

INFEKSI VIRAL NERVOUS NECROSIS PADA BENIH IKAN KERAPU BEBEK, *Cromileptes altivelis*

Isti Koesharyani¹⁾, Ketut Mahardika²⁾, dan Kei Yuasa³⁾

ABSTRAK

Sejak tahun 1998, kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) telah berhasil dibenihkan di Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut (BBRPBL), Gondol-Bali. Teknik ini sudah banyak diaplikasikan oleh sentra-sentra perbenihan baik pemerintah ataupun swasta di Bali, Jawa, dan Sumatera. Kendala utama yang sering dihadapi adalah tingkat kematian yang masih tinggi terutama pada stadia larva hingga yuwana. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya virus penyebab kematian massal pada stadia larva dan post-larva kerapu bebek menggunakan metode *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) yang ditunjang dengan analisis histopatologi dan uji patogenisitas terhadap yuwana kerapu bebek. Sampel ikan sakit diperoleh dari panti benih BBRPBL, Gondol-Bali dan panti benih swasta di sekitarnya. Selanjutnya dari sampel tersebut diambil mata dan otaknya untuk mendeteksi adanya infeksi virus dengan teknik RT-PCR menggunakan spesifik primer. Juga dilakukan analisis histopatologi dan uji patogenisitas terhadap yuwana kerapu bebek. Hasil penelitian menunjukkan bahwa larva dan post-larva ikan kerapu bebek yang sakit menunjukkan gejala berenang lemah dan tak terarah di permukaan air. Sedangkan dengan teknik RT-PCR ternyata positif nodavirus sebagai penyebab VNN. Secara histopatologi, ditemukan adanya kerusakan, degenerasi, dan vakuolasi pada jaringan retina mata dan otak. Dari uji patogenisitas, ikan yang terinfeksi menunjukkan gejala yang sama dengan post-larva ikan kerapu bebek dalam waktu 4—5 hari setelah infeksi dan deteksi dengan RT-PCR ternyata positif VNN.

ABSTRACT: *Viral Nervous Necrosis infection in humpback grouper, Cromileptes altivelis. By: Isti Koesharyani, Ketut Mahardika, and Kei Yuasa*

Since 1998, Gondol-Bali Research Institute for Mariculture has been succeeded to develop humpback grouper culture technique. Government and private hatcheries in Bali, Java, and Sumatra have adopted this technology. The main problem is high mortalities during larva-juvenile stages. The aim of this study was to know the virus causing of mass mortality of larvae and post-larvae stages of the humpback grouper using RT-PCR methods and histopathologically and pathogenisity test to the juvenile humpback grouper. Affected fish were collected from Gondol-Bali Research Institute for Mariculture hatchery and private hatchery around it. The eyes and brains were taken from the sample for detection of virus with Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) technique using specific primers. Histopathology analyses and pathogenisity test were also done to the juvenile humpback grouper. The result of the experiment showed that affected larvae and post-larvae humpback grouper loss in their appetite, weakened and abnormal swimming on water surface. The virus detection using RT-PCR showed positively that nodavirus was the cause of VNN. Histopathologically, showed necrosis, degeneration and vacuolation in the retina and brain. From pathogenisity test, infected fish showed same clinical sign with post-larvae humpback grouper within 4—5 days post infection and detection virus by RT-PCR was positive VNN.

KEYWORDS: *humpback grouper, Cromileptes altivelis, Viral Nervous Necrosis (VNN)*

PENDAHULUAN

Salah satu jenis kerapu yang mempunyai nilai ekonomis tinggi adalah kerapu bebek atau kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*). Selain sebagai ikan konsumsi, ikan ini dapat juga dijadikan sebagai ikan hias. Di Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut (BBRPBL), Gondol-Bali, teknik pembenihan ikan

tersebut sudah dikembangkan sejak tahun 1998 (Aslianti, 1996).

BBRPBL, Gondol-Bali pada tahun 1998 telah berhasil membenihkan ikan kerapu bebek tetapi dengan jumlah yang relatif kecil yaitu hanya sekitar 2.000—5.000 ekor pada setiap siklus pemeliharaan. Selanjutnya pada tahun 2000 dengan berkembangnya teknik pemeliharaan telah berhasil memproduksi

¹⁾ Peneliti pada Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol

²⁾ Japan International Cooperation Agency ATA-379

yuwana dengan jumlah yang bervariasi antara 10.000—70.000 ekor per siklus pemeliharaan. Selama produksi benih kerapu bebek, sering ditemukan kematian terutama pada stadia larva hingga yuwana, sehingga hasilnya tidak stabil.

Virus VNN (*Viral Nervous Necrosis*) di Indonesia pertama kali diketahui menginfeksi kakap putih, *Lates calcarifer* yang dibenihkan pada hatchery di Jawa Timur pada tahun 1997 (Zafran *et al.*, 1998). Kemudian infeksi VNN juga ditemukan pada benih ikan kerapu bebek di hatchery komersial di sekitar Gondol dan di BBRPBL dan berhasil dideteksi dengan menggunakan teknik RT-PCR (Koesharyani *et al.*, 1999; Zafran *et al.*, 2000). BBRPBL bekerja sama dengan proyek JICA ATA-379 melakukan beberapa serangkaian pengujian tentang VNN dan deteksi dini menggunakan teknik *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) pada setiap siklus produksi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui penyebab kematian massal pada stadia larva dan post-larva kerapu bebek dengan menggunakan metode RT-PCR yang ditunjang analisis histopatologi dan uji patogenisitas terhadap yuwana kerapu bebek.

BAHAN DAN METODE

Sampel Ikan Sakit

Sampel ikan sakit didapat dari panti benih ikan kerapu bebek di BBRPBL dan dua panti benih swasta, di Dusun Gondol, Desa Penyabangan dan Desa Gerokgak, Buleleng-Bali. Ikan-ikan sakit tersebut kemudian disimpan pada suhu -85°C untuk dijadikan bahan inokulum virus, sebagian disimpan dalam larutan alkohol 70% untuk pengujian RT-PCR dan sebagian lainnya disimpan dalam 10% *buffer formalin* untuk pengamatan histologi. Khusus untuk pengamatan histopatologi, ikan yang digunakan dalam keadaan hidup atau lemah dan secepatnya difiksasi dalam 10% *buffer formalin*.

Deteksi Virus

Bagian kepala dari 10—15 ekor larva dan bagian mata serta otak yuwana ikan kerapu bebek yang sakit dimasukkan ke dalam eppendorff steril dan digunakan untuk mendeteksi virus dengan teknik RT-PCR.

Adapun tahapan dalam mendeteksi virus adalah: Ekstraksi RNA menggunakan isogen (Iwamoto *et al.*, 1999) sebanyak 1 mL dan disentrifugasi 12.000 g selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatannya diambil dan ditambahkan dengan 200 mL chloroform serta disentrifugasi 12.000 g selama 15 menit pada suhu 4°C. Lapisan atas (RNA) diambil dan ditambahkan dengan 500 mL isopropanol serta disentrifugasi 12.000 g selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatannya dibuang dan ditambahkan dengan 1 mL alkohol 70% serta disentrifugasi 12.000 g selama 10 menit pada suhu 4°C. Selanjutnya supernatannya dibuang dan dikeringkan dalam alat vakum selama 15 menit. Tahapan berikutnya adalah mengamplifikasi atau penggandaan c-DNA VNN menggunakan spesifik primer yaitu F2 (CgTgTCAgTCATgTgTCgCT) dan R3 (CgAgTCAACACgggTgAAGa), primer F2 dan R3 tersebut merupakan hasil sekuensing dari *Striped Jack Nervous Necrosis Virus* (SJNNV), pada T-4 dengan target molekul 426 bp. (Nishizawa *et al.*, 1994). Di dalam amplifikasi, RNA tersebut diubah dahulu ke dalam bentuk c-DNA dengan bantuan reverse enzim pada suhu 48°C selama 45 menit dan 94°C selama 2 menit, proses selanjutnya adalah penggandaan c-DNA dilakukan sebanyak 25 kali dengan suhu denaturasi 95°C selama 40 detik, suhu annealing 55°C selama 40 detik, dan suhu polimerasi 72°C selama 40 detik, untuk pemantapan dan penyimpanan secara berturut-turut adalah 72°C selama 5 menit dan 4°C hingga digunakan dalam proses selanjutnya. Untuk mengetahui adanya infeksi virus, hasil amplifikasi RT-PCR selanjutnya dielektroforesis pada 1,5% agarose gel selama 25 menit dalam TAE buffer dan diwarnai dengan ethidium bromida selama 10—15 menit. Pembacaan hasil dilakukan dengan UV transilluminator dan difoto sebagai dokumentasi menggunakan polaroid kamera. Teknik deteksi VNN dengan RT-PCR yang dilakukan di BBRPBL telah dimodifikasi sedemikian rupa sehingga mudah dalam pengerjaannya (Yuasa *et al.*, 2001).

Pengamatan Histopatologi

Untuk lebih memperjelas kejadian penyakit, dilakukan juga analisis histopatologi di laboratorium penyakit BBRPBL. Larva (seluruh tubuh) dan organ

Tabel 1. Sampel ikan kerapu bebek yang digunakan, asal, umur, dan gejala klinis
Table 1. The used fish samples, origin, ages, and symptom

Jenis sampel (<i>Fish samples</i>)	Asal (<i>Origin</i>)	Umur (<i>Age</i>)	Gejala klinis (<i>Symptom</i>)
<i>C. altivelis</i>	BBRPBL	27 hari (<i>27 days-old</i>)	Berenang lemah (<i>Weakened</i>)
<i>C. altivelis</i>	Gerokgak-Bali	11 hari (<i>11 days-old</i>)	Tidak mau makan (<i>Loss of appetite</i>)
<i>C. altivelis</i>	Gondol-Bali	17 hari (<i>17 days-old</i>)	Tidak mau makan (<i>Loss of appetite</i>)

dalam (hati, ginjal, limpa, jantung, insang mata, dan otak) dari yuwana ikan sakit yang masih hidup setelah difiksasi dalam 10% *buffer formalin* selanjutnya diproses berdasarkan metode Gunarso (1989) yang telah dimodifikasi. Kemudian semua sampel di-*embedding* dalam parafin dan dipotong dengan ketebalan 3—5 μm serta diwarnai dengan haematoxylin-eosin (H&E). Selanjutnya perubahan jaringan diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 10—40 x.

Percobaan Infeksi Buatan

Masing-masing sebanyak 10 ekor yuwana ikan kerapu bebek berumur 4—5 bulan diberi perlakuan: A) diinfeksi inokulum VNN dengan dosis 0,1 mL/ekor melalui penyuntikan intra muskular, dan B) disuntik dengan larutan *phosphate buffer saline* (PBS) dengan jumlah yang sama sebagai kontrol. Sediaan inokulum yang digunakan berasal dari mata dan otak yuwana kerapu bebek yang positif terinfeksi VNN (uji RT-PCR). Inokulum (kualitatif) dibuat berdasarkan metode Arimoto *et al.* (1993). Pengamatan dilakukan terhadap gejala klinis, mortalitas yang ditimbulkan selama 2 minggu pemeliharaan, uji PCR, dan histopatologi.

HASIL DAN BAHASAN

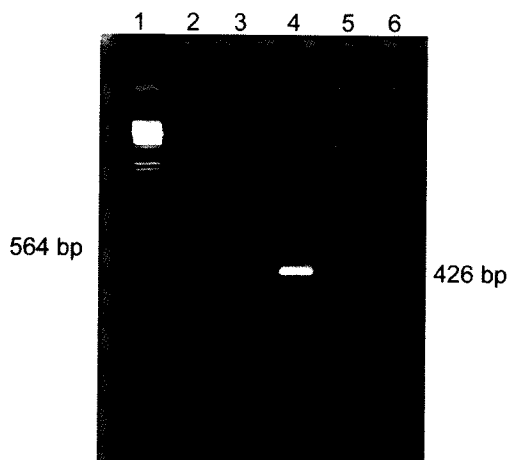
Gejala Klinis

Pengamatan yang dilakukan di lokasi kejadian menunjukkan bahwa pada larva ikan kerapu bebek umur 11 dan 17 hari tidak ditemukan gejala khusus, ikan tampak lemah dan nafsu makannya berkurang,

hal ini dapat dilihat dari sisa rotifera pada air pemeliharaan. Sedangkan pada stadia post-larva (umur 27 hari) ikan yang sakit tampak berenang lemah dan tidak terarah pada permukaan air, juga ditemukan kematian ikan pada dasar bak pemeliharaan. Dari pengamatan yang dilakukan, gejala klinis dari ikan yang sakit menunjukkan gejala yang sama dengan infeksi VNN. Hal ini sesuai dengan pendapat Yuasa *et al.* (2001) yang mengatakan bahwa ikan yang terinfeksi virus VNN umumnya menunjukkan gejala tingkah laku berenang yang tidak normal yaitu berputar-putar dan diam di dasar air. Lebih jauh dikatakan bahwa terdapat perbedaan gejala klinis pada setiap stadia ikan yang terinfeksi VNN, pada stadia larva hanya menunjukkan nafsu makan menurun yang dapat dilihat dari sisa rotifera pada air pemeliharaan sedang pada stadia yang lebih besar (yuwana) menunjukkan gejala berenang lemah dan diam di dasar bak.

Deteksi Virus dengan RT-PCR

Kematian pada budi daya ikan kerapu bebek, *C. altivelis* sudah dipastikan disebabkan oleh partikel virus dengan bentuk ikosahedral yang tidak terbungkus. Partikel virus ini digolongkan ke dalam *nodaviridae* atau dalam perikanan dikenal sebagai *Piscine Nodavirus* atau VNN dan termasuk ke dalam RNA virus. Dari hasil analisis RT-PCR yang dilakukan di Laboratorium Penyakit BBRPBL, kematian massal pada larva dan fingerling ikan kerapu bebek yang sering terjadi di panti benih BBRPBL dan swasta di sekitarnya disebabkan oleh adanya infeksi VNN. Ini ditandai dengan penampakan pita tunggal dengan



Gambar 1. Gel agarose elektroforesis RT-PCR hasil amplifikasi dari kerapu bebek, *C. altivelis*. Baris 1: Marker I Hind III; 2: Sampel ikan kerapu bebek umur 27 hari; 3: Sampel ikan kerapu bebek umur 17 hari; 4: Sampel ikan kerapu bebek umur 11 hari; 5: Positif kontrol; 6: Negatif kontrol

Figure 1. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR amplification from humpback groupers, *C. altivelis*. Line 1: Marker I Hind III; 2: Sample humpback grouper 27 day-old; 3: Sample humpback grouper 17 day-old; 4: Sample humpback grouper 11 day-old; 5: Positive control; 6: Negative control

bobot molekul 426 bp. pada agarose gel (Gambar 1). Pada agarose gel terlihat pita sampel ikan kerapu bebek umur 17 hari (No. 4) lebih terang, hal ini disebabkan karena infeksi VNN pada ikan tersebut pada waktu pengambilan sampel sudah parah atau akut.

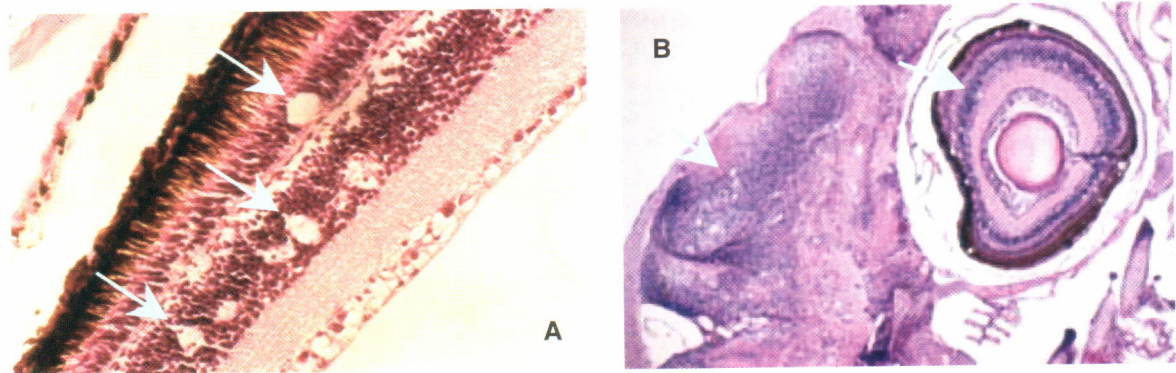
Analisis Histopatologi

Hasil analisis histopatologi menunjukkan adanya vakuolasi serta degenerasi dan necrosis pada retina mata dan otak. Vakuolasi terutama terjadi pada bagian bipolar dan inti ganglion (ganglionik nuklear) dari retina mata (Gambar 2A dan 2B). Pada otak, vakuolasi

al., 1998; Zafran *et al.*, 2000; Bloch *et al.*, 1991; Boonyaratpalin *et al.*, 1996; Chua *et al.*, 1995). Sedangkan pengamatan dengan elektron mikroskop yang dilakukan pada kakap putih, *L. calcarifer* yang terserang VNN di Indonesia dapat dilihat adanya partikel virus yang berdiameter 30 nm (Zafran *et al.*, 1998).

Infeksi Buatan

Ikan uji pada kelompok A memperlihatkan gejala klinis infeksi VNN mulai hari ke-4 sampai ke-5 setelah diinfeksi, dengan gejala awal nafsu makan menurun yang ditandai dengan ikan sedikit mau mencari dan



Gambar 2. A) Retina mata post-larva kerapu bebek, *C. altivelis* yang terserang VNN dengan vakuolasinya (tanda panah) (pewarnan H&E, 40x) dan B) Mata dan otak dari larva kerapu bebek yang terserang VNN dengan vakuolasinya (tanda panah) (pewarnan H&E, 10x)

Figure 2. A) Eye retina of post-larvae humpback grouper, *C. altivelis* infected by VNN with its vacuolation (arrow) (H&E stain, 40x) and B) Eye and brain of larvae humpback grouper infected by VNN with its vacuolation (arrow) (H&E stain, 10x)

terutama tampak pada telencephalon, diencephalons, dan cerebellum (Gambar 2B). Sedangkan pada hati, ginjal, limpa, jantung, insang tidak ditemukan adanya perubahan. Akibat kerusakan pada jaringan saraf pusat membuat ikan menjadi hilang keseimbangan sehingga ikan menunjukkan gejala berenang lemah atau tanpa arah serta diam di dasar air. Indikasi kerusakan jaringan pada kerapu bebek ini ternyata sama dengan kerusakan yang terjadi pada kasus VNN pada ikan budi daya lainnya (Glazerbrook *et al.*, 1990; Munday *et al.*, 1992; Arimoto *et al.*, 1993; Zafran *et*

memakan pakan pelet yang diberikan. Beberapa hari kemudian nafsu makannya menjadi hilang, kemudian berdiam di dasar serta berenang tidak terarah. Hal demikian tidak berlangsung lama karena ikan segera mati. Ikan yang mati tampak warnanya lebih gelap dan bagian tubuh yang menghadap ke bawah di dasar bak dan warna tubuhnya hilang atau putih. Mortalitas ikan uji yang diinfeksi VNN mencapai 70% selama dua minggu pemeliharaan, sedangkan kelompok kontrol tidak terjadi kematian (Tabel 2). Hasil deteksi dengan RT-PCR menggunakan organ otak dan mata

Tabel 2. Jumlah kematian ikan kerapu bebek setelah diinfeksi dengan virus VNN secara intramuskular dengan dosis 0,1 mL/ekor dan kontrol selama 2 minggu pemeliharaan

Table 2. Total mortality of *Cromileptes altivelis* after being infected intramuscularly by VNN virus with the dosage of 0.1 mL/fish and control for two weeks rearing

Kelompok Group	Ikan uji Tested fish	Perlakuan VNN treatment	Total kematian Total mortality	Persentase kematian Mortality percentage
A	<i>C. altivelis</i>	0.1 mL/ikan (fish)	7/10	70%
B	<i>C. altivelis</i>	Kontrol (Control)	0/10	0%

dari ikan-ikan yang mati tersebut ternyata positif VNN. Sedangkan kelompok ikan kontrol (perlakuan B) tidak menampakkan gejala klinis seperti pada kelompok A dan hasil deteksi dengan RT-PCR ternyata negatif VNN. Hasil analisis histopatologi ikan yang sakit pada perlakuan A menunjukkan hasil yang sama dengan larva dan post-larva yang terinfeksi secara alami yaitu adanya vakuolasi serta degenerasi dan necrosis pada retina mata dan otak, sedangkan pada kontrol tidak tampak adanya perubahan. Sebagai pembanding infeksi buatan dengan cara perendaman dengan inokulum VNN terhadap ikan kerapu umur 2 bulan juga menghasilkan gejala yang sama dengan serangan VNN (Zafran *et al.*, 2000).

KESIMPULAN

VNN merupakan jasad patogen penyebab kematian massal pada larva (umur 11 dan 17 hari) dan fingerling (umur 27 hari) pada ikan kerapu bebek, *C. altivelis* di BBRPBL, Gondol-Bali dan sekitarnya. Secara histopatologi, terjadi degenerasi dan vakuolasi pada retina mata dan otak. Dari infeksi buatan yang dilakukan terhadap yuwana kerapu bebek umur 4—5 bulan menunjukkan gejala klinis, gambaran histopatologi yang sama dengan larva dan post-larva ikan kerapu bebek yang terinfeksi VNN secara alami.

DAFTAR PUSTAKA

- Aslianti, T. 1996. Pemeliharaan larva kerapu bebek dengan padat tebar berbeda. *J. Pen. Per. Indonesia* Departemen Pertanian, Jakarta, 2(2): 7—12.
- Arimoto, M., K. Mori, T. Nakai, K. Muroga, and I. Furusawa. 1993. Pathogenicity of the causative agent of viral nervous necrosis disease in striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch and Schneider). *J. Fish Disease*, 16: 461—469.
- Bloch, B., K. Gravningen, and J.L. Larsen. 1991. Encephalomyelitis among turbot associated with apicornavirus-like agent. *Dis. of Aquatic Organism*, 10: 65—70.
- Boonyaratpalin, S., K. Supamattaya, J. Kasornchandra, and H. R. Hoffman. 1996. Picorna-like virus associated with mortality and spongy encephalopathy in grouper *Epinephelus malabaricus*. *Dis. of Aquatic Organism*, 26: 75—80.
- Chua, F.H.C., J.J. Loo, and J.Y. Wee. 1995. Mass mortality in juvenile grasy grouper, *Epinephelus tauvina*, associated with vacuolating encephalopathy and retinopathy. *Diseases in Asian Aquaculture*, p. 253—241.
- Glazerbrook, J.S., M.P. Heasman, and S.W. de Beer. 1990. Picorna-like viral particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Journal of Fish Diseases*, 13: 245—249.
- Gunarso, W. 1989. *Mikroteknik*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat Institut Pertanian Bogor.
- Iwamoto, T., K. Mori, M. Arimoto, and T. Nakai. 1999. High permissivity of the fish cell line SSN-1 for Piscine nodaviruses. *Dis. Aquat. Organism*, 39: 37—47.
- Koesharyani, K., Zafran, dan K. Yuasa. 1999. Deteksi viral nervous necrosis (VNN) menggunakan polymerase chain reaction (PCR) pada ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis*. *Prosiding Seminar Nasional Penelitian dan Desiminasi Teknologi Budidaya Laut dan Pantai*, Jakarta. p. 237—240.
- Koesharyani, I., D. Roza, K. Mahardika, F. Johnny, Zafran, and K. Yuasa. 2001. *Manual for Fish Disease Diagnosis-II*. Reserch Institute for Mariculture, Central Research Institute for Fisheries and Japan International Cooperation Agency. ISBN: 979-8186-81-S, 48 pp.
- Munday, B.L., J.S. Langdon, A. Hyatt, and J.D. Humphrey. 1992. Mass mortality associated with a viral-induced vacuolating encephalopathy and retinopathy of larval and juvenile barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Aquaculture*, 103: 197—211.
- Munday, B.L. and T. Nakai. 1997. Special topic review: Nodavirus as pathogen in larval and juvenile marine finfish. *Word Journal of Microbiology and Biotechnology*. 13: 375—381.
- Nishizawa, T., K.I. Mori, T. Nakai, I. Furusawa, and K. Muroga. 1994. Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification of RNA of Striped Jack Viral Nervous Necrosis (SJVNN). *Diseases of Aquatic Organism*, 18: 103—107.
- Yuasa, K., I. Koesharyani, D. Roza, K. Mahardika, F. Johnny, and Zafran. 2001. Manual for PCR procedure: Rapid diagnosis on Viral Nervous Necrosis (VNN) in grouper. *Lolitkanta-JICA Booklet* No. 13, 35 pp.
- Zafran, T. Harada, I. Koesharyani, K. Yuasa, and K. Hatai. 1998. Indonesian hatchery reared sea bass larvae (*Lates calcarifer*), associated with viral nervous necrosis (VNN). *Inoonesian FR Journal*, IV (I): 19—22.
- Zafran, I. Koesharyani, F. Johnny, K. Yuasa, T. Harada, and K. Hatai. 2000. Viral nervous necrosis in humpback grouper *Cromileptes altivelis* larvae and juveniles in Indonesia. *Fish Pathology*, 35 (2): 95—96.

