

## Gambaran Histopatologi Insang Ikan Mas di Daerah Endemik *Koi Herpesvirus*

(HISTOPATHOLOGIC FINDINGS OF GILLS OF THE COMMON CARPS  
IN THE ENDEMIC AREA OF KOI HERPESVIRUS)

Raden Wasito<sup>1</sup>, Hastari Wuryastuti<sup>2</sup>, Bambang Sutrisno<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bagian Patologi, <sup>2</sup>Bagian 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

*Koi herpesvirus* (KHV) merupakan penyakit yang bersifat fatal pada ikan mas (*Cyprinus carpio*) dan ikan koi (*C. carpio koi*). Meskipun telah dilaporkan, bahwa ikan mas dapat beraksi sebagai karier *koi herpesvirus* (KHV), gambaran histopatoginya, terutama pada insang belum pernah diidentifikasi sampai saat ini. Pada penelitian ini, digunakan 12 ekor ikan mas yang tampak sehat, termasuk ginjalnya yang diambil dari daerah endemik KHV di Sleman, Yogyakarta. Semua ikan mas dikorbamkam nyawanya dan dinekropsi. Insang dikoleksi dan difiksasi formalin 10%. Selanjutnya, insang diproses histopatologi dan diwarnai dengan pewarna rutin hematoxilin-eosin serta diamati di bawah mikroskop. Pada pemeriksaan histopatologi insang terlihat adanya infiltrasi difusa sel-sel radang, terutama limfosit dan sel berukuran besar berbentuk oval sampai poligonal berwarna basofilik yang di dalam nukleusnya terdapat badan-badan inklusi besar. Sel-sel epitel lamina primer dan sekunder insang mengalami hiperplasia, adesi dan nekrosis. Dengan demikian, hasil penelitian ini membuktikan, bahwa infeksi KHV ada pada ikan mas yang tampak sehat, tanpa menunjukkan gejala klinis dan lesi patologi KHV. Kemungkinan bahwa insang tersebut mengandung virus hidup (karier KHV) dan dapat beraksi sebagai sumber penularan infeksi masih perlu didiskusikan lebih lanjut.

Kata-kata kunci : ikan mas, *koi herpesvirus*, hematoxilin-eosin, badan-badan inklusi, karier KHV

### ABSTRACT

*Koi herpesvirus* (KHV) is the cause of a lethal disease that affects common carp (*Cyprinus carpio*) and koi (*Cyprinus carpio koi*). Although, it has been reported that common carps could act as carriers for KHV, their histopathologic findings, especially the gills have not been identified up to now. In the present study, 12 normal, healthy looking common carps including their gills were collected from the endemic area of KHV in Sleman, Yogyakarta. All fish were necropsied and the gills were collected and fixed in 10% buffer formalin. Then, the gills were processed histopathologically using routine hematoxyline-eosin stain and examined under the microscope. Histopathologic examination of the gills exhibited an apparent infiltration of inflammatory cells, especially lymphocytes. The large oval to polygonal basophilic cells containing large intranuclear inclusion bodies were also identified. Gills epithelial cells show mass hyperplasia and adhesion with necrotic changes. Thus, results of this study has led to a reasonable conclusion that KHV infection is present in the normal, healthy common carps. One possibility is those KHV are live viruses (carriers for KHV) and might could act as a source of infection is being discussed.

Keywords: Common carp, KHV, hematoxyline-eosin, intranuclear inclusion bodies, Carriers for KHV

## PENDAHULUAN

Informasi awal tentang KHV yang menyebabkan angka mortalitas tinggi pada ikan mas dan ikan koi pertama kali diperoleh dari *the 9<sup>th</sup> International Conference of European Association of Fish Pathologist* (EAFP) pada tahun 1999 (Ariav *et al.*, 1999). Kejadian wabah KHV di dunia, terjadi awalnya di Inggris pada tahun 1996 (ISID, 2010). Sejarah kejadian wabah KHV tergolong masih baru sehingga data tentang patogen (KHV), kejadiannya dan diagnosis, serta kemungkinan program kontrol dan pencegahannya masih belum diketahui secara jelas. Meskipun demikian, KHV telah menyebar secara ekstensif dan karena metode diagnosis KHV masih belum jelas, maka tidak mudah untuk membebaskan daerah atau tambak-tambak yang pernah terinfeksi KHV.

Virus yang menyerupai herpes yang selanjutnya dikenal sebagai *koi herpesvirus* pertama kali berhasil diisolasi di Amerika Serikat pada tahun 1998 setelah terjadi wabah KHV pada ikan koi (*Cyprinus carpio koi*) dan ikan mas (*C. carpio*) di Israel dan Amerika Serikat (Hedrick *et al.*, 2000). Sehubungan dengan kemungkinan kerugian ekonomi pada budidaya perikanan ikan mas dan koi, sampai saat ini, masih terus didiskusikan. Infeksi yang disebabkan oleh KHV sangat menular, sehingga mengakibatkan angka mortalitas yang tinggi pada ikan koi (*C. carpio koi*) dan ikan mas (*C. carpio*). Budidaya ikan mas telah dilakukan secara ekstensif di China, negara-negara lain di Asia, dan termasuk negara Eropa yang setiap tahunnya menghasilkan 1,5 juta ton ikan mas hidup. Di Indonesia, wabah KHV terjadi pertama kali pada tahun 2002 dan tersebar ke Pulau Jawa, Bali, dan Sumatra. Infeksi KHV sangat fatal dan mengakibatkan kerugian ekonomis ± Rp. 7 milyar di Indonesia (FHS/A, 2004).

Penularan patogen (KHV) melalui ikan-ikan mas atau ikan koi hidup merupakan masalah utama bagi petani-petambak ikan dan juga pemerintah yang terkait dengan program kontrol kesehatan ikan terhadap produk atau hasil-hasil perikanan budidaya air tawar yang di-lalu-lintaskan (Hedrick, 1996). Lebih-lebih dilaporkan, bahwa ikan-ikan mas dapat terinfeksi secara persisten oleh KHV (ikan mas karier KHV) sehingga dapat berperan sebagai sumber penularan infeksi secara terus menerus di perairan budidaya perikanan pada ikan-ikan lain yang peka (OATA, 2001; FHS/A, 2004).

Salah satu cara atau upaya pencegahan terhadap penyebaran wabah KHV pada ikan-ikan sebelum dibudidayakan dan ditransportasikan, ataupun bahkan di pusat-pusat perikanan budidaya adalah pemeriksaan ikan-ikan tersebut sejak awal, bahwa ikan-ikan tersebut adalah sehat (tidak terinfeksi KHV). Program kontrol KHV tersebut harus dilakukan berdasarkan pada prosedur diagnostik yang sensitif dan spesifik untuk deteksi KHV patogenik. Tujuan penelitian ini adalah menentukan gambaran histopatologi patognomonik infeksi KHV pada insang ikan mas (*C. carpio*) yang tampak sehat yang dapat beraksi sebagai sumber penularan KHV (ikan-ikan mas karier) yang secara terus menerus pada ikan-ikan lain yang peka. Deteksi lesi histopatologi patognomonik merupakan pendekatan diagnosis dini KHV pada ikan-ikan mas karier KHV yang sangat diperlukan dalam kontrol dan pengendalian KHV, terutama di Indonesia..

## METODE PENELITIAN

### Sampel Ikan

Pada penelitian ini, digunakan 12 ekor ikan mas (*C. carpio*) yang dikoleksi dari kolam budidaya ikan mas di daerah Sleman, Yogyakarta yang merupakan daerah endemik KHV. Ikan-ikan mas tersebut terlihat sehat atau tidak menunjukkan gejala klinis dan lesi patologi terinfeksi KHV. Semua ikan mas dikorbankan nyawanya dan kemudian dinekropsi. Insang yang merupakan organ sasaran KHV diambil, difiksasi formalin dan diproses untuk sediaan histopatologi dengan pewarnaan rutin hematoksilin-eosin.

### Pewarnaan Histopatologis Rutin Hematoksilin-Eosin

Untuk pewarnaan rutin histopatologi insang, sediaan jaringan insang ikan mas (*C. carpio*) yang telah difiksasi di dalam formalin 10% selama 24 jam, selanjutnya diproses dengan *automatic histotechnicon*, yaitu di-dehidrasi dengan larutan ethanol konsentrasi bertingkat (80% 2 jam, 95% 2 jam, 95% 1 jam, absolut tiga kali, masing-masing 1 jam), dicuci dengan xilen tiga kali masing-masing 1 jam dan direndam parafin cair tiga kali masing-masing 2 jam. Selanjutnya, setelah dehidrasi, sediaan jaringan insang dicetak dengan parafin cair dan

selanjutnya dipotong mikrotom dengan ketebalan 3-5  $\mu\text{m}$ . Untuk pewarnaan rutin hematoxilin-eosin, selanjutnya, sediaan 3-5  $\mu\text{m}$  jaringan insang di-deparafinisasi dengan xilen tiga kali, masing-masing 5 menit, ethanol konsentrasi menurun (absolut dan 95% masing-masing 5 menit), dicuci aquades dan PBS masing-masing 1 menit, dicelupkan ke dalam Harris-Hematoxyline 20 menit, dicuci aquades, dicelup *acid alcohol* 2-3 celupan, dicuci aquades 1 menit dan 15 menit, dicelupkan ke dalam larutan eosin 2 menit, dimasukkan ke dalam ethanol 96% dua kali masing-masing 3 menit, ethanol absolut dua kali masing-masing 3 menit, dicuci xilen dua kali, masing-masing 5 menit. Selanjutnya, sediaan jaringan insang diberi medium perekat gliserol dan ditutup dengan gelas penutup untuk diamati di bawah mikroskop.

### Analisis Statistika

Jaringan insang yang telah diwarnai dengan pewarna rutin hematoxilin-eosin diperiksa di bawah mikroskop untuk pengamatan lesi histopatologi insang patognomonik (*intranuclear inclusion bodies*) akibat infeksi *koi herpesvirus* dan dianalisis secara deskriptif.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampai saat ini, wabah penyakit KHV pada ikan mas maupun ikan koi masih merupakan ancaman bagi para petani-petambak perikanan budidaya ikan mas dan ikan koi di Indonesia. Agen etiologinya adalah KHV yang termasuk dalam famili *Herpesviridae* yang dikenal sebagai *cyprinid herpesvirus 3* (CyHV-3) (Waltzek *et al.*, 2005). Tampaknya mengapa wabah KHV masih merupakan problema utama pada ikan mas dan ikan koi karena ikan mas dan koi dapat terinfeksi persisten KHV dan kemudian ikan-ikan tersebut dapat beraksi sebagai karier KHV pada ikan-ikan lain yang peka (St-Hilaire *et al.*, 2005).

Dua belas ekor ikan mas (*C. carpio*) berasal dari daerah endemik KHV yang tampak sehat, tidak menunjukkan gejala klinis dan lesi patologi anatomi terinfeksi KHV telah diteliti melalui pendekatan histopatologi dengan pewarnaan rutin hematoxilin-eosin. Dalam hal ini, digunakan insang yang merupakan organ sasaran utama KHV (Rosenkranz *et al.*, 2008). Pada saat nekropsi, semua insang terlihat

normal sehat, yaitu insang berwarna merah terang homogen (Gambar 1). Hasil pemeriksaan histopatologi insang dengan pewarnaan hematoxilin-eosin pada penelitian ini, menunjukkan adanya infiltrasi difusa sel-sel radang, terutama limfosit, sel plasma, dan heterofil, serta ada sel berukuran besar berbentuk oval sampai poligonal berwarna basofilik yang di dalam nukleusnya terdapat badan-badan inklusi besar. Sel-sel epitel lamina primer dan sekunder insang mengalami hiperplasia, adesi dan kongesti (Gambar 2-4).

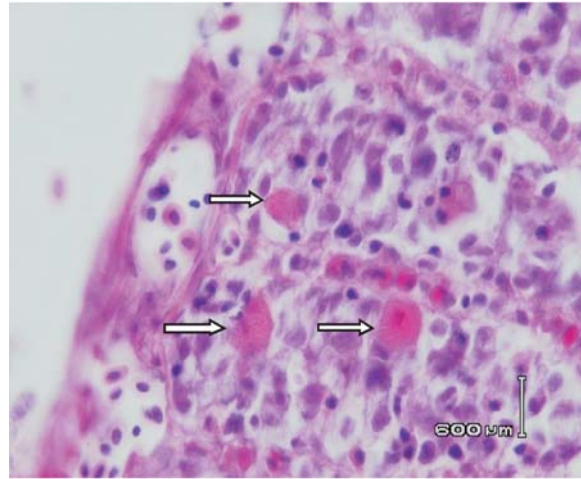
Dilaporkan, bahwa pada uji eksperimental ikan mas anakan *in vivo* dengan cara imersi ke dalam air yang mengandung KHV  $10^5$  pfu.  $1^{-1}$  pada suhu  $22^{\circ}\text{C}$  selama satu jam menunjukkan adanya gejala klinis menciri terinfeksi KHV berupa penurunan nafsu makan dan berenang secara tidak beraturan. Pada saat nekropsi, ikan-ikan mas yang terinfeksi KHV tersebut terlihat adanya nekrosis ringan sampai sedang dan hemoragi pada insang, serta ulserasi fokal pada kulit (Oh *et al.*, 2001; Haenen *et al.*, 2004; Pikarsky *et al.*, 2004). Ikan-ikan mas mati pada hari ke-7 sampai 11 setelah infeksi (Haenen *et al.*, 2004; Pikarsky *et al.*, 2004). Hasil pemeriksaan histopatologi insang yang diwarnai dengan hematoxilin-eosin memperlihatkan adanya reaksi selular spesifik terinfeksi KHV. Pada insang banyak sel-sel besar berbentuk ovoid sampai poligonal berwarna basofilik dengan badan-badan inklusi besar berwarna basofilik keputihan intranukleus (Rosenkranz *et al.*, 2008). Selain itu, pada insang terlihat adanya hiperplasia, adesi, atrofi, dan nekrosis pada sel-sel epitel disertai dengan infiltrasi sel-sel radang, terutama limfosit (Hedrick *et al.*, 2000; Rosenkranz *et al.*, 2008).

Seperti yang telah disebutkan, pada hasil penelitian ini, ikan-ikan mas yang tampak sehat menunjukkan adanya lesi histopatologi spesifik KHV. Temperatur air merupakan faktor yang sangat berpengaruh terhadap munculnya wabah penyakit KHV yang menimbulkan angka morbiditas dan/atau mortalitas tinggi pada ikan-ikan yang terinfeksi KHV. Ronen *et al.*, (2003) membuktikan, bahwa ikan mas dapat berkembang menjadi resisten secara alami terhadap infeksi KHV setelah terinfeksi KHV selama 3-5 hari pada temperatur air  $23-25^{\circ}\text{C}$ . Konsentrasi viral DNA KHV setelah dua bulan terinfeksi eksperimental KHV terdapat dalam jumlah yang jauh lebih rendah jika dibandingkan dengan konsentrasinya pada saat infeksi KHV akut adalah terdapat pada insang,

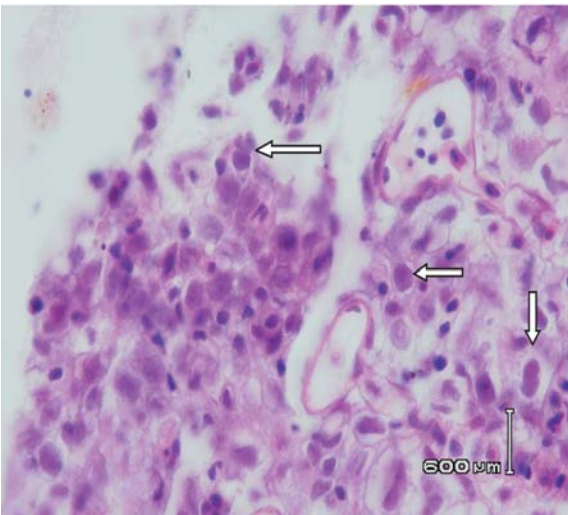




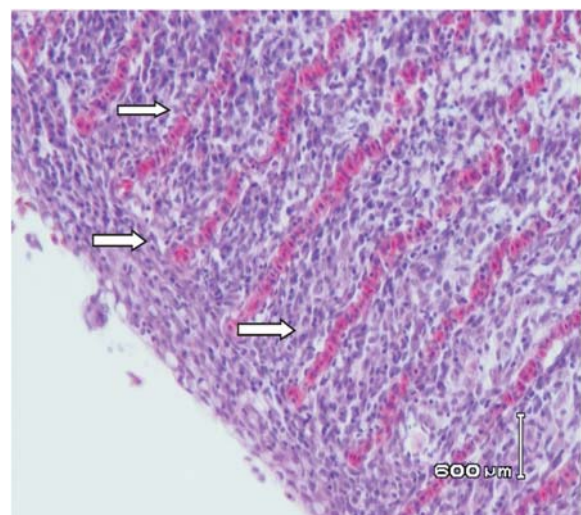
Gambar 1. Insang ikan mas (*C. Carpio*) terlihat normal. Merah muda kecoklatan homogen.



Gambar 2. Lamela insang hiperplasia and adhesi dengan infiltrasi heterofil (—>) (Hematoksilin dan eosin, *oil immersion*).



Gambar 3. Sel-sel epitel insang ikan mas (*Cyprinus carpio*) membesar dan beberapa di antaranya terdapat badan-badan inklusi berwarna basofilik homogen intranuklei (—>) (Hematoksilin-eosin, *oil immersion*).



Gambar 4. Sel-sel epitel insang ikan mas (*Cyprinus carpio*) mengalami hiperplasia, adhesi dan kongesti sedang (—>) (Hematoksilin dan eosin, 450x).

dan juga ginjal dan otak. Ikan-ikan tersebut tampak sehat dan nafsu makannya tetap aktif selama satu bulan (Gilad *et al.*, 2004). Ikan-ikan mas dan koi paling peka terhadap infeksi KHV jika temperatur air mencapai 18-28°C (Gilad *et al.*, 2004).

Mekanisme bagaimana KHV menginfeksi insang (ikan mas dan koi), apakah melalui insang atau saluran pencernaan belum diketahui secara pasti (Hedrick *et al.*, 2000; Perelberg *et al.*, 2003). Diduga kuat, bahwa virus (KHV) masuk ke dalam tubuh ikan melalui insang, ber-replikasi dalam sel-sel epitel

insang dan menginduksi lesi patologi berupa denudasi dan nekrosis mukosa insang. Lesi pada insang diduga sebagai penyebab utama morbiditas pada ikan yang terinfeksi KHV. Virus ber-replikasi dalam insang yang terinfeksi dan kemudian mengekskresikan KHV ke dalam air yang akhirnya menginfeksi ikan-ikan lain yang peka. Selanjutnya, virus tersebut mengalami viremia dengan cara menginfeksi sel-sel darah putih dan akhirnya menginfeksi ginjal. Pada ginjal, KHV menginduksi lesi interstisial nefritis (Pokorova *et al.*, 2005).

Hasil pemeriksaan histopatologi insang dengan pewarna rutin hematoxilin-eosin hasil penelitian ini adalah sangat penting dan diperlukan bagi para petani-petambak karena dapat digunakan sebagai acuan peringatan dini tentang adanya bahaya infeksi persisten KHV.

### SIMPULAN

Virus (KHV) ada atau terdapat pada insang ikan mas yang tampak sehat, yaitu tidak menunjukkan gejala klinis dan lesi patologi terinfeksi KHV. Infeksi KHV terjadi pada ikan mas dan ikan mas yang terinfeksi KHV tersebut. Ikan-ikan mas tersebut terinfeksi KHV bersifat persisten sehingga tampak normal sehat, tidak menunjukkan gejala klinis dan lesi patologi meskipun terinfeksi KHV. Virus (KHV) merupakan virus-virus hidup dan ikan mas tersebut merupakan sumber virus yang dapat beraksi sebagai sumber penularan infeksi KHV pada ikan-ikan lain yang peka.

### SARAN

Petani-petambak harus berhati-hati jika akan berbudidaya ikan-ikan air tawar yang peka terhadap KHV, terutama ikan mas dan koi terhadap kemungkinan terinfeksi KHV yang berasal dari ikan mas yang terinfeksi KHV persisten, yaitu ikan-ikan mas yang tampak normal sehat (tanpa menunjukkan gejala klinis dan lesi patologis).

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada. 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

- Ariav R, Tinman S, Bejerano I. 1999. First report of newly emerging viral disease of *Cyprinus carpio* species in Israel. In: EAFP Conference, Rhodes, September 1999. Abstract of poster.
- 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, Zagmutt-Vergara FJ, Leutenegger CM, Bercovier H, Hedrick RP. 2004. Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio koi* as assessed by real-time Tagman PCR. *Dis Aqua Org* 60: 179-187.
- Haenen OLM, Way K, Bergmann SM, Ariel E. 2004. The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 24: 293-307.
- Hedrick RP. (1996). Movements of pathogens with the international trade of live fish. Problems and solutions. *Revue Scientifique et Technique de L. Office International Des Epizooties* 15: 523-531.
- 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.
- ISID (International Society for Infectious Diseases) 2010. Koi herpes virus, carp. California, USA.
- OATA (Ornamental Aquatic Trade Association) 2001. Koi Herpes Virus (KHV). Westbury, Wilts, United Kingdom.
- 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.
- Perelberg A, Smirnov M, Hutoran M, Diamant M, Bejerano Y, Kotler M. 2003. *Cyprinus carpio* in Israel. *Israel J Aqua* 55: 5-12.
- 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.
- Pokorova D, Vesely T, Piackova V, Reschova S, Hulova J. 2005. Current knowledge on koi herpesvirus (KHV): A review. *Vet Med-Czech* 50: 139-147.
- Ronen A, Perelberg A, Abramowitz J, Hutoran M, Tinman S, Bejerano I, Steinitz M, Kotler M. 2003. Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*. *Vaccine* 21: 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.
- St-Hilaire S, Beevers N, Way K, Le Deuff RM, Martin, P, Joner C. 2005. Reactivation of koi herpesvirus infections in common carps *Cyprinus carpio*. *Dis Aqua Org* 67: 15-23.
- Waltzek TB, Kelley GO, Stone DM, Way K, Hanson L, Fukuda H, Hirono I, Aoki T, Davison AJ, Hedrick RP. 2005. Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family Herpesviridae. *J Gen Virol* 86: 1659-1667.