

Identifikasi *Koi Herpesvirus* dengan Uji Immunopatologi Imunohistokimia *Streptavidin Biotin* pada Ikan Mas Karier

(IDENTIFICATION OF KOI HERPESVIRUS USING IMMUNOPATHOLOGIC IMMUNOHISTOCHEMISTRY OF STREPTAVIDIN BIOTIN IN THE COMMON CARP CARRIERS)

Raden Wasito¹, Hastari Wuryastuti², Bambang Sutrisno³

^{1,3}Bagian Patologi, ²Bagian Ilmu Penyakit Dalam,
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada
Jln. Fauna No. 2, Kampus UGM, Yogyakarta
Telepon Kantor: 0274 884839
E-mail: wst_ugm@yahoo.com

ABSTRAK

Dalam rangka program nasional rutin pemberantasan *koi herpesvirus* (KHV) di Indonesia, diperlukan uji berbasis bioteknologi, yaitu imunopatologi imunohistokimia *streptavidin biotin* (IHK SB) dengan antibodi yang dapat diaplikasikan secara aman, cepat dan akurat, sehingga diharapkan dapat mendukung percepatan pencapaian ketahanan pangan protein hewani nasional. Penelitian ini ditujukan untuk mengembangkan dan mengaplikasikan uji imunohistokimia *streptavidin biotin* (IHK SB) dalam upaya melacak KHV pada ikan mas karier. Pada penelitian ini digunakan 48 ekor ikan mas (*Cyprinus carpio*), yang tampak sehat, berasal dari tambak ikan mas di Daerah Istimewa Yogyakarta yang pernah mengalami wabah KHV dengan angka kematian ikan mas yang tinggi pada tahun 2008-2009. Semua ikan mas dikorbankan dan dinekropsi. Insang dibuat sediaan histopatologi diuji *streptavidin biotin* dengan antibodi monoklonal anti-*koi herpesvirus*. Hasil penelitian ini membuktikan, bahwa semua (48) insang ikan mas positif KHV. Berdasarkan hasil penelitian ini disimpulkan, bahwa pendekatan uji berbasis bioteknologi, yaitu imunopatologi imunohistokimia *streptavidin biotin*: sensitif dan mampu secara konsisten, cepat dan tepat mendeteksi virus DNA (KHV) kondisi lapangan pada insang ikan mas yang tampak sehat dan ikan-ikan mas tersebut tampaknya berperan sebagai sumber penularan (karier) KHV dan menularkan KHV pada ikan lain yang peka.

Kata-kata kunci: *Koi herpesvirus*, imunopatologi, *streptavidin biotin*, ikan mas karier KHV, insang

ABSTRACT

In managing the *koi herpesvirus* (KHV) outbreaks as a routine national program in Indonesia, testing based on biotechnology, such as immunopathologic immunohistochemical approach(es) using antibody that is safe, rapid and accurate need to be applied. This will hopefully assist the Government of Indonesian in improving and enhancing the sustainability of national animal proteins program. The present study was aimed to develop and apply the immunopathologic immunohistochemistry of streptavidin biotin (IHC SB) for detection of KHV in the apparently normal carps. The gills from 48 common carps (*Cyprinus carpio*) that appear to be healthy were prepared for DNA-based KHV by IHC SB. Common carps were collected from fish farms which had an outbreak of KHV in 2008-2009 in Yogyakarta. All fish were necropsied. The gills were processed histopathologically and then stained for IHC SB with monoclonal antibody anti-KHV. We demonstrated that all of the fish gills were positive for KHV antigen. Thus, it is concluded that method is useful and consistent, very sensitive and rapid, and is a reliable method to be applied for field condition to detect antigen KHV in the gills of normal, healthy looking carps. In addition, and more importantly, the fish can act as a source of KHV (carriers for KHV) and may result in the spread of diseases among susceptible fish.

Keywords: *Koi herpesvirus*, immunopathologic, *streptavidin, biotin*, common carps, carriers, gills

PENDAHULUAN

Koi herpes virus (KHV) yang juga dikenal dengan nama *cyprinid herpes virus-3* (*CyHV-3*) merupakan penyakit viral yang sangat menular. Virus tersebut mampu menyebabkan morbiditas dan mortalitas yang sangat signifikan pada ikan mas (*Cyprinus carpio*). Pada umumnya, di banyak negara ikan mas tersebut digunakan sebagai pangan dan juga diseleksi untuk ditanakkan dan dibudidayakan untuk keperluan industri sebagai ikan hias peliharaan yang dikenal sebagai ikan koi. Di Indonesia, ikan mas dikonsumsi secara luas, sedangkan ikan koi dipelihara hanya sebagai ikan hias (Koi News, 2002).

Infeksi KHV mewabah hampir di semua negara di dunia, termasuk Indonesia (Body *et al.*, 2000; Pikarsky *et al.*, 2004). Wabah KHV pertama kali diketahui terjadi di Inggris pada tahun 1996 (ISID, 2010b). Virus KHV mulai mewabah di Indonesia pada tahun 2002 melalui perdagangan ikan lintas negara. Sejak saat itu, KHV menyegar ke Pulau Sumatra, Jawa, dan Bali. Penyebaran KHV tersebut mengakibatkan banyak kerugian pada industri akuakultur dan ikan koi di Indonesia (IPB, 2010a). di Indonesia, kerugian akibat infeksi KHV di bidang perikanan mencapai 5,5 miliar dolar AS sejak wabah awal KHV yang terjadi pada tahun 2002 (FSH/A, 2004).

Gejala klinis yang paling menonjol akibat infeksi KHV adalah adanya angka mortalitas yang tinggi dalam waktu yang mendadak, yaitu 1-2 hari setelah infeksi. Gejala klinis yang lain adalah nekrosis berbentuk bercak-bercak keputihan di bagian insang, mata melesak, perdarahan insang, dan infeksi sekunder bakteri maupun infestasi parasit (ISID, 2010b).

Penularan KHV dapat terjadi melalui kontak langsung dengan ikan penderita KHV, cairan yang berasal dari ikan yang terinfeksi dan air yang terkontaminasi KHV, lumpur, kotoran maupun reservoir yang terkontaminasi KHV yang ada di lingkungan perairan. Virus menginfeksi ikan-ikan lain yang peka melalui insang atau mungkin juga melalui saluran pencernaan (Dishon *et al.*, 2005). Dilaporkan, bahwa suhu air berpengaruh besar terhadap infektivitas KHV, yaitu ikan yang terinfeksi KHV menjadi sakit dan kemudian mati, atau bahkan hidup dan menjadi karier KHV pada ikan-ikan lain yang peka (OATA, 2001).

KHV dilaporkan seperti halnya infeksi virus herpes, dapat hidup dalam tubuh ikan yang

terinfeksi selama-lamanya, sehingga, ikan yang terinfeksi maupun ikan-ikan yang sembuh dari infeksi KHV harus dianggap sebagai karier virus KHV (OATA, 2001). Bergman *et al.*, (2006) melaporkan telah berhasil mendeteksi DNA KHV pada ikan-ikan mas ataupun ikan-ikan hias yang lainnya yang tampak sehat atau tidak menunjukkan adanya gejala klinis KHV. Hal tersebut membuktikan, bahwa ikan-ikan tersebut dapat beraksi sebagai karier KHV dan menyebabkan penyakit KHV pada ikan-ikan mas yang peka. Ikan mas pembawa KHV tidak menunjukkan gejala klinis sakit KHV.

Diagnosis KHV berdasarkan isolasi virus dan uji PCR mempunyai keterbatasan dalam hal sensitivitas (Bercovier *et al.*, 2005) sehingga diperlukan metode pendekatan diagnosis yang baru untuk peneguhan diagnosis KHV, yaitu uji imunopatologi imunohistokimia *streptavidin biotin*.

Aplikasi dan pengembangan pendekatan uji bioteknologi berbasis antibodi, yaitu imunopatologi imunohistokimia *streptavidin biotin* untuk deteksi DNA virus KHV pada ikan mas karier adalah sangat penting. Mengingat, bahwa penanganan wabah KHV pada ikan mas dan ikan koi selama ini selalu terlambat dan pada kasus infeksi KHV, ikan mas penderita KHV dapat terlihat tampak normal (sehat) atau tidak menunjukkan gejala klinis sakit, tetapi bertindak sebagai sumber utama penularan infeksi (karier) KHV karena secara terus menerus mengeluarkan KHV di lingkungan perairan sekitar dan mampu menginfeksi ikan-ikan lain yang peka. Dengan demikian, tujuan dari penelitian ini adalah mengaplikasikan pendekatan uji bioteknologi berbasis imunopatologi untuk deteksi dini KHV pada ikan mas yang tampak sehat atau tidak menunjukkan gejala klinis (ikan mas karier KHV). Pendekatan uji diagnosis dini KHV berbasis bioteknologi hasil penelitian ini, sangat penting untuk diterapkan rutin dalam menyaring ikan-ikan mas terhadap ada/tidaknya ikan-ikan mas karier KHV di Laboratorium Kesehatan Hewan dan Ikan, termasuk Karantina Hewan dan Ikan di seluruh Indonesia. Hal tersebut diperlukan dalam rangka program kontrol dan pengendalian, termasuk pencegahan dan eradikasi KHV di Indonesia. Dengan demikian, diharapkan, akan mampu mengoptimalkan kualitas dan peningkatan produksi hasil perikanan budidaya air tawar, terutama ikan mas dan membantu mempercepat tercapainya kebutuhan konsumsi pangan protein hewani nasional

METODE PENELITIAN

Sampel Ikan

Pada penelitian ini, digunakan 48 ekor ikan mas (*C. carpio*) yang dikoleksi dari kolam-kolam atau tambak-tambak ikan mas yang terdapat di Daerah Istimewa Yogyakarta yang berdasarkan anamnesis, ikan-ikan mas yang dipelihara di kolam-kolam atau tambak-tambak tersebut sebelumnya pernah mengalami wabah *koi herpesvirus* dengan angka morbiditas dan mortalitas relatif cukup tinggi. Bobot badan ikan bervariasi, berkisar antara 200-300 g dan 500-700 g. Ikan-ikan mas tersebut tampak sehat, yaitu tidak terlihat adanya gejala klinis dan lesi patologi anatomi terinfeksi *koi herpesvirus*, serta nafsu makan semua ikan juga normal pada saat dikoleksi sebagai sampel pada penelitian ini.

Semua ikan mas dikorbankan dinekropsi. Organ insang diambil, difiksasi formalin dan digunakan untuk uji imunopatologi imunohistokimia *streptavidin biotin* untuk melacak KHV.

Uji Imunopatologi Imunohistokimia *Streptavidin Biotin Koi Herpesvirus*

Sediaan jaringan insang ikan mas (*C. carpio*) di-deparafinisasi dengan xilen, rehidrasi dengan larutan ethanol konsentrasi bertingkat menurun, dicuci dengan aquades dan akhirnya dibersihkan dengan PBS 0,05M, pH 7,1. Sediaan jaringan kemudian direndam dalam larutan H₂O₂ 3% dalam metanol absolut untuk menginaktivasi aktivitas peroksidase endogen, dicuci PBS tiga kali dan kemudian direndam serum normal tikus putih selama 20 menit. Selanjutnya, sediaan jaringan diinkubasi dengan antibodi monoklonal anti-*koi herpesvirus* selama 45 menit pada suhu kamar (Santa Cruz Biotechnology). Sediaan jaringan kemudian dicuci dengan dengan aquades steril dan langsung diinkubasi dengan antibodi sekunder (antibodi babi berlabel biotin antimencit IgG) (Dako) selama 10 menit. Selanjutnya, diberi konjugat *streptavidin-horseradish peroxidase* (BD PharMingen, San diego, CA) selama 10 menit pada suhu kamar, selanjutnya diberi larutan 3,3'-diaminobenzidine (Zymed Corp., San Francisco, CA) selama tiga menit sebagai pewarna antibodi anti-KHV yang terikat pada jaringan insang. Sediaan jaringan selanjutnya diberi pewarna dasar hematoksilin-eosin, dehidrasi, dibersihkan dengan cara dicuci dengan aquades yang dialirkan, diberi medium

perekat gliserol dan ditutup dengan gelas penutup untuk diamati di bawah mikroskop.

Analisis Statistika

Jaringan insang yang telah diuji imunopatologi imunohistokimia *streptavidin biotin* diperiksa di bawah mikroskop dan dianalisa secara deskriptif.

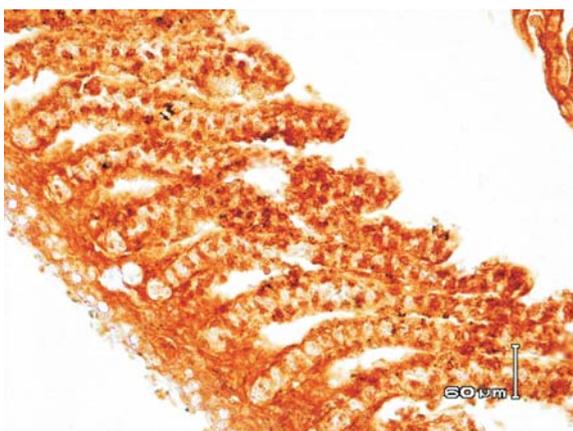
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, digunakan 48 sampel ikan mas (*C. carpio*) yang berasal dari 12 tambak budidaya ikan mas dari Daerah Istimewa Yogyakarta yang berdasarkan anamnesis pernah mengalami wabah *koi herpes virus*. Meskipun tambak-tambak ikan mas tersebut sebelumnya pernah mengalami wabah KHV dengan angka morbiditas dan mortalitas yang relatif tinggi, tetapi sampai saat ini, belum ada laporan, bahwa KHV pernah mewabah lagi. Pada penelitian ini, berdasarkan hasil pemeriksaan gejala klinis dan lesi patologi anatomi, 48 ekor ikan mas tersebut tidak menunjukkan adanya gejala klinis dan lesi patologi anatomi. Semua ikan mas mempunyai nafsu makan yang baik dan terlihat sehat. Pada ikan yang terinfeksi KHV akan mengalami penurunan nafsu makan, berenangannya tidak beraturan. dan frekuensi pernafasan meningkat (Gray *et al.*, 2002). Ikan penderita KHV, pada pemeriksaan patologi anatomi, akan terlihat kurus, *cahexia*, *enophthalmia* (mata melesak), nekrosis sirip, perdarahan pada basis sirip dan kulit. Demikian juga, pemeriksaan semua insang-insang ikan mas yang digunakan sebagai sampel pada penelitian ini, tidak ada lesi patologis anatomis. Insang tampak normal berwarna merah terang, jernih dan homogen (Gambar 1). Dilaporkan, bahwa pada ikan mas KHV, pada insang terdapat banyak mukus (Zrnc'ic' dan Oraic, 2009), dan pada insang terlihat ada nekrosis, bercak-bercak berwarna kemerahan dan keputihan, insang juga tampak berdarah (Oh *et al.*, 2001; Kurnia, 2010). Hasil penelitian pendahuluan dengan uji imunopatologi imunohistokimia *streptavidin biotin* pada spesimen insang seekor ikan mas yang tampak sehat yang berasal dari daerah endemik KHV yang merupakan koleksi dari Balai Karantina Ikan, Sepinggan, Balikpapan, Kalimantan Timur membuktikan adanya antigen KHV *in situ* (Wasito dan Wuryastuti, 2011).

Semua insang yang tampak sehat dan berasal dari 48 ekor ikan-ikan mas (*C. carpio*) pada penelitian ini seperti yang telah disebutkan di atas, digunakan sebagai spesimen untuk pendekatan uji imunopatologi imunohistokimia *streptavidin biotin* dengan antibodi monoklonal anti-KHV. Hasil penelitian ini membuktikan, bahwa antigen virus DNA terdeteksi pada insang-insang yang berasal dari semua (48 ekor) ikan-ikan mas yang tidak menunjukkan gejala klinis maupun lesi patologi anatomi yang berasal dari kolam-kolam ikan mas di Daerah Istimewa Yogyakarta. Jaringan insang, yaitu sel-sel epitel, sel Clara maupun sel-sel endotel pembuluh darah terlihat berwarna coklat yang merupakan lokasi antigen virus DNA KHV (Gambar 2-3).



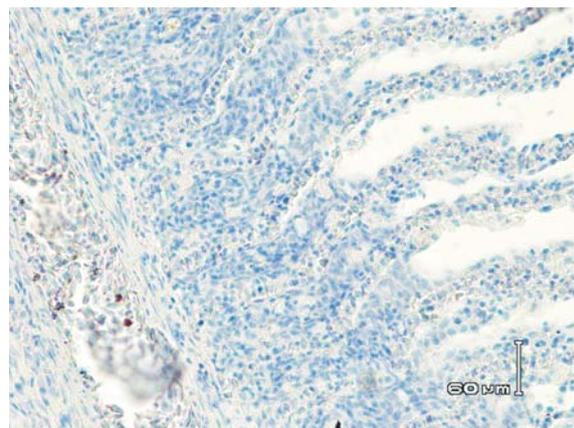
Gambar 1. Insang tampak normal berwarna merah terang, jernih dan homogen yang digunakan pada penelitian ini.



Gambar 2. Insang ikan mas yang tampak normal sehat dari Sariharjo, Ngaglik, Sleman dengan *streptavidin biotin* (SB) dengan antibodi monoklonal anti koi herpesvirus (KHV) yang diwarnai 3-3'-diamino-benzidine positif KHV berwarna coklat kemerahan (SB, 1000x.).

Sebenarnya ada empat metode diagnosis imunopatologi imunohistokimia yang dapat diaplikasikan dalam peneguhan diagnosis penyakit, yaitu *peroxidase anti peroxidase* (PAP), *alkaline phosphatase anti alkaline phosphatase* (APAAP), *avidin biotin complex* (ABC) dan *streptavidin biotin* (SB). Tetapi, meskipun demikian, pada penelitian ini diaplikasikan metode SB. Hal tersebut karena pada metode SB digunakan *streptavidin* yang merupakan protein yang berasal dari bakteri, *Streptomyces avidinii*. *Streptavidin* pada metode SB mempunyai kemampuan mengikat *biotin* yang sangat kuat atau jauh lebih kuat daripada *avidin* yang digunakan pada metode ABC karena *avidin* berasal dari protein putih telur. *Streptavidin* mempunyai bobot molekul 60.000 dalton dan terdiri dari empat subunit identik. Setiap subunit mempunyai satu bagian ikatan untuk *biotin*. *Streptavidin* mempunyai titik isoelektrik yang mendekati netral. *Streptavidin* tidak bermuatan positif dalam kondisi fisiologi sehingga tidak menghasilkan ikatan non-spesifik. Ikatan non-spesifik juga dapat diakibatkan oleh adanya interaksi antara rantai sisi karbohidrat dengan protein yang menyerupai lektin dalam jaringan. Pada *streptavidin*, tidak ada kandungan karbohidrat sehingga menghasilkan latar belakang yang lebih bersih dan *signal* yang lebih kuat daripada *noise*. Dengan SB terhindar reaksi positif palsu.

Hasil uji imunopatologi positif diamati di bawah mikroskop dan didasarkan pada analisis deskriptif adanya warna yang terlihat, misalnya



Gambar 3. Sediaan imunopatologi imunohistokimia *streptavidin biotin* (SB) pada insang yang tampak normal sehat dari Sariharjo, Ngaglik, Sleman dengan *streptavidin biotin* sebagai kontrol negatif yang diwarnai 3-3'-diamino-benzidine. Insang negatif KHV berwarna kebiru-biruan (SB, 1000x.).

jika digunakan senyawa pembawa warna (kromogen) *diamino-benzidine* (DAB) terlihat berwarna coklat muda sampai coklat tua ataupun berwarna coklat kemerahan dengan kromogen *amino ethyl carbazole* (AEC) (Wasito dan Wuryastuti, 2011). Dengan demikian, pada penelitian ini, dipilih pendekatan uji imunopatologi *streptavidin biotin* (SB) yang diwarnai dengan DAB. Meskipun, aplikasi imunopatologi imunohistokimia untuk deteksi KHV telah dilaporkan sebelumnya (Rosenkranz *et al.*, 2008), tetapi pada penelitian ini digunakan ikan-ikan mas di kolam atau tambak ikan, tidak digunakan ikan-ikan mas yang diinduksi KHV secara eksperimental *in vivo* ataupun pada biakan sel KHV *in vitro*. Pada penelitian ini, juga diaplikasikan SB yang *streptavidin*-nya mengikat *biotin* jauh lebih kuat daripada *avidin* pada metode ABC sehingga akan meningkatkan sensitivitas dan menghilangkan reaksi postif palsu (Wasito dan Wuryastuti, 2011). Juga, antibodi monoklonal yang digunakan akan meningkatkan spesifitas uji.

Adanya antigen (DNA virus KHV) pada insang yang berasal dari ikan-ikan mas yang tampak normal sehat seperti pada hasil penelitian ini, ada kemungkinan, bahwa virus KHV dapat berdifusi dari dalam mukus insang masuk ke dalam air dan bersifat infeksi yang secara efisien mampu menginduksi penyakit KHV pada ikan-ikan lain yang peka. Hipersekresi mukus dianggap sebagai gejala klinis dan lesi patologi awal infeksi KHV. Juga dilaporkan, bahwa DNA KHV telah berhasil dideteksi dalam konsentrasi tinggi di dalam mukus ikan mas terinfeksi KHV (Gilad *et al.*, 2004). Penularan KHV pada ikan mas terutama melalui insang dan insang merupakan tempat utama masuknya KHV sehingga menyebabkan terinfeksi ikan mas juga telah banyak dilaporkan (Perelberg *et al.*, 2003; Gilad *et al.*, 2004; Dishon *et al.*, 2005; Miyazaki *et al.*, 2008). Kulit di bagian sirip dan tubuh ikan mas juga dianggap sebagai tempat masuknya virus sehingga ikan-ikan mas dapat terinfeksi KHV (Costes *et al.*, 2009), dan selanjutnya terjadi penyebaran sistemik KHV yang berasal dari insang dan kulit ke organ-organ internal di dalam tubuh ikan. Organ atau jaringan internal yang merupakan predileksi infeksi KHV adalah: ginjal, limpa, otak, saluran pencernaan, dan hati (Hedrick *et al.*, 2000; Gray *et al.*, 2002; Gilad *et al.*, 2003). Hal tersebut terbukti dengan berhasil dilacak konsentrasi tinggi DNA KHV pada organ-organ internal tersebut (Pikarsky *et al.*,

2004; Dishon *et al.*, 2005). Dengan demikian, selain mukus yang dihasilkan oleh insang sebagai sumber penularan virus, ekskresi virus bersama urin dan tinja dianggap juga berperan penting dalam mekanisme penyebaran dan penularan KHV pada ikan-ikan lain yang peka (Gilad *et al.*, 2004; Dishon *et al.*, 2005).

Beberapa penelitian membuktikan, bahwa faktor lingkungan, terutama temperatur air lingkungan berperan penting dalam kejadian wabah KHV. Di negara-negara yang mempunyai empat musim, wabah KHV terjadi terutama pada musim semi dan musim gugur, yaitu ketika temperatur air berkisar antara 18^o-26^o C (Bretzinger *et al.*, 1999; Hedrick *et al.*, 2000; Perelberg *et al.*, 2003). Pada biakan sel *koi fin* (KF-1) *in vitro*, pertumbuhan optimal KHV adalah pada suhu 20-25^o C, tetapi tidak mengalami pertumbuhan pada temperatur 30^o C atau 40^o C, serta mengalami pertumbuhan terbatas pada suhu 10^o C (Gilad *et al.*, 2003). Batas temperatur air di lingkungan yang diperlukan oleh KHV untuk hidup dan berproliferasi telah dimanfaatkan oleh para petambak ikan mas maupun koi dalam rangka kontrol, termasuk pencegahan, pengendalian dan eradikasi KHV di tambak-tambak ikan budidaya.

Pada penelitian ini, ada DNA KHV pada semua ikan-ikan mas yang tampak sehat dan juga mengkonsumsi pakan secara normal pada saat dikoleksi untuk digunakan sebagai sampel penelitian. Uji imunopatologi juga membuktikan, bahwa ikan-ikan mas tersebut terinfeksi persisten KHV. Apakah hal tersebut membuktikan, bahwa ikan-ikan mas tersebut adalah benar-benar karier KHV yang dapat menyebarkan dan menularkan virus pada ikan-ikan lain yang peka atau apakah virus dapat direaktivasi sehingga menjadi infeksi akibat adanya stress, misalnya lingkungan yang kurang serasi atau perubahan temperatur perlu dibuktikan lebih lanjut.

Metode deteksi infeksi virus, terutama KHV telah mengalami kemajuan yang sangat pesat mulai dari aplikasi uji *polymerase chain reaction* konvensional dan pendekatan isolasi KHV pada biakan sel *in vitro* sampai dengan pengamatan partikel-partikel virus (*virion*) KHV dengan mikroskop elektron (skanning maupun transmisi) pada organ atau jaringan ikan sebagai sampel (Gilad *et al.*, 2002; Gray *et al.*, 2002). Pendekatan uji diagnosis yang telah disebutkan di atas, telah dilaporkan, dan pada

umumnya, tidak mampu diaplikasikan dalam peneguhan diagnosis KHV secara rutin pada sampel jaringan ikan-ikan mas ataupun koi yang terinfeksi persisten atau ikan karier KHV. Ikan-ikan karier KHV merupakan ikan-ikan yang sangat penting untuk dideteksi sehubungan dengan usaha-usaha kontrol atau pencegahan wabah KHV, terutama di Indonesia. Menurut Kurnia (2010), diagnosis definitif KHV dapat dilakukan dengan *polymerase chain reaction*, tetapi diagnosa dini KHV masih sulit dilakukan, termasuk terhadap ikan-ikan karier KHV. Pada tingkat nasional, diperlukan adanya petunjuk praktis uji diagnosis KHV yang mampu mendeteksi infeksi KHV pada ikan-ikan mas yang terinfeksi persisten atau berpotensi sebagai karier KHV di lapangan, terutama di kolam-kolam atau tambak-tambak ikan budidaya dalam rangka kontrol patogen tersebut pada ikan-ikan lain yang peka. Hasil penelitian ini membuktikan teridentifikasinya protein KHV dengan pendekatan uji berbasis imunopatologi imunohistokimia *streptavidin biotin* dengan antibodi monoklonal yang sensitifitas dan spesifitasnya telah diketahui pada ikan-ikan mas yang tampak sehat di lapangan, yaitu di kolam-kolam atau tambak-tambak ikan budidaya tradisional.

Penelitian lanjutan akan dilakukan untuk menentukan sisi potensial adanya DNA KHV pada ikan-ikan mas yang terinfeksi persisten tersebut dengan pendekatan berbasis bioteknologi melalui uji imunopatologi molekuler *polymerase chain reaction* (PCR). Teknik ekstraksi modern akan dilakukan pada insang yang tertanam parafin sehingga akan diperoleh ekstrak DNA yang akan diamplifikasi dengan PCR primer DNA KHV dan akhirnya akan diperoleh pasangan basa DNA KHV sasaran pada ikan mas terinfeksi persisten KHV.

SIMPULAN

Pendekatan uji berbasis bioteknologi, yaitu imunopatologi imunohistokimia *streptavidin biotin* mampu secara konsisten mendeteksi antigen virus atau virus DNA (KHV) pada jaringan insang ikan-ikan mas (*C. carpio*) yang tampak sehat atau tidak menunjukkan gejala klinis dan lesi patologi anatomi KHV. Pendekatan uji berbasis bioteknologi, yaitu imunopatologi imunohistokimia *streptavidin biotin* adalah sangat sensitif dan cepat, serta

merupakan metode imunopatologi yang tepat untuk diaplikasikan dalam kondisi lapangan untuk diagnosis infeksi KHV. Ikan-ikan mas tampaknya berperan penting sebagai sumber penularan (karier) KHV pada ikan-ikan lain yang peka.

SARAN

Uji imunopatologis imunohistokimia streptavidin biotin perlu diaplikasikan untuk deteksi ada/tidaknya ikan-ikan mas karier KHV sebagai program nasional rutin kontrol dan pengendalian, termasuk pencegahan dan eradikasi wabah KHV di Indonesia.

Ikan-ikan mas karier yang akan dapat beraksi sebagai sumber penularan KHV secara terus menerus harus dideteksi dan dieliminasi terkait dengan kontrol dan pengendalian, termasuk pencegahan dan eradikasi wabah KHV di Indonesia.

Uji imunopatologis imunohistokimia streptavidin biotin perlu diuji-coba atau diteliti lebih lanjut terhadap kemampuannya untuk deteksi DNA KHV pada sampel yang lebih mudah didapatkan, misalnya mukus insang dan tubuh ikan, air dan lumpur.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Hibah Bersaing Tahun Anggaran 2011. Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, dan Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM), Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Terima kasih juga disampaikan kepada para mahasiswa Koasistensi Laboratorik Patologi Mei 2011 atas kerjasamanya dalam koleksi dan nekropsi spesiemen, ikan mas (*Cyprinus carpio*).

DAFTAR PUSTAKA

- Bercovier H, Fishman Y, Nahary R, Sinal S, Ziotkin A, Eyngor M, Gilad O, Eldar A, Hedrick RP 2005. Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. *BMC Microbiol* 5: 13-19.

- Bergman S, Schutze H, Fichtner D, Riechardt M, Schrudde D, Meyer K, Kempter J. 2006. Koi herpesvirus (KHV) genome can also be detected in tissue of ornamental fish. Proceedings of the 5th International Symposium on Aquatic Animal Health 5: 78.
- Body A, Lieffrig F, Charlier C, Collard, A. 2000. Isolation of virus-like particles from koi (*Cyprinus carpio*) suffering gill necrosis. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 20: 87-88.
- Bretzinger A, Fischer-Scherl T, Oumoma M, Hoffmann R, Truyen U. 1999. Mass mortalitas in koi, *Cyprinus carpio* associated with gill and skin disease. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 19: 182-185.
- Costes B, Stalin Raj V, Michel B, Fournier G, Thirion M, Gillet L, Mast J, Leffrig F, Bremont M, Vanderplasschen A. 2009. The major portal of entry of koi herpesvirus in *Cyprinus carpio* in the skin. *J Virol* 83: 2819-2830.
- Dishon AA, Perelberg J, Bishara-Shieban M, Ilouze M, Davidovich S, Werker S, Kotler M. 2005 Detection of carp interstitial nephritis and gill necrosis virus in fish droppings. *Appl Environ Microbiol* 71: 7285-7291.
- FHS/A (Fish Health Section/Asian Fisheries Society Electronic) 2004. Fokus on Koi Herpes Virus (KHV). *News Lett* Jan/Feb. 3: 1-3.
- Gilad O, Yun S, Andree KB, Adkison MA, Zlotkin A, Bercovier H, Elder A, Hendrick RP. 2002. Initial characteristics of koi herpes virus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio* koi. *Dis Aqua Org* 48: 101-108.
- Gilad O, Yun S, Andree KB, Adkison MA, Way K, Willits NH, Bercovier H, Hedrick RP. 2003. Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, the koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. *J Gen Virol* 84: 1-8.
- Gilad O, Yun S, Zagmutt-Vergara FJ, Leutenegger CM, Bercovier H, Hendrick RP. 2004. Concentrations of a koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio* koi as assessed by real-time TaqMan PCR. *Dis Aqua Org* 60: 179-187.
- Gray WI, Mullis I, LaPatra SE, Groff JM, Goodwin A. 2002 Detection of koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish. *J Fish Dis* 25: 171-178.
- Hedrick RP, Gilad O, Yun S, Spangenberg JV, Marty GD, Nordhausen RW, Kebus MJ, Bercovier H, Eldar A. 2000. A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi. A strain of common carp. *J Aqua An Health* 12: 44-57.
- IPB 2010a. IPB found a virus recombinant vaccine KHV. IPB, Bogor, Indonesia.
- ISID (International Society for Infectious Diseases) 2010b. Koi herpes virus, carp, California, USA.
- Koi News 2002. KOI NEWS for the Producer and the trade. <http://www.koinet.co.za/koinews/KN-VI-6.htm> (10 Februari, 2001).
- Kurnia DR. 2010. Penyakit ikan (*Koi Herpes Virus*/KHV). Balai Karantina dan Kesehatan Ikan. Dinas Kelautan dan Perikanan Provinsi Jawa Tengah.
- Miyazaki T, Kuzuya Y, Yasumoto S, Yasuda M, Kobayashi T. 2008. Histopathological and ultrastructural features of koi herpesvirus (KHV)-infected carp *Cyprinus carpio* and the morphology and morphogenesis of KHV. *Dis Aqua Org* 80: 1-11.
- Oh MJ, Jung SJ, Choi TJ, Kim HR, Rajendran KV, Kim YJ, Park MA, Chun SK. 2001. A viral disease occurring in cultured carp *Cyprinus carpio* in Korea. *Fish Pathol* 36: 147-151.
- OATA (Ornamental Aquatic Trade Association) 2001. Koi Herpes Virus (KHV). Westbury, Wilts, United Kingdom.
- Perelberg A, Smirnov M, Hutoran M, Diamant M, Bejerano Y, Kotler M. 2003. Epidemiological description of a new viral disease affecting cultured *Cyprinus carpio* in Israel. *Israel J Aquacul* 55: 5-12.
- Petty BDAC, Riggs R, Kinger R, Yanong R, Francis-Floyd R 2002. Spring viremia of carp. Spring viremia of carp. University of Florida, Institute of Food and Agricultural Science, *Fact Sheet*, VM-142, Gainesville, FL, USA.
- Pikarsky E, Ronen A, Abramowitz J, Levavi-Sivan B, Hutoran M, Shapira Y. 2004. Pathogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus. *J Virol* 78: 9544-9551.

- 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.
- Wasito R, Wuryastuti H. 2011. Arti penting imunodiagnosis patologi dalam penyakit ikan dan udang. *Infonet* 201: 56-57.
- Yoshimizu M, Shimizu T, Yoshida N, Kasai H. 2006. Evolution of survival of koi herpesvirus in environmental water. Proceedings of the 5th International Symposium on Aquatic Animal Health 5: 285.
- Zrnc'ic' S, Oreic D. 2009. Koi herpes virus disease-disease without boundary. *Veterinarska Stanica* 40: 141-149.