

KASUS INFEKSI PENYAKIT *VIRAL NERVOUS NECROSIS* (VNN) PADA IKAN KERAPU DI PULAU BALI

Sri Suratmi^{*)} dan Ni Luh Tati Aryani^{*)}

^{*)} Teknisi Litkayasa pada Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol

ABSTRAK

Upaya pembenihan dan budidaya di KJA (keramba jaring apung) ikan kerapu masih dihadapkan pada banyak masalah, satu di antaranya adalah infeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN) yang dapat menyebabkan kematian hingga 100%. Infeksi penyakit VNN dapat dideteksi menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Ikan uji yang dianalisis adalah ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) dan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) yang diujikan oleh pembudidaya, pengusaha, dan praktisi hatcheri ikan disekitar Bali ke laboratorium bioteknologi Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut (BBRPBL) Gondol. Tahapan analisis sampel ikan uji meliputi: ekstraksi, amplifikasi, agaros elektroforesis, pewarnaan (*staining*), dan dokumentasi. Jumlah sampel ikan uji yang dianalisis pada tahun 2007 sebanyak 58 sampel (12 sampel ikan kerapu bebek dan 46 sampel ikan kerapu macan). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa 58% ikan uji kerapu bebek terinfeksi VNN, sedangkan pada kerapu macan hanya sebesar 24%. Sementara ikan uji yang tidak terinfeksi sebesar 42% (kerapu bebek) dan 76% (kerapu macan).

KATA KUNCI: deteksi VNN, PCR, kerapu bebek, kerapu macan

PENDAHULUAN

Ikan kerapu merupakan salah satu spesies ikan laut yang mempunyai nilai ekonomis tinggi. Namun, dalam pemeliharannya masih terdapat kendala, di antaranya adalah tingkat kematian yang masih relatif tinggi akibat penyakit infeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN). Virus ini umumnya menginfeksi stadia larva sampai yuwana dan menyerang sistem organ syaraf mata dan otak yang ditandai dengan gejala yang cukup spesifik karena ikan menampakkan tingkah laku berenang yang tidak normal dan umumnya ikan berdiam di dasar (Yuasa *et al.*, 2001).

Gejala yang tampak pada ikan yang terinfeksi VNN berbeda-beda sesuai dengan stadia atau umur ikan. Ikan yang berumur kurang dari 20 hari apabila terinfeksi VNN tidak menunjukkan gejala klinis kecuali kemauan makan yang menurun, ditandai dengan banyaknya sisa rotifer pada air pemeliharaan. Ikan umur 20—40 hari menunjukkan tingkah laku berenang yang abnormal yaitu ikan berenang di dekat permukaan air dan selanjutnya terjadi kematian di dasar bak pemeliharaan. Pada ikan yang berumur 2—4

bulan saat penempatan pada jaring apung ikan yang terinfeksi tampak diam/tidur di dasar jaring. Sedangkan ikan umur lebih dari 4 bulan terlihat berenang mengambang di atas permukaan air disertai adanya pembesaran gelembung renang (Koesharyani *et al.*, 2001).

Infeksi penyakit VNN pada ikan kerapu dapat dideteksi dengan cepat menggunakan *Polymerase Chain Reaction* atau PCR (Nishizawa *et al.*, 1994). Deteksi dilakukan untuk mengetahui tingkat infeksi pada benih ikan kerapu hasil budidaya terutama pada benih yang akan dibudidayakan di luar daerah Bali. Tujuan dari kegiatan ini adalah untuk mengetahui dan menginventarisasi tingkat infeksi penyakit VNN pada budidaya ikan kerapu di daerah Bali tahun 2007.

BAHAN DAN TATA CARA

Kegiatan ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol pada tahun 2007. Ikan uji yang digunakan adalah sampel ikan kerapu bebek dan kerapu macan hasil budidaya dari praktisi, pembudidaya, dan pengusaha yang diduga terkena infeksi penyakit VNN. Jumlah

sampel kerapu bebek sebanyak 12 ekor dan kerapu macan 46 ekor.

Bahan Dan Alat

Teknik deteksi VNN dengan metode PCR menggunakan alat-alat antara lain: mesin PCR, gunting, pinset, sarung tangan, *ependorf tube*, pistil/penggerus, *centrifuge*, pipet, tip, timbangan, elektroforesis, UV transiluminator, *gel camera*, polaroid film. Sedangkan bahan yang digunakan antara lain sampel ikan kerapu bebek dan ikan kerapu macan, kit IQ 2000, kloroform, isopropanol, ethanol 75%, dan DEPC.



Gambar 1. Peralatan yang dipergunakan untuk deteksi VNN

Cara Kerja

Langkah kerja deteksi VNN pada ikan uji meliputi beberapa tahapan, yaitu: ekstraksi, amplifikasi, elektroforesis, *staining* (pewarnaan), dan dokumentasi.

A. Ekstraksi

Ekstraksi pada ikan kerapu bebek dan kerapu macan yang akan dideteksi tingkat infeksiya merupakan serangkaian proses untuk memisahkan DNA dan RNA dari komponen-komponen sel lainnya. Tahapan ekstraksi diawali dengan mengambil organ mata atau otak ± 20 mg dan dimasukkan ke dalam mikrotube volume 1.500 mL untuk dihancurkan dengan menggunakan gunting atau pelet pestel. Kemudian ditambah RNA *extraction solution* sebanyak 500 μ L dan didiamkan dalam suhu ruang selama 5 menit lalu ditambah kloroform sebanyak 100 μ L dan sentrifuse selama 15 menit pada kecepatan 12.000 rpm diambil supernatan sebanyak 200 μ L dimasukkan kedalam mikrotube baru, ditambah isopropanol 200 μ L dan divortek agar tercampur rata lalu disentrifuse kembali

dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dengan cara dituang sehingga yang tertinggal hanya berupa pelet lalu ditambah ethanol 75% sebanyak 500 μ L dan disentrifuse lagi selama 5 menit dengan kecepatan 7.500 rpm. Selanjutnya larutan tersebut dituang dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan lalu diencerkan dengan DEPC ddH₂O.

B. Amplifikasi

Amplifikasi merupakan proses selanjutnya dan dibagi menjadi 2 tahap, yaitu RT (*Reverse Transcription*)-PCR dan Nested PCR. Campuran yang digunakan dalam RT-PCR adalah:

- a. RT-PCR *reaction* : 8 μ L/*reaction*
- b. RT-Pre-Mixed *reagent* : 7,0 μ L
- c. Iqzyme™ : 0,5 μ L
- d. RT Enzyme Mix : 0,5 μ L
- e. Genom RNA : 2 μ L

Pada tahap pertama, semua larutan tersebut dimasukkan ke dalam mikrotube dan selanjutnya diletakkan ke dalam mesin PCR selama ± 1 jam dengan menggunakan program RT-PCR VNN. Setelah tahap pertama selesai, mikrotube diambil dari mesin PCR dan ditambahkan larutan Nested PCR dan di-*flasing*, selanjutnya dimasukkan lagi ke dalam mesin PCR dengan menggunakan program Nested PCR. Campuran yang digunakan dalam larutan Nested PCR adalah:

- a. Nested PCR *reaction* : 15 μ L
- b. Nested PCR Pre-Mixed Reagent : 14 μ L
- c. Iqzyme™ : 1 μ L

Setiap mendeteksi sample dugaan infeksi VNN harus ditambahkan 2 sampel lagi sebagai kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol



Gambar 2. Mesin PCR yang dipergunakan untuk deteksi VNN

positif dan negatif sudah tersedia dalam kit yang digunakan. Setelah proses amplifikasi selesai dilanjutkan dengan tahap elektroforesis.

C. Elektroforesis

Elektroforesis adalah proses migrasi fragmen DNA berdasarkan aliran listrik di dalam gel yang direndam dalam larutan penyangga. Fragmen DNA yang lebih ringan bobot molekulnya akan berjalan lebih cepat dari molekul DNA yang lebih berat. Sebelum melakukan elektroforesis terlebih dahulu dibuat agarose gel.

1. Pembuatan Agarose Gel

Agarose sebanyak 1,5 g dilarutkan dalam 100 mL larutan 1 x TAE Buffer, kemudian dipanaskan dengan microwave selama \pm 2 menit. Setelah larutan berwarna bening, didinginkan sebentar dan larutan agarose dituangkan kedalam cetakan agarose yang dilengkapi dengan sisir (*comb*). Agarose dibiarkan hingga membeku. Setelah dingin, sisir dilepaskan secara perlahan dan hati-hati agar agarose gel tidak rusak. Agarose gel siap digunakan untuk proses elektroforesis.



Gambar 3. Cetakan Agarose gel

2. Proses Elektroforesis

Larutan 1 x TAE Buffer disiapkan sebanyak 300 mL dan dimasukkan ke dalam wadah elektroforesis, kemudian agarose gel yang sudah siap dimasukan ke dalam alat elektroforesis. Selanjutnya 4 mL *loading dye* 6 x diletakkan di atas parafilm, dan dipipet sebanyak 5 mL *PCR product* kemudian dicampur dengan *loading dye* hingga homogen menggunakan mikropipet. Campuran *PCR product* dengan *loading dye* tersebut dimasukkan ke dalam sumuran yang berada dalam agarose gel

menggunakan mikropipet. Proses elektroforesis siap dilakukan dengan menyalakan alat elektroforesis selama 25 menit. Selanjutnya adalah tahap *staining* (pewarnaan).



Gambar 4. Alat elektroforesis

D. Staining (Pewarnaan)

Agarose gel yang telah di elektroforesis kemudian direndam dalam larutan 1 x TAE Buffer yang sudah dicampur dengan Ethidium Bromide, dengan perbandingan 100 mL 1 x TAE Buffer dan 10 mL Ethidium Bromide. Perendaman agarose gel dilakukan selama 15 menit, selanjutnya agarose gel dicuci dengan merendamnya dalam akuades selama 5—10 menit.

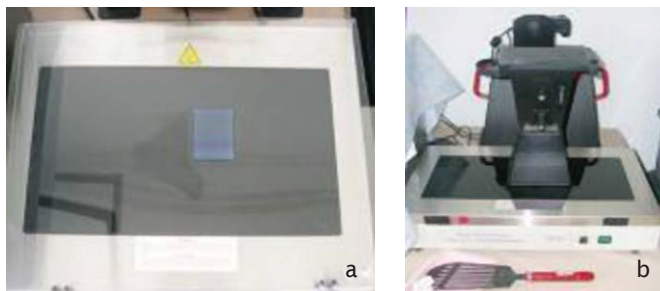
E. Dokumentasi

Hasil deteksi VNN dilihat dengan menggunakan UV Transilluminator dan difoto menggunakan gel kamera Polaroid (Gambar 5a, 5b). Indikator tingkat akurasi analisis dapat dilihat dari tidak adanya fragment DNA pada kontrol negatif. Bila terjadi fragment DNA pada kontrol negatif berarti analisis mengalami kontaminasi sehingga perlu dilakukan pengu-langan.

HASIL DAN BAHASAN

Dari analisis yang telah dilakukan pada tahun 2007 didapatkan data yang terlihat pada Tabel 1.

Dari 12 sampel ikan kerapu bebek yang dianalisis ternyata 58% ikan terinfeksi VNN sedangkan dari 46 sampel ikan kerapu macan yang dianalisis, hanya 24% ikan yang terinfeksi VNN. Sampel yang terinfeksi terlihat adanya



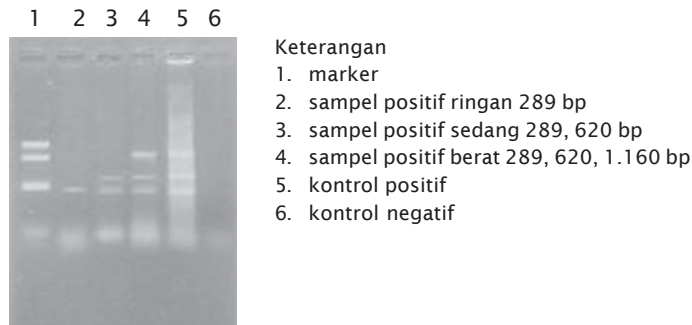
Gambar 5. a. UV transilluminator;
b. Polaroid gel camera

Tabel 1. Data analisis VNN Ikan kerapu bebek dan kerapu macan pada tahun 2007

Bulan	Kerapu bebek			Kerapu macan		
	Positif	Negatif	Jumlah	Positif	Negatif	Jumlah
Januari	2	1	3	3	5	8
Februari	-	-	-	-	6	6
Maret	5	4	9	-	5	5
April	-	-	-	4	3	7
Mei	-	-	-	-	3	3
Juni	-	-	-	-	1	1
Juli	-	-	-	1	3	4
Agustus	-	-	-	1	2	3
September	-	-	-	-	-	0
Oktober	-	-	-	-	-	0
November	-	-	-	1	3	4
Desember	-	-	-	1	4	5
Jumlah	7	5	12	11	35	46

fragment yang sejajar dengan kontrol positif (Gambar 6). Hal ini membuktikan bahwa kerentanan infeksi VNN lebih tinggi pada kerapu bebek. Infeksi pada ikan kerapu bebek tertinggi terjadi pada bulan Maret 2007 (5 sampel), sedangkan infeksi pada ikan kerapu macan tertinggi pada bulan April 2007 (4 sampel), karena pada bulan-bulan tersebut merupakan musim peralihan dari musim penghujan ke musim kemarau sehingga air laut yang digunakan kurang bagus kualitasnya. Virus ini sangat berbahaya dan menginfeksi ikan mulai dari larva, yuwana sampai dewasa. Tingkat kematian ikan yang telah terinfeksi VNN sangat tinggi, yakni mencapai lebih dari 80%. Jenis ikan kerapu merupakan jenis ikan yang paling gampang terserang VNN. Serangan virus ini mempunyai prevalensi sampai 100% (Nishzawa

et al., 1999). Terserangnya ikan oleh virus VNN diduga disebabkan oleh berbagai faktor di antaranya adalah kondisi lingkungan yang tidak mendukung akibat terjadinya angin kencang pada awal bulan September (minggu ke-6) menyebabkan gelombang air cukup besar dan menimbulkan pengadukan sehingga air menjadi keruh diduga kualitas air tidak mendukung kehidupan ikan. Air yang keruh banyak mengandung partikel-partikel air laut yang dapat menyumbat insang ikan, mengganggu pernafasan, dan berlanjut dengan kematian. Selain itu kondisi perairan dengan pola arus yang tidak tenang dapat mengakibatkan ikan stres sehingga tidak mempunyai nafsu makan. Hal ini berdampak negatif terhadap vitalitas tubuh ikan yang menjadi lemah.



Gambar 6. Hasil analisis sampel menggunakan metode PCR dengan kit IQ-2000

KESIMPULAN

Kasus infeksi penyakit VNN lebih banyak terjadi pada ikan kerapu bebek (58%) dibandingkan infeksi pada kerapu macan (24%). Nampaknya, kerapu bebek lebih rentan terinfeksi penyakit VNN.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Dr. Haryanti, M.S. dan seluruh peneliti serta teknisi Laboratorium Bioteknologi BBRPBL Gondol atas bimbingan dan kerja samanya dalam pelaksanaan kegiatan hingga penyusunan makalah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Koesharyani, I., Des Roza., K. Mahardika, F. Jhony, Zafran, dan K. Yuasa. 2001. Penuntun Diagnosa Ikan II. Penyakit Ikan Laut dan Krustacea di Indonesia. Balai Penelitian Perikanan Laut Gondol.
- Yuasa, K., I. Koesharyani, D. Roza, F. Jhonny, and Zafran. 2001. Manual for PCR procedure; Rapid diagnosis on Viral Nervous Necrosis (VNN) in grouper. Lolitkanta-JICA Booklet. 13. 35 pp.
- Nishizawa, T., K.I. Mori, T. Nakai, I. Furusawa, and K. Muroga. 1994. Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification of RNA of Stripped Jack Viral Nervous Necrosis (SVNN). Diseases of Aquatic Organism. 18: 103—107.