balai Karantina Ikan Kelas I Juanda Surabaya. Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan koi. Bahan uji PCR yang digunakan dalam metode ini yaitu *Agarose gel (2% Gel-O-Shooter)*, Alkohol, *ddH₂O / Nuclease Free Water (PCR Grade Water)*, *Ethidium bromide Kontrol Negatif (ddH₂O)*, *Kontrol Positif KHV 6x Loading dye, Marker (Molecular Weight Ladder)*, *Master Mix (Ready-to-Go-Beads)*, *Primer Mix (Simplex Primer Mix for KHV, TAE buffer, Tri Reagent)*. Bahan imunositokimia dan imunohistokimia yang digunakan dalam metode ini antara lain aseton, larutan *anti-Koi Herpesvirus KHV* monoclonal *antibody*, *biotinylated secondary antibody anti rabbit*, *buffer saline*, *conjugate*, *counter stain (mayer's hematoxylin)*, *Entellan neu*, *10% hydrogen peroxide Block*, *normal goat serum*, (*goat anti-mouse IgG*), *streptavidin-horseradish peroxidase*, *substrat-chromogen solution*. Alat yang digunakan antara lain: *Cover glass*, incubator, lemari es, *Microcentrifuge tubes*, Micropipet P10, P50, P200, P1000, Mikroskop cahaya Objek glass, *Pippettors*, Pellet Pastel, Peralatan Elektrophoresis, Polaroid Film, Polaroid Camera, Sarung Tangan, *Table Top*

Centrifuge/Refrigerated microcentrifuge, *Thermal Cycler*, Timbangan analitik, UV Transilluminator, dan Vortex Mixer. Pengujian pertama sebagai uji pemeriksaan menggunakan metode imunositokimia teknik *Streptavidin Biotin* dengan cara pengamatan hasil (warna apusan) secara mikroskopis. Isolasi insang dilakukan untuk pemeriksaan imunohistokimia dengan cara pengamatan hasil (warna jaringan) secara mikroskopis. Sedangkan isolasi DNA KHV untuk uji PCR sebagai *Golden Standart Method* yang kemudian dilakukan pengukuran kualitas dan kuantitas DNA serta pengamatan hasil (pita DNA) yang positif pada 290 bp. Data yang didapatkan dianalisa menggunakan metode deskriptif kualitatif.

Hasil dan Pembahasan

Sampel ikan koi yang menunjukkan gejala klinis terserang KHV diambil dari petani ikan di daerah Blitar. Sampel dikumpulkan pada bak fiber berukuran 1,5 x 2 x 1 meter dan diadaptasikan selama 1-3 hari dengan tujuan agar ikan sakit yang didapat tidak akan cepat mengalami stress dan akhirnya mati, selain itu juga untuk menularkan virus di dalam air. Pikarsky (2004) mengungkapkan bahwa virus yang berada di dalam air akan tetap efektif dapat menular selama 4 jam. Hal ini menjelaskan bahwa air merupakan salah satu media yang baik dalam penyebaran virus pada ikan. Pintu masuk penyebaran virus pada ikan terutama terjadi melalui insang. Sampel ikan yang diambil dari Blitar sebanyak 20 ekor, setelah diadaptasikan selama 3 hari diperoleh ikan koi yang hidup sebanyak 13 ekor dan yang mati sebanyak 7 ekor. Pada saat proses adaptasi menunjukkan tujuh ikan koi mati dalam semalam. Beberapa diantaranya menunjukkan tanda-tanda klinis berupa perilaku abnormalitas dan disorientasi sebelum kematian. Sedangkan patologi anatomis yang paling terlihat dari ketujuh ikan yang mati tersebut menunjukkan adanya hemoragik dan kongesti pada operculum, sirip ekor, sirip punggung dan operculum serta nodule putih pada insang seperti terlihat pada Gambar 1. Luka yang terjadi pada umumnya hanya superficial (luka yang tidak dalam) berwarna putih susu atau putih keabu-abuan yang terdapat pada 1-2 mm diatas kulit. Luka

tersebut akan bertambah dalam sesuai dengan lama infeksi. Karena penyakit ini jarang terjadi pada ikan yang muda oleh karena itu pencarian sampel diprioritaskan pada ikan yang sudah dewasa.



Gambar 1. Ikan Koi yang terinfeksi KHV. Keterangan: a) Hemoragik pada tubuh, b) Kongesti pada tubuh, c) Kongesti pada sirip ekor, d) Kongesti pada sirip punggung, e) Kongesti pada operculum, f) Nodule putih pada insang.

Uji Pendahuluan

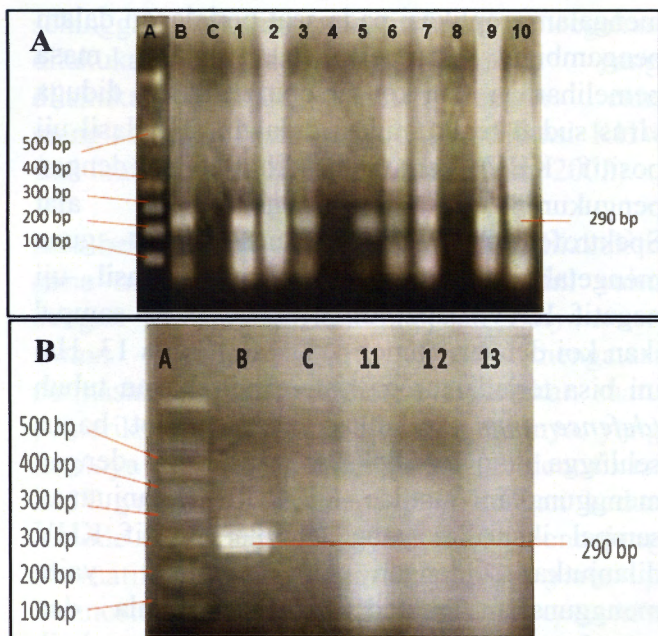
Berdasarkan sampel yang digunakan, dari 13 ekor ikan sampel yang masih hidup dilakukan uji pendahuluan menggunakan metode PCR untuk mengetahui bahwa sampel ikan koi yang akan digunakan benar-benar terdeteksi oleh KHV. Perlakuan ini menghasilkan 7 sampel ikan koi teridentifikasi positif KHV dan 6 ekor ikan lainnya dinyatakan negatif KHV. Hasil uji PCR pada uji pendahuluan dapat dilihat pada Gambar 2a dan 2b. Berdasarkan Gambar 2 bagian a dan b. dengan metode PCR diperoleh hasil uji positif KHV pada sampel ikan koi dengan nomor 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9 dan 10. Ikan koi dengan hasil positif KHV diduga bahwa virus sudah

mengalami replikasi pada saat perjalanan dalam pengambilan sampel dan dalam masa pemeliharaan ikan koi tersebut sehingga diduga virus sudah terakumulasi didalam sel. Hasil uji positif KHV kemudian dilanjutkan dengan pengukuran menggunakan alat Spektrofotometer atau Gene Quant guna mengetahui kemurnian DNANYa. Hasil uji negatif KHV dapat ditunjukkan pada sampel ikan koi dengan nomor 4, 8, 11, 12 dan 13. Hal ini bisa terjadi karena sistem pertahanan tubuh (*defence immunity*) ikan koi tersebut bagus sehingga ikan terdeteksi negatif KHV dengan menggunakan metode uji PCR. Selanjutnya, sampel ikan koi yang terdeteksi positif KHV dilanjutkan dengan uji utama, yaitu menggunakan metode imunositokimia dan metode imunohistokimia dengan teknik *Streptavidin Biotin*.

Pengukuran Kualitas dan Kuantitas DNA KHV

Brown (2003) menyatakan bahwa konsentrasi DNA atau RNA dapat diukur secara tepat dengan spektrofotometer absorben ultraviolet (*ultraviolet absorbance spectrophotometry*). Hasil pengukuran kualitas dan kuantitas seluruh DNA sampel dapat ditunjukkan dengan pengukuran nilai kemurnian DNA sampel menggunakan alat GeneQuant/Spektrofotometer dan ditunjukkan pada Gambar 3a.

Hasil pengukuran kualitas DNA sampel menunjukkan bahwa kemurnian DNA seluruh sampel masih berada pada kisaran rasio 1,8-2,0. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa seluruh sampel memiliki kualitas DNA yang baik. Hasil pengukuran kuantitas seluruh DNA sampel dapat ditunjukkan dengan pengukuran nilai konsentrasi DNA sampel dengan menggunakan alat GeneQuant/Spektrofotometer dan ditunjukkan pada Gambar 3b. Hasil pengukuran kuantitas DNA sampel dapat diketahui bahwa keseluruhan sampel DNA memiliki konsentrasi DNA yang masih dalam kisaran baik. Kontaminasi DNA dan RNA tidak dapat dikenali oleh alat nanodrop spectrometer (Wiliem *et al.* 2009)



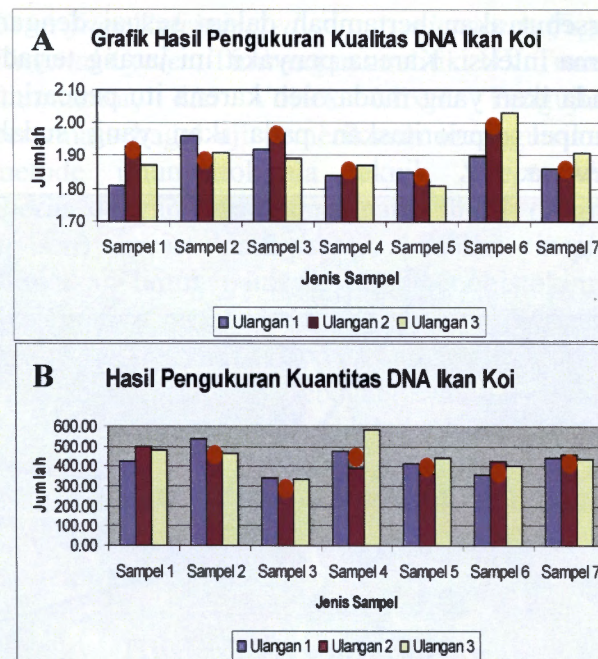
Gambar 2. Hasil uji KHV dengan metode PCR. Keterangan: A. Marker DNA Lamda 100bp – 1000 bp; B. Kontrol Positif KHV (290 bp); C. Kontrol Negatif ddH₂O); 1-10 Sampel ikan koi yang telah diadaptasikan (Gambar 2a). Hasil uji KHV dengan metode PCR (lanjutan). Keterangan : A. Marker DNA Lamda 100bp – 1000 bp; B. Kontrol Positif KHV (290 bp); C. Kontrol Negatif (ddH₂O); 11-13 Sampel ikan koi yang telah diadaptasikan (Gambar 2b).

Uji Utama

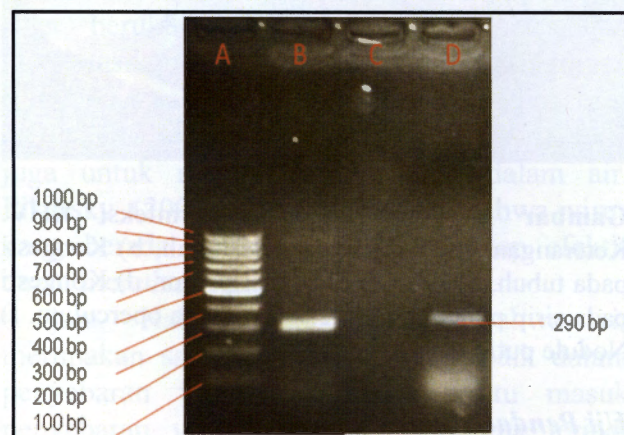
Pemeriksaan KHV dengan Metode PCR

Dari hasil pemeriksaan KHV menggunakan metode PCR sebagai *Golden Standard* Uji diperoleh hasil gambar seperti yang terlihat pada Gambar 4.

Berdasarkan hasil pemeriksaan dengan metode PCR kits pada Gambar 4. diperoleh hasil dari sampel menunjukkan positif KHV pada 290 bp Hal ini dapat dilihat setelah diukur dengan penanda atau marker DNA lamda 100 – 1000 bp dan dibandingkan dengan kontrol positif KHV yang berasal dari kit komersial (Sentra BD). Berdasarkan Gambar 5 didapatkan bahwa sampel ikan uji positif KHV pada 290 bp. Hal ini menunjukkan bahwa terkopinya DNA yang teramplifikasi melalui proses PCR dengan enzim polimerase dapat tervisualisasi.



Gambar 3. Grafik hasil pengukuran kualitas DNA (3a) dan kuantitas DNA (3b) Ikan koi. Keterangan: ● = Rerata kualitas DNA



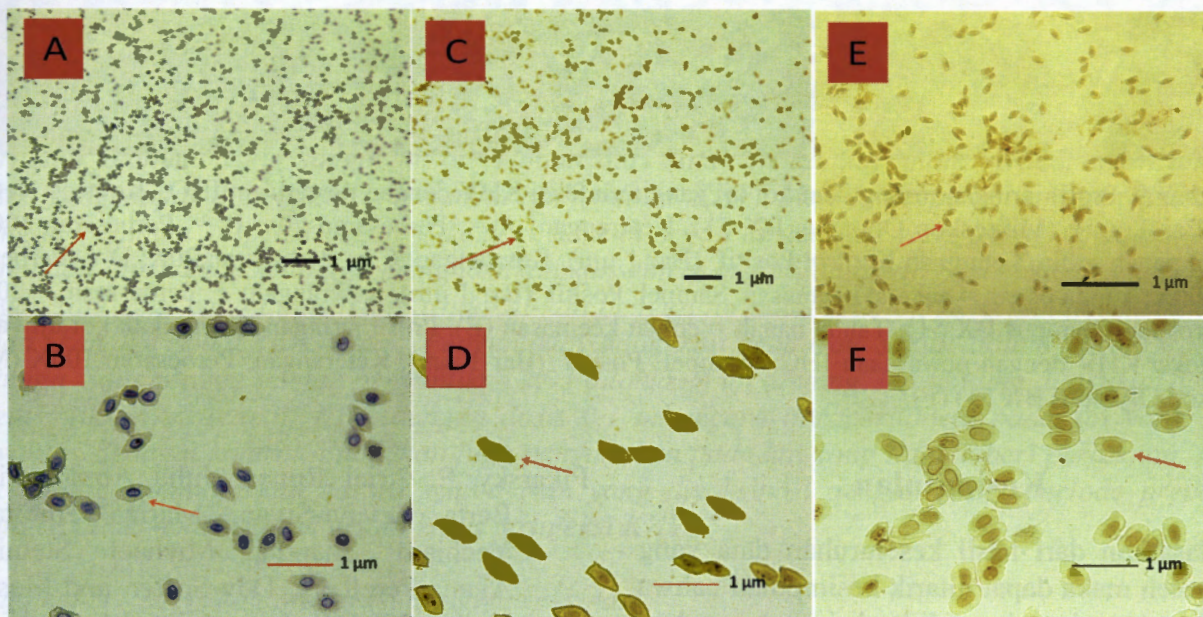
Gambar 4. Hasil uji KHV dengan metode PCR. Keterangan : A. Marker DNA Lamda 100bp – 1000 bp; B. Kontrol positif KHV (290 bp); C. Kontrol negatif (ddH₂O); D: DNA KHV pada ikan koi.

Pemeriksaan KHV Menggunakan Metode Imunositokimia (Streptavidin- Biotin)

Malole (2005) mengatakan bahwa imunositokimia adalah perpaduan antara teknik imunologis dan sitologis. Sedangkan pemeriksaan *imunocytochemistry* (imunositokimia) itu sendiri merupakan salah satu jenis pemeriksaan imunologis, menggunakan metode imuno histo (sito) kimia enzim yang sifatnya spesifik dan bertujuan membantu diagnosis atau mendeteksi adanya antigen atau lokasi antigen, dalam jaringan biopsi, sediaan sitologi atau dapat digunakan

untuk mendeteksi antigen dalam cairan spesimen yang terinfeksi oleh kuman patogen. Aplikasi imuno (sito) kimia di bidang kesehatan hewan antara lain untuk menegakkan diagnosis penyakit infeksi yang mengenai saluran pernafasan (Priyambodo 2001). Sampel yang digunakan pada pemeriksaan imunositokimia teknik *Streptavidin - Biotin* adalah darah dari ikan koi yang diulas tipis dengan teknik *pull film*. Dengan hasil ulasan yang tipis diperoleh

hasil smear darah yang bisa terbaca setelah proses akhir *staining*. Kontrol negatif uji KHV metode imunositokimia dengan hasil warna biru keunguan dapat dilihat pada Gambar 6 (A dan B). Kontrol positif uji KHV metode Imunositokimia dengan hasil warna coklat keemasan dapat dilihat pada Gambar 6 (C dan D). Hasil pengujian KHV dengan metode Imunositokimia pada ikan koi dapat dilihat pada Gambar 6 (E dan F)

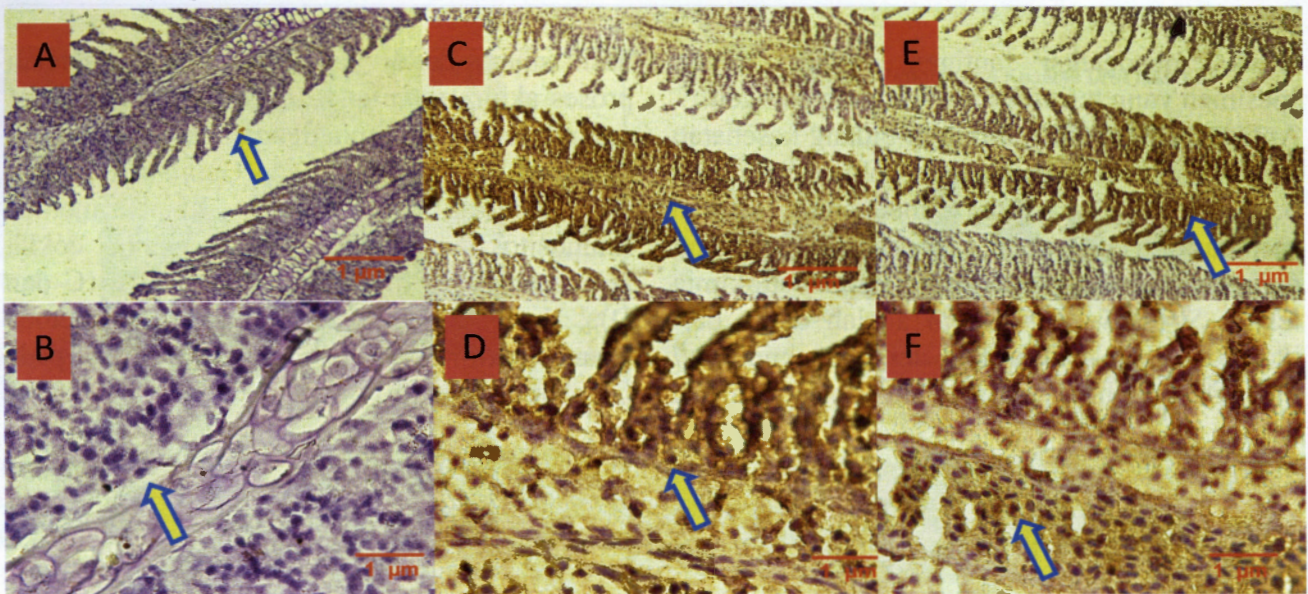


Gambar 8. Profil apusan darah ikan koi yang terinfeksi KHV dengan pewarnaan ICC teknik *Streptavidin Biotin*: Kontrol Negatif (Bar 1 µm) (Mikroskop Olympus BX 51). Keterangan: A = Perbesaran 20 x; B = Perbesaran 100x; tanda panah = biru keunguan. Kontrol Positif (Bar 1 µm) (Mikroskop Olympus BX 51)). Keterangan: C = Perbesaran 20x; D = Perbesaran 100x; tanda panah = coklat keemasan. Sampel Positif (Bar 1 µm) (Mikroskop Olympus BX 51). Keterangan: tanda panah = coklat keemasan; Perbesaran 20x (E). Profile apusan darah ikan

Pemeriksaan KHV Menggunakan Metode Imunohistokimia (Streptavidin- Biotin)

Dalam penelitian ini, metoda imunohistokimia (IHC) merupakan metoda spesifik dalam menentukan apakah jaringan terinfeksi virus KHV. Hasil IHC positif pada semua sampel menandakan terjadinya ikatan antara antigen KHV dengan antibodi yang digunakan. Ikatan yang terbentuk kemudian diikat kembali dengan antibodi sekunder, dan dengan penambahan substrat chromogen (*DAB*) akan menghasilkan warna coklat atau reaksi positif, sehingga lokasinya dapat diamati dengan mikroskop cahaya. Kontrol negatif uji KHV metode Imunohistokimia dengan hasil warna biru keunguan dapat dilihat pada Gambar 7 (A dan B). Kontrol positif pada Gambar 7 (C

dan D), reaksi positif IHC tidak hanya ditemukan pada lamela insang, tetapi juga pada cartilago insangnya. Hal ini menandakan bahwa virus KHV berada di dalam organ tersebut yang menyebabkan terjadinya ikatan yang sangat spesifik antara antibodi dan antigen target. Bila dibandingkan dengan hasil pemeriksaan infeksi KHV pada ikan koi menggunakan metode imunohistokimia teknik *streptavidin biotin* dengan organ target berupa insang yang mana hasil akhirnya terekspressi warna coklat keemasan pada lamela dan cartilago maka memperoleh hasil yang sesuai secara kualitatif dan dapat dilihat pada Gambar 7 (E dan F).



Gambar 9. Profil jaringan insang ikan koi uji yang terinfeksi KHV dengan pewarnaan IHC: Kontrol Negatif (Bar 1 µm); (Mikroskop Olympus BX 51). Keterangan: A = Perbesaran 20x; B = Perbesaran 100x; Tanda panah = biru keunguan Kontrol Positif (Bar 1 µm). Keterangan: C = Perbesaran 20X; D = Perbesaran 100X; Tanda panah = coklat keemasan. Sampel Positif (Bar 1 µm). Keterangan: Perbesaran 20X; (Mikroskop Olympus BX 51); Tanda panah = coklat keemasan (E). Profil jaringan insang ikan koi uji yang terinfeksi KHV dengan pewarnaan IHC: Sampel Positif (Bar 1 µm). Keterangan: Perbesaran 100X (Mikroskop Olympus BX 51) (F).

Kesimpulan

Berdasarkan dari hasil keseluruhan data yang diperoleh maka dapat ditarik kesimpulan bahwa Koi herpes virus dapat dideteksi menggunakan metode imunologi terutama immunositokimia yang dapat digunakan sebagai metode standart dalam menentukan diagnosa penyakit herpes pada ikan koi akibat infeksi virus KHV.

Daftar Pustaka

- Amri K, Kahiruman. 2002. *Menanggulangi Penyakit Pada Ikan Mas Dan Koi*. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Brown TA. 2003. Pengantar Kloning Gena, Yayasan Essentia Medica, Yogyakarta, 274 hal.
- Malole. 2005. Bahan Teori dan Praktikum Apresiasi Teknik Virologi dan PCR Penyakit Hewan Aquatik. Balai Besar Karantina Ikan Soekarno - Hatta. Yakarta.
- Pikarsky E, Ariel Ronen, Julia Abramowitz, Berta Levavi-Sivan, Marina Hutoran, Yechiam Shapira, Michael Steinitz, Ayana Perelberg, Dov Soffer, and Moshe Kotler. 2004. Pathogenesis of Acute Viral Disease Include in Fish by Carp Intertitial Nephritis and Gill Necrosis Virus. *Journal of Virology* 78 (17):9544-9551.
- Priyambodo, 2001. Deteksi Bakteri Berselubung Antibodi dalam Sedimen Air Kemih Dengan Uji Streptavidin Biotin. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Sambrook J, Russel DW, 2003. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.. Chapter 8: In vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction.
- Williem VW, Rosenbaum H, Weiner DB. 2009. Effect of RNA Concentration on cDNA Synthesis For cDNA Amplification, *Genome Research*, 1992 2: 86-88, Downloaded from genome.cshlp.org on March 23, 2009 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Pres