

Isolasi, Identifikasi dan Karakterisasi Glikoprotein Permukaan *Myxobolus koi*

Isolation, Identification and Characterization of the Surface Glycoprotein of *Myxobolus koi*

Insariani¹, Khumaira Puspasari¹, Haririyah¹, Emei Widiyastuti¹, Chusnul Chotimah¹, Hastari Wuryastuti²

¹Balai Uji Standar Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan

²Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada
E-mail: insa_riani@yahoo.com

Abstract

Myxobolus koi is considered to be one of the pest diseases of fish quarantine class I, which has to be destroyed if it is found. Technique that is regularly used for diagnosis *M. koi*, such as histopathological examination, polymerase chain reaction (PCR) and sequencing always done in dead fishes. The objective of this study was to isolate the protein of *M. koi* as the initial step for producing antibody that can be used as a material for immunology-based diagnostic method. In the present study, identification of surface protein of *M. koi* involved three different stages. The first stage was to isolate and identify *M. koi* from koi fish using wet mount, and histopathologic, PCR and sequencing techniques. In the second stage, purification and isolation of the surface protein of *M. koi* was done by Percoll gradient ultracentrifugation technique. Purification using the technique produced 5 different layers on the surface of the tube. *Myxobolus koi* spores were found in the 2nd, 3rd and 4th layers. The third stage was to identify and characterize the surface protein of *M. koi* using SDS PAGE. The results of SDS PAGE analysis showed that spores purified from 3 different layers all have the same profiles. Molecular sizes of the surface protein of *M. koi* that could be isolated in this study were 12 Kd, 16 Kd, 25 Kd, 27 Kd, 40 Kd and 45 Kd. Among them, the molecular sizes of 12 Kd, 25 Kd and 27 Kd could be seen clearly.

Keywords: *Myxobolus koi*, surface glycoprotein, isolation, Percoll gradient centrifugation, SDS PAGE

Abstrak

Myxobolus koi ditetapkan sebagai hama penyakit ikan karantina (HPIK) golongan I yang harus dimusnahkan apabila ditemukan. Teknik yang biasa dilakukan untuk mendiagnosa seperti pemeriksaan histopatologis, *polymerase chain reaction* (PCR) dan sekuensing biasanya dikerjakan dengan mematikan ikan. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi protein *M. koi* sebagai langkah awal untuk memproduksi antibodi yang dapat digunakan sebagai materi untuk metode pemeriksaan berbasis imunologis. Identifikasi protein permukaan *M. koi* terdiri dari 3 tahapan. Tahap pertama adalah isolasi dan identifikasi *M. koi* menggunakan metode preparat segar, dan histopatologis, PCR dan sekuensing. Pada tahap kedua, purifikasi dan isolasi protein permukaan *M. koi* dikerjakan dengan teknik Percoll *gradient* ultrasentrifugasi. Purifikasi dengan teknik tersebut menghasilkan 5 lapisan yang berbeda pada permukaan tabung. Spora *M. koi* ditemukan pada lapisan ke 2, 3 dan 4. Tahap ke tiga adalah identifikasi dan karakterisasi protein permukaan *M. koi* dengan SDS PAGE. Hasil analisa SDS PAGE menunjukkan bahwa spora yang dipurifikasi dari 3 lapisan yang berbeda memiliki profil protein yang sama. Ukuran molekuler dari protein permukaan *M. koi* yang dapat diisolasi pada penelitian ini adalah 12 Kd, 16 Kd, 25 Kd, 27 Kd, 40 Kd dan 45 Kd. Ukuran molekuler yang terlihat jelas adalah 12 Kd, 25 Kd dan 27 Kd.

Kata Kunci : *Myxobolus koi*, glikoprotein permukaan, isolasi, Percoll gradient sentrifugasi, SDS PAGE

Pendahuluan

Myxobolus koi (*M. koi*) merupakan parasit penyebab penyakit gembil atau *gill myxoboliosis*. *Myxobolus koi* dilaporkan pertama kali oleh Kudo tahun 1920 di Jepang (Kudo, 1920). Di Indonesia, parasit ini menyebabkan masalah yang serius pada ikan mas muda (*Cyprinus carpio*) yang dibudidayakan dengan prevalensi mencapai 100% dan tingkat kematian 60-80%. Pada tahun 1974, wabah penyakit gembil dilaporkan menyerang benih ikan mas koi (*Cyprinus carpio koi*) dengan angka kematian mencapai 90% (Rukyani, 1978; Djajadireja *et al.*, 1983)). Berdasarkan laporan petani koi di Blitar, wabah penyakit ini dari tahun 2009 hingga saat ini masih menyerang benih ikan mas berukuran 3 – 5 cm dengan tingkat kematian 90% (Lu'lu'in *et al.*, 2012)). Selain dapat menyebabkan kematian, *M. koi* juga menurunkan nilai ekonomis ikan koi. Penyebaran parasit *M. koi* terjadi karena perpindahan parasit dari ikan terinfeksi ke ikan sehat melalui inang perantara pada fase-fase tertentu dari siklus hidup parasit tersebut. *Myxobolus koi* ditetapkan sebagai hama penyakit ikan karantina (HPIK) kelas 1 sehingga pemusnahan harus dilakukan jika ditemukan.

Saat ini, diagnosa sementara infeksi *M. koi* didasarkan pada gejala klinis dan identifikasi tahapan *myxospora* yang terbentuk pada insang ikan koi dengan teknik *wet mount*. Diagnosa pasti dari *M. koi* secara umum dilakukan melalui pengamatan luka atau kista dari parasit pada potongan jaringan insang secara mikroskopis menggunakan pewarnaan hematoksilin dan eosin. Untuk teknik ini diperlukan waktu yang relatif lama (\pm 1 minggu) dan

pengambilan sampel harus dilakukan dengan cara mematikan ikan. Teknik *polymerase chain reaction* menggunakan gen 18S rDNA sebagai petanda memungkinkan identifikasi spesies *myxospora* pada semua tahapan pertumbuhan parasit pada inang yang lebih cepat dan sensitif. Namun demikian, ikan harus dimatikan terlebih dahulu untuk pengambilan sampel. Teknik diagnostik yang berbasis imunologik untuk identifikasi *M. koi* sampai saat ini belum tersedia. Hal ini disebabkan karena bagian yang bersifat imunogenik dari *M. koi* belum banyak diteliti. Pembuatan antibodi anti *M. koi* penting dikerjakan karena diharapkan dapat sebagai petanda yang spesifik adanya infeksi *M. koi*. sebelum terlihat adanya gejala klinis dan tanpa harus mematikan ikan untuk pengambilan sampelnya.

Tujuan dari penelitian ini adalah isolasi, identifikasi dan karakterisasi glikoprotein permukaan dari *Myxobolus koi* sebagai antigen yang bersifat imunogenik untuk produksi antibodi. Hal ini didasarkan pada bukti, bahwa glikoprotein permukaan *Myxobolus cerebralis* merupakan substansi yang mampu menimbulkan respon kekebalan pada ikan inangnya (Knauss and El-Matbouli, 2005).

Materi dan Metode

Kista yang digunakan sebagai sampel berasal dari ikan mas koi (*Cyprinus carpio koi*) yang secara klinis menunjukkan gejala hipoksia, lethargi, operkulum terbuka dan terlihat kista putih pada bagian *lamella* insang. Ikan mas koi yang diduga menderita *myxoboliosis* berasal dari kolam tanah di daerah Blitar, Jawa Timur. Kista kemudian

dipisahkan dari jaringan insang dengan cara dipotong-potong dengan gunting steril. Spora di dalam kista dikumpulkan ke dalam tabung Ependorf berisi larutan PBS steril untuk kemudian diisolasi dan diidentifikasi morfologisnya dengan teknik *wet mount*, secara histopatologis, molekuler dan sekuensing. Hasil uji identifikasi morfologis membuktikan, bahwa spora tersebut adalah *Myxobolus koi*. Spora tersebut kemudian digunakan sebagai bahan utama dalam penelitian ini.

Suspensi spora *M. koi* hasil homogenisasi kista pada insang ikan terinfeksi dimurnikan dengan metode sentrifugasi Percoll *gradient*. Dua mililiter suspensi spora konsentrasi 10% ditambahkan ke dalam tabung sentrifus polipropilen berukuran 15 ml yang telah berisi larutan Percoll dengan berbagai konsentrasi (0%, 25%, 50%, 75% dan 100%) pada larutan 0,25 M sukrosa. Volume masing-masing larutan Percoll adalah 2 ml, dengan cara melapiskan pada permukaannya secara perlahan-lahan. Tabung kemudian disentrifugasi dalam *rotor swinging bucket* dengan kecepatan 400xg selama 10 menit. Sesudah sentrifugasi, tiap lapisan keruh yang mengandung spora ($\pm 500 \mu\text{l}$) diambil dan dilarutkan dengan 1 ml akuades. Larutan Percoll yang tercampur di dalam suspensi spora dipisahkan dengan cara dicuci sebanyak 4 kali menggunakan teknik sentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 3 menit. Spora *M. koi* kemudian dihitung jumlahnya menggunakan Neubauer *haemocytometer* dan disimpan di dalam *freezer* -80°C (Knauss and El-Matbouli, 2005).

Pelet spora *M. koi* ($\pm 1,5 \times 10^6$) disuspensikan ke dalam bufer (100 mM Tris-HCl, pH 6,8, 200 mM *mercaptoethanol*, 4,0% (v/v) SDS, 0,2% (w/v)

bromophenol blue, 20% (v/v) *glycerol* (Laemmli, 1970). Spora kemudian dilisiskan menggunakan *water bath sonicator* selama 10 x 2 menit; setelah sonikasi, sampel diinkubasi di es selama 1 menit. Suspensi spora kemudian dididihkan pada suhu 95°C selama 5 menit dilanjutkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 14,000xg selama 3 menit. Glikoprotein yang diperoleh dialikuat pada tabung mikro dan disimpan pada suhu -80°C (Knauss and El-Matbouli, 2005).

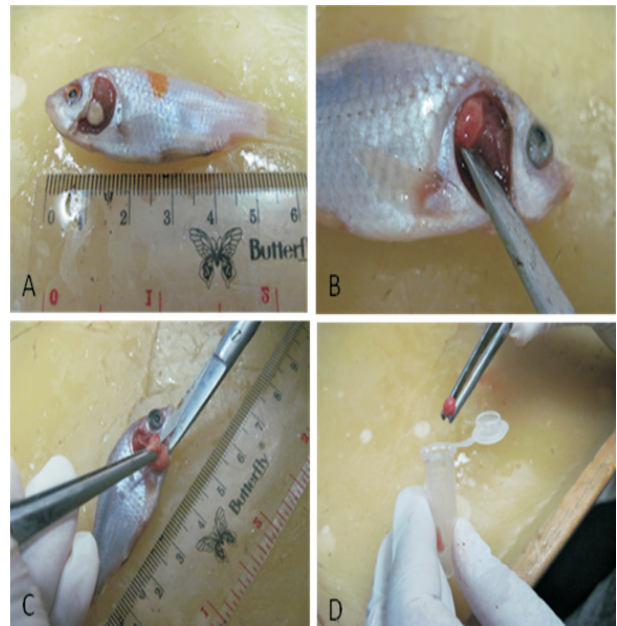
Glikoprotein permukaan *M. koi* dipisahkan dengan SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Volume 2x *loading* bufer yang sama ditambahkan pada sampel glikoprotein, dididihkan pada suhu 95°C selama 5 menit dan disentrifugasi pada kecepatan 14,000xg selama 3 menit. Sesudah sentrifugasi, protein yang terlarut dijalankan pada gel pemisah 12% *polyacrylamide* dan 5% *gel stacking* (Sambrook and Russell, 2001). *Running gel* (2,55 ml) kemudian dipolimerisasikan dengan ditambah 90 μl 10% (w/v) ammonium *peroxodisulphate* (APS) dan 60 μl *pro-analysis* N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED). Gel kemudian dijalankan menggunakan *standard twin plate mini gel unit* (Scie-pkas, UK) dan direndam dengan bufer (25 mM Tris, 250 mM glycine, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3). Pita glikoprotein total *M. koi* dideteksi menggunakan pewarna *coomasie brilliant blue* R-250 (0,1% dalam 40% methanol dan 10% asam asetat) dengan cara perendaman selama semalam (Knauss and El-Matbouli, 2005). Pita protein kemudian direndam kembali di dalam larutan *rapid destain* yang mengandung 40% (v/v) methanol dan 10% (v/v) asam asetat. Perendaman diulang 3 kali pada larutan

rapid destain yang baru masing-masing selama 1 jam. Terakhir, pita protein direndam di dalam larutan penghilang warna akhir (*final destain*) (4% (v/v) gliserol, 10% (v/v) asam asetat) selama 1 jam.

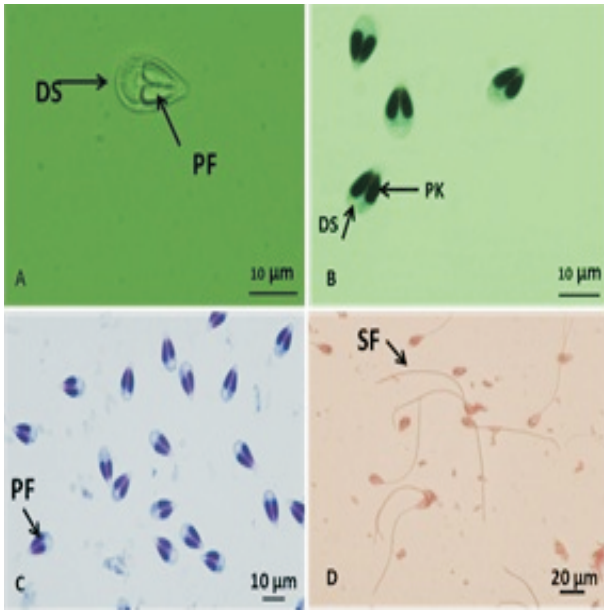
Hasil dan Pembahasan

Berdasarkan hasil identifikasi makroskopis patologis anatomis pada ikan yang diduga menderita *myxoboliosis* ditemukan kista berwarna keputihan dan/atau putih kemerahan dengan ukuran panjang 0,8 cm dan lebar 0,6 cm (Gambar 1). Kista penyebab *myxoboliosis* pada ikan mas Koi memiliki ukuran yang bervariasi tetapi berdasarkan hasil observasi dapat dikelompokkan menjadi dua tipe yaitu: 1. Kista tipe besar dengan ukuran diameter beberapa milimeter dan 2. Kista tipe kecil dengan diameter ≤ 1 milimeter (Egusa, 1988). Kista yang ditemukan dalam penelitian ini, berdasarkan ukurannya dapat dikategorikan sebagai kista tipe besar. Adanya kista dengan ukuran besar pada insang ikan penderita akan mengganggu fungsi pernafasan dan sering diikuti dengan kematian akibat kekurangan oksigen. Di dalam setiap kista diproduksi beberapa spora dengan ukuran panjang 12-15 mm, lebar 5-9 mm dan tebal 5-8 mm (Yokoyama *et al.*, 1997). Pada penelitian ini, digunakan teknik *wetmount* (Gambar 2 A), pewarnaan Giemsa (Gambar 2 B dan C) dan pewarnaan hematoksilin (Gambar 2 D) spora tampak berbentuk oval hingga piriformis dan memiliki 2 kapsul polar yang sama. Berdasarkan

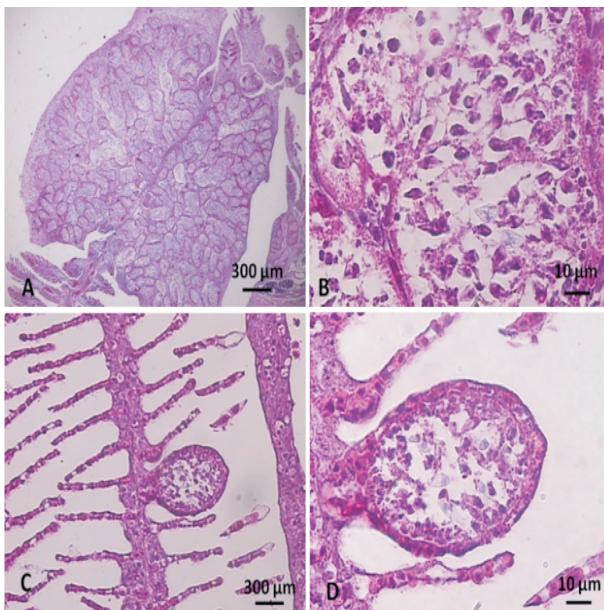
hasil pemeriksaan histopatologis dengan pewarnaan rutin hematoksilin dan eosin, ditemukan adanya fusi *lamella*, inflamasi, kongesti dan hiperplasia sel-sel epitelial. Sel-sel radang seperti limfosit dan makrofag, serta beberapa fibrosit tampak membentuk lapisan mengelilingi kista multilokuler (Gambar 3). Menurut Rukyani (1990), ikan yang terinfeksi kista multilokus biasanya menunjukkan gejala hipoksia yang ditandai dengan berenang di permukaan kolam dengan operkulum mengembang. Insang mengalami kongesti akibat bendung dari pembuluh darah kapiler di sekitar kista multilokuler. Gangguan pernafasan terjadi akibat tertutupnya permukaan *lamella* insang oleh kista.



Gambar 1. Foto mikrograf ikan koi yang diduga terinfeksi *Myxobolus sp.* Tampak kista berwarna putih (A) dan merah keputihan (B) ditemukan pada *lamella* insang. Kista dipisahkan dari jaringan insang dengan cara dipotong (C) dan dikumpulkan ke dalam tabung mikro berukuran 1,5 ml (D).

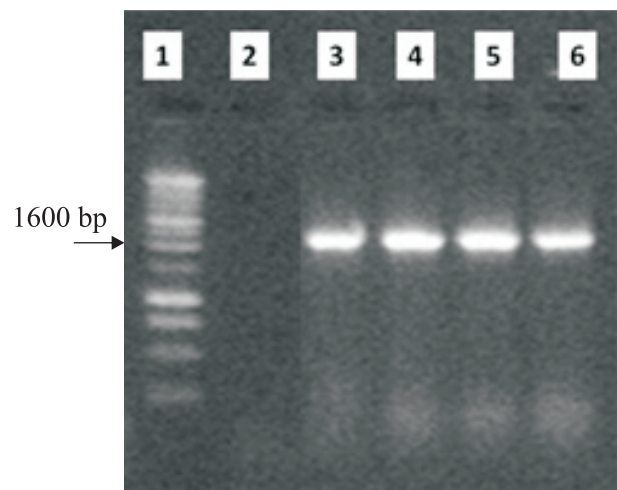


Gambar 2. Fotomikrograf *Myxobolus koi* dengan pemeriksaan *wet mount* (A), pewarnaan Giemsa (B & C) dan pewarnaan hematoksilin (D). DS = Dinding Sel, PF = Polar filamen, PK = Polar kapsul, SF = *Sutural* filamen.



Gambar 3. Fotomikrograf kista *Myxobolus sp.* dengan pewarnaan hematoksilin-eosin. Kista multilobus *Myxobolus sp.* (A dan B) dan kista unilobus *Myxobolus sp.* (C dan D).

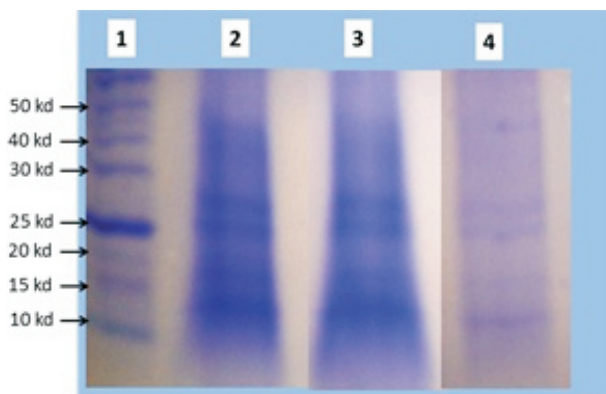
Pada penelitian ini, uji molekuler dengan *polymerase chain reaction* (PCR) konvensional menggunakan *universal eukaryotic primers* ERIB 1 dan ERIB 10 (Barta *et al.*, 1997; Fiala, 2006), pita DNA parasit terletak pada posisi 1600 bp (Gambar 4). Berdasarkan hasil uji identifikasi morfologik dilanjutkan dengan analisa molekuler dengan PCR, spora yang diisolasi dari ikan koi adalah *Myxobolus koi*, seperti yang dijelaskan oleh Camus and Griffin (2010).



Gambar 4. Hasil elektroforesis ekstrak DNA spora *Myxobolus sp.*: 1: DNA *marker* 1 Kb, 2: Negatif *Myxobolus sp.* dan 3-6: Sampel positif *Myxobolus sp.* 1600 bp.

Spora *M. koi* yang berasal dari kista pada insang ikan koi kemudian dimurnikan dengan teknik *percoll gradient*. Permurnian tersebut bertujuan untuk mengisolasi protein parasit yang bersifat imunogenik sebagai langkah awal produksi antibodi anti *M. koi*. Dari hasil uji *percoll gradient* diperoleh 5 lapisan, terdiri dari lapisan 2, 3 dan 4 yang berwarna krem keputihan dan berisi spora *M. koi* serta lapisan 1 dan 5 yang berwarna kemerahan dan tidak mengandung spora *M. koi*. Analisa molekuler dan

SDS PAGE dari spora yang berasal dari lapisan 2, 3 dan 4 menunjukkan profil DNA dan protein yang sama. Ukuran molekuler dari protein *M. koi* dalam penelitian ini adalah 12 Kd, 16 Kd, 25 Kd, 27 Kd, 40 Kd dan 45 Kd. Ukuran molekuler yang terlihat paling jelas adalah 12 Kd, 25 Kd dan 27 Kd. (Gambar 5).



Gambar 5. Profil protein dengan metode SDS PAGE. 1 = Marker 250 kd ; 2, 3 dan 4 adalah profil protein yang berasal dari lapisan 2; 3 dan 4.

Menurut Mayer (2011), sebagian besar imunogen yang baik memiliki ukuran molekuler \geq 100 kilodalton, sedangkan protein dengan ukuran molekuler $<$ 5-10 kilodalton merupakan imunogen yang kurang baik. Namun demikian, ukuran molekuler hanya merupakan salah satu faktor penentu imunogenisitas. Faktor lain yang mempengaruhi imunogenisitas dari protein adalah tingkat perbedaan struktural, komposisi kimiawi dan heterogeneitas, bentuk fisik dan tingkat kemudahan untuk didegradasi oleh makrofag.

Langkah selanjutnya perlu dilakukan purifikasi dari protein *Myxobolus koi* untuk mendapatkan isolat antigen murni yang dapat digunakan untuk memproduksi antibodi poliklonal anti *M. koi*.

Daftar Pustaka

- Barta, J.R., Martin, D.S., Liberator, P.A., Dashkevicz, M., Anderson, J.W., Feighner, S.D., Elbrecht, A., Perkins-Barrow, A., Jenkins, M.C., Danforth, H.D., Ruff, M.D. and Profousjuchleka, H. (1997) Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. *J. Parasitol.* 83: 262-271.
- Camus, A.C. and Griffin, M. J. (2010) Molecular characterization and histopathology of *Myxobolus koi* infecting the gillsof a koi, *Cyprinus carpio*, with an amended morphological description of the agent. *J. Parasitol.* 96: 116-124.
- Djajadiredja, R., Panjaitan, T.H., Rukyani, A., Satyani, D. and Supriyadi, H. (1983) Country report, Indonesia, p. 19-30. In: F.B. Davy and A. Chouinard (eds.) Fish quarantine and fish diseases in Southeast Asia. Report of workshop heldin Jakarta, Indonesia, 7-10 December 1982. *Intern. Developm. Res. Centre, Ottawa. Publ. No. IDRC-120e.*
- Egusa, S. (1988) Protozoan diseases. *Fish Pathol.* pp. 219-274.
- Fiala, I. (2006) The phylogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. *Int. J. Parasitol.* 36: 1521-1534.
- Knaus, M. and El-Matbouli, M. (2005) Lectin blot studies on proteins of *Myxobolus cerebralis*, The causative agent of whirling disease, Institute for Zoology, Fish Biology and Fish Diseases, Faculty of Veterinary, University of Munich, Germany.
- Kudo, R. (1920) Studies on myxosporidia: A synopsis of genera and species of myxosporidia. *Illinois Biological Monographs* 5: 1-265.

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lu'lu'in, H., Devi, N. A., Mahasri, G. and Kusdarwati, R. (2012) The relation of *Myxobolus koi* investment degree to the number of spore and the destruction degree of carp (*Cyprinus carpio* L.) intestine. *J. Aq. Fish Health*. 1:2.
- Mayer, G. (2011) Antigens. Chapter Three. Immunology Section of Microbiology and Immunology On-line.
- Rukyani, A. (1978) Two species of myxobolidae (Myxosporidia) from freshwater fishes in Java, *Pew. Lemb. Penel. Perik. Dar.* 1: 24-25.
- Rukyani, A. (1990) Histopathological changes in the gills of common carp (*Cyprinus carpio* L.) infected with Myxosporean Parasite *Myxobolus koi* Kudo, 1920. *Asian Fisheries Science* 3: 337-341.
- Sambrook, J. and Russell, D. (2001) Molecular cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY., USA.
- Yokoyama, H., Inoue, D., Kamamaru, A. and Wakabayashi, H. (1997) *Myxobolus koi* (Myxozoa: Myxosporidia) forms large- and small- type 'cysts' in gills of common carp. *Fish Pathol.* 32: 211-217.