

DETEKSI VIRAL NERVOUS NECROSIS (VNN) PADA BENIH KERAPU MACAN (*Epinephelus fuscoguttatus*) DENGAN METODE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Bambang Susanto, Ketut Mahardika, Haryanti, dan I Gusti Ngurah Permana

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol-Bali bertujuan untuk mengetahui infeksi virus-VNN pada pemeliharaan benih ikan kerapu macan yang memiliki ukuran berbeda. Benih ikan diseleksi berdasarkan ukuran besar, sedang, dan kecil, kemudian berturut-turut diambil organ otak dan mata, ekstraksi genom RNA, amplifikasi PCR dengan menggunakan 2 primer yaitu F2 (P6): 5'-CGT GTC AGT CAT GTG TCG CT-3' dan R3 (P5): 5'-CGA GTC AAC ACG GGT GAA GA-3'. Pengamatan pita DNA yang tervisualisasi dilakukan dengan agarose gel elektroforesis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sampel benih ikan yang berukuran besar dan sedang tidak menampakkan pita (seperti kontrol negatif), sementara benih ikan yang berukuran kecil menunjukkan pita yang samar dengan panjang fragmen DNA sekitar 426 bp (sesuai dengan kontrol positif). Hal di atas mengindikasikan benih ikan kerapu macan yang dipelihara selama 45--60 hari dalam bak pemeliharaan tidak terserang VNN pada benih yang berukuran besar dan sedang, sementara benih ikan yang kecil terinfeksi oleh VNN.

ABSTRACT: *Detection of Viral Nervous Necrosis (VNN) on brown marbled grouper (Epinephelus fuscoguttatus) by using Polymerase Chain Reaction (PCR). By: Bambang Susanto, Ketut Mahardika, Haryanti, and I Gusti Ngurah Permana*

This experiment was conducted at Research Institute for Mariculture Bali. The aim of this experiment was to know VNN infection of different sizes of fish. Fish fry sample were collected in different sizes i.e. large, medium, and small. The eye and brain were taken from the samples followed by the extraction of RNA genome, PCR amplification by using 2 primers i.e. F2 (P6): 5'-CGT GTC AGT CAT GTG TCG CT-3' and R3 (P5): 5'-CGA GTC AAC ACG GGT GAA GA-3'. PCR product was detected by agarose gel electrophoresis, and band pattern of DNA genomic were observed under ultraviolet transilluminator. The result showed that fries in large and medium sizes did not indicate any single band (similar to negative control), while small size fish sample showed obscure band of about 426 bp (similar to positive control). This experiment indicated that after being reared for 45--60 days in hatchery large and medium size fries were not infected by VNN, while small, size fries were.

KEYWORDS: VNN, *Epinephelus fuscoguttatus*, PCR

PENDAHULUAN

Kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) merupakan salah satu jenis ikan demersal yang menyukai hidup di daerah perairan berkarang, di antara celah karang atau di dalam gua di dasar perairan. Ikan yang bersifat karnivora ini tergolong kurang aktif dan mudah dibudidayakan karena mempunyai daya adaptasi cukup tinggi (Anonymous, 1998).

Ikan kerapu termasuk famili Serranidae, subfamili Epinephelinae, Genus *Epinephelus*, termasuk jenis ikan ekonomis penting. Di samping harganya yang

cukup tinggi, daging kerapu memiliki rasa lezat dan lembut serta nilai gizi yang tinggi. Pemasaran ikan kerapu banyak dilakukan di beberapa negara seperti Singapura, Hongkong, Jepang, dan China (Anonymous, 1986).

Produksi ikan kerapu di negara Asia Tenggara sebanyak 45.811 ton tahun 1985, 52.065 ton tahun 1986, dan 54.423 ton pada tahun 1987 (Kohno *et al.*, 1990). Permintaan ikan kerapu pada pasar domestik maupun ekspor makin meningkat tetapi belum dapat diimbangi dengan hasil tangkapan. Untuk mengantisipasi permintaan tersebut perlu dilakukan

usaha budi dayanya. Usaha ini akan berkembang apabila didukung ketersediaan benih dalam jumlah yang cukup dan bermutu (Murtiningsih *et al.*, 1995).

Untuk menyediakan benih yang memiliki ukuran seragam, kualitas terjamin, dan berkesinambungan, maka benih ikan seharusnya diproduksi secara massal dalam hatcheri (Aslianti *et al.*, 1998). Kematian benih yang sering terjadi di hatcheri disebabkan oleh beberapa faktor yaitu salah satu di antaranya karena infeksi penyakit dan stres (Anonymous, 2001). Dijelaskan pula bahwa dampak infeksi penyakit dapat menyebabkan pengaruh negatif antara lain tumbuh lambat, FCR tinggi, warna benih berubah, dan perlu waktu pemeliharaan lebih lama. Salah satu penyakit yang sering menimbulkan kematian massal pada ikan kerapu adalah penyakit yang disebabkan oleh virus *Viral Nervous Necrosis* (VNN) yang memiliki gejala warna benih gelap, berenang berputar, atau berenang lemah di permukaan dan di dasar. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui serangan infeksi virus-VNN pada pemeliharaan benih ikan kerapu macan yang memiliki pertumbuhan berbeda.

BAHAN DAN METODE

Sampel

Sampel ikan kerapu macan diambil dari panti benih (*hatchery*) dan diseleksi sesuai dengan perlakuan. Dari satu bak pemeliharaan benih diambil sebanyak 20 ekor yang masing-masing mewakili perbedaan ukuran yaitu benih yang berukuran besar, sedang, dan kecil. Untuk deteksi VNN diambil benih ikan secara acak masing-masing sebanyak 5 ekor, yang kemudian dimatikan dalam es curah dan diukur panjang serta bobot badan. Setiap benih ikan dipotong, dan bagian kepalanya dan disimpan dalam *freezer* -84°C untuk selanjutnya dianalisis.

Analisis dari bagian kepala ikan ini dilakukan dengan cara membiarkannya dalam suhu ruangan agar mencair dari beku es, dengan menempatkannya pada "petridish". Selanjutnya organ mata dan otak diambil dengan menggunakan pinset dan gunting steril. Bagian mata dicongkel, sedangkan bagian otak ikan diambil dengan cara menggunting kepala hingga terbelah. Otak selanjutnya ditempatkan pada bagian lain dari "petridish" tersebut untuk dianalisis.

Ekstraksi Genom RNA dari VNN

Ekstraksi RNA dari VNN dilakukan sesuai dengan prosedur Yuasa *et al.* (2001). Langkah awal adalah memberi label pada *ependorf tube* volume 1.500 mL sesuai dengan sampel yang akan dianalisis. Organ mata dan otak dihancurkan terlebih dahulu dengan

cara digunting, kemudian dimasukkan ke dalam *ependorf tube* dengan menggunakan pinset serta ditambah larutan *Isogen* sebanyak 800 mL.

Campuran tersebut dikocok-kocok dengan kuat beberapa saat (± 1 menit), kemudian dидiamkan dalam suhu kamar selama 5 menit, dan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit dalam kondisi suhu 4°C . Supernatan dipindahkan ke dalam *ependorf tube* baru dan dидiamkan selama 2--5 menit, kemudian ditambah 200 mL kloroform dan dидiamkan selama 3 menit. Selanjutnya disentrifuse dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit, pada suhu 4°C sehingga terbentuk 3 lapisan. Lapisan bagian atas merupakan RNA, dipindahkan dengan menggunakan mikro pipet ke dalam *ependorf tube* baru kemudian ditambah 500 mL isopropanol, dan dидiamkan pada suhu kamar selama 5 menit.

Larutan tersebut disentrifuse lagi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C , kemudian supernatan langsung dibuang (tanpa pipet) dan dihasilkan pelet RNA yaitu endapan yang paling bawah. Pelet tersebut ditambah ethanol 75% sebanyak 1.000 mL dan dicampur dengan baik, kemudian disentrifuse dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit dalam 4°C . Supernatan dibuang dan ditiriskan dengan kertas saring serta dikeringkan dalam desikator selama 15 menit.

Pelet RNA yang dihasilkan kemudian dilarutkan dengan 50--100 mL *double distilled water* (DDW) dan disimpan pada suhu 4°C sampai pengamatan berikutnya.

Amplifikasi Genom RNA dari VNN

Untuk melakukan amplifikasi RNA, disiapkan dahulu beberapa larutan pereaksi PCR yang terdiri atas MMS (*master mix solution*) 23,5 mL; dua primer (F2 dan R3) masing-masing 0,25 mL; *reverse transcriptase* 0,25 mL, RNase inhibitor 0,125 mL; dan *Tag polymerase* 0,125 mL; yang kemudian ditempatkan dalam satu *ependorf tube* volume 500 mL. Dosis pereaksi PCR mengacu pada Yuasa *et al.* (2001). Primer yang digunakan adalah F2 (P6) memiliki jumlah nukleotida dengan urutan: 5'-CGT GTC AGT CAT GTG TCG CT-3' dan Primer R3 (P5): 5'-CGAGTC AAC ACG GGT GAA GA-3'.

Larutan pereaksi PCR sebanyak 24,5 mL ditempatkan dalam *ependorf tube* volume 500 mL dan ditambahkan genom RNA hasil ekstraksi sebanyak 0,5 mL; kemudian di-*flashing*, selanjutnya dimasukkan dalam PCR Thermal Cycler MP. Program *thermal cycler* untuk amplifikasi RNA mengikuti prosedur Yuasa *et al.* (2001) yang tersaji pada Tabel 1.

Tabel 1. Program *thermal cycler* untuk amplifikasi RNA
 Table 1. *Thermal Cycler program for RNA amplification*

Reaksi <i>Reaction</i>	Siklus <i>Cyclus</i>	Suhu <i>Temperature</i>	Lama reaksi <i>Duration</i>
<i>Reverse transcriptase</i>	1 kali	48°C	45 menit (<i>minute</i>)
		49°C	2 menit (<i>minute</i>)
PCR	25 kali	95°C	40 detik (<i>second</i>) (denaturasi)
		55°C	40 detik (<i>second</i>) (annealing)
		72°C	40 detik (<i>second</i>) (ekstensi)
	1 kali	72°C	5 menit (<i>minute</i>) (ekstensi akhir)
<i>Preservation</i>		4°C	-

Elektroforesis

Dalam pelaksanaan elektroforesis, terlebih dahulu dibuat 1,5% agarose gel dalam 1 x TBE *buffer* dicairkan dalam *microwave*, kemudian dituang dalam *plate* yang diberi sisir dan ditunggu sampai beku. Gel agarose dimasukkan ke dalam tanki elektroforesis, kemudian dituang 1 x TBE *buffer* sampai terendam seluruh permukaan gel agarose. Loading dye 6 x sebanyak 2 mL dicampur dengan cDNA produk amplifikasi sebanyak 10 mL di atas parafilm kemudian dimasukkan ke dalam sumuran gel agarose dengan menggunakan *micropipet*. Elektroforesis berlangsung selama ± 22 menit. Untuk pewarnaan digunakan larutan ethidium bromide dan gel agarose direndam dalam larutan tersebut selama 10 menit, kemudian visualisasi dari pita cDNA digunakan ultraviolet transilluminator dan didokumentasikan dengan gel kamera (photo polaroid).

HASIL DAN BAHASAN

Selama pemeliharaan 45--60 hari di hatcheri, benih ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) memiliki tingkat pertumbuhan yang tidak seragam dan memperlihatkan perbedaan ukuran panjang total dan bobot badan seperti pada Tabel 2.

Dari sampel yang diperoleh seperti tercantum dalam Tabel 2, kemudian dilakukan deteksi VNN dengan metode PCR. Benih ikan ukuran besar dan sedang tidak memperlihatkan gambaran pita yang teramplifikasi, akan tetapi ada bayangan pita tipis pada sampel ikan yang berukuran kecil (kerdil) (Lot 2). Pita yang muncul dari proses amplifikasi fragmen cDNA VNN membuktikan bahwa primer yang digunakan dapat mengapit *target region* secara sempurna pada asam nukleat VNN yang menginfeksi benih ikan ukuran kecil (kerdil). Pita yang muncul tersebut memiliki ukuran fragmen cDNA yang sama

Tabel 2. Data perbedaan ukuran benih ikan kerapu macan umur 45--60 hari
 Table 2. *Data of different sizes of brown marbled grouper 45--60 days old*

Lot: 1 60 hari (<i>days</i>)				Lot : 2 45 hari (<i>days</i>)			
Ukuran benih <i>Fry size</i>	Jumlah sampel <i>No. of samples</i>	TL (mm) <i>SD</i>	BW (g) <i>SD</i>	Ukuran benih <i>Fry size</i>	Jumlah sampel <i>No. of samples</i>	TL (mm) <i>SD</i>	BW (g) <i>SD</i>
Besar <i>Large</i>	5 ind.	63.28 (±1.14)	4.76 (±0.57)	Besar <i>Large</i>	5 ind.	31.98 (±1.24)	0.58 (±0.08)
Sedang <i>Medium</i>	5 ind.	50.74 (±1.61)	2.48 (±0.29)	Sedang <i>Medium</i>	5 ind.	25.5 (±0.95)	0.34 (±0.05)
Kecil <i>Small</i>	5 ind.	37.96 (±1.37)	0.96 (±0.05)	Kecil <i>Small</i>	5 ind.	17.82 (±1.24)	0.08 (±0.01)

Keterangan (*Note*):

TL : panjang total (*total length*)

BW : bobot badan (*body weight*)

SD : standar deviasi (*standard deviation*)

dengan ukuran pita dari kontrol positif (426 bp). Hal ini membuktikan bahwa ikan yang mengalami kelambatan pertumbuhan atau tumbuh sangat kerdil, dapat diindikasikan terinfeksi virus VNN. Hal ini karena benih ikan yang terserang VNN akan terganggu sistem sarafnya sehingga akan mengakibatkan kondisi tidak stabil dalam pola hidup yang akan mempengaruhi pola makan sehingga pertumbuhannya terlambat.

Hasil deteksi virus VNN yang menginfeksi benih ikan kerapu macan tersaji pada Gambar 1.

Gambar 1 menunjukkan bahwa sampel benih ikan pada Lot 1 (sampel nomor 1, 2, dan 3) tidak menampilkan gambaran pita, begitu juga pada Lot 2 (sampel nomor 4 dan 5), sementara sampel nomor 6 memberikan gambaran pita agak samar, memiliki ukuran panjang fragmen DNA sebesar 426 bp yang sejajar dengan pola pita dari kontrol positif VNN.

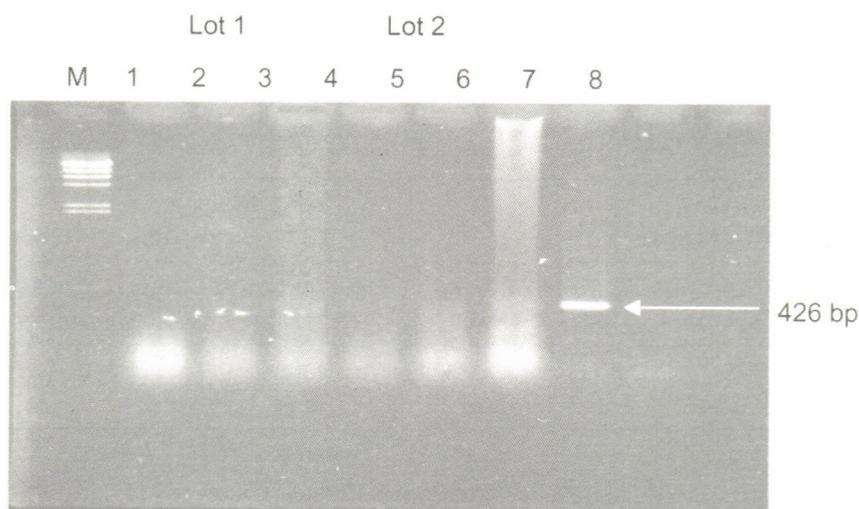
Dengan munculnya pita hasil elektroforesis dari sampel ikan kerapu macan yang dianalisis (sampel no. 6 pada Gambar 1), dapat dipastikan bahwa benih ikan tersebut terserang VNN karena pita yang muncul tersebut memiliki ukuran fragmen cDNA yang sama dengan ukuran pita dari kontrol positif VNN. Anonymous (2001) melaporkan bahwa salah satu gejala penyakit ikan dapat diketahui dengan adanya perubahan fisik luar seperti hilang nafsu makan, berenang tidak normal, dan tumbuh lambat. Dijelaskan pula bahwa penyakit yang umum menyerang ikan kerapu adalah VNN dan iridovirus. Di Bali, kasus kematian massal yang terjadi pada ikan kerapu bebek

yang disebabkan oleh serangan VNN mencapai 100% pada stadia larva, tetapi tidak terjadi pada stadia yuwana (Koesharyani *et al.*, 2001a).

Dilaporkan pula oleh Koesharyani *et al.* (2001b) bahwa virus VNN menyebabkan kematian sebesar 70% pada yuwana kerapu bebek, sedangkan pada yuwana kerapu lumpur hanya mencapai 10%. Sementara pada kerapu batik dan kerapu macan tidak menyebabkan kematian. Hal ini karena pada ikan kerapu bebek memiliki tingkah laku yang sering bergerak/lebih agresif, sehingga energi yang dibutuhkan lebih banyak, sehingga akibatnya daya tahan tubuh lebih rendah dan sensitif terhadap penyakit. Ikan kerapu macan berpenampilan lebih tenang dibandingkan kerapu bebek, sehingga dimungkinkan ikan tersebut dapat menghemat energi dan lebih tahan terhadap serangan penyakit.

Hasil amplifikasi RT-PCR dari RNA benih ikan kerapu macan yang mengalami kelambatan pertumbuhan juga menunjukkan gambaran pita cDNA yang sama dengan kontrol positif VNN. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Aslianti (2001) bahwa jaringan otak atau mata dari sampel benih ikan yang teramplifikasi dan memberikan gambaran pita pada proses elektroforesis dinyatakan positif terinfeksi VNN.

Dampak serangan dari VNN (*viral nervous necrosis*) pada benih ikan kerapu bebek dapat mengakibatkan kematian total, dan infeksi virus ini dapat menyerang sistem saraf pusat yang secara



Gambar 1. Pola pita DNA hasil deteksi virus VNN pada benih ikan kerapu macan. (M: Marker; 1&4: Benih ukuran besar; 2&5: benih ukuran sedang; 3&6: benih ukuran kecil; 7: kontrol positif; 8: kontrol negatif)

Figure 1. DNA band pattern of VNN virus detection of brown marbled grouper. (M: Marker; 1 & 4: large size of seed; 2 & 5: medium size of seed; 3 & 6: small size of seed; 7: band of positive control; and 8: negative control)

histologi menunjukkan kerusakan (*necrosis*) pada jaringan saraf (Mori *et al.*, 1992 dalam Aslianti, 2001; Anonim, 2001). Pada benih ikan kerapu macan, serangan VNN dengan tingkat yang masih rendah, diduga masih mungkin untuk dapat hidup, karena dari pengamatan di beberapa hatcheri ikan kerapu macan, sekitar 15%--20% yang mengalami kelambatan tumbuh (kerdil) dan sebanyak 10% dari jumlah ikan tersebut menunjukkan adanya infeksi VNN dengan munculnya pola pita DNA seperti pada Gambar 1.

Penularan virus yang mengakibatkan penyakit VNN ini umumnya terjadi dengan 2 pola, yaitu pola penularan secara vertikal melalui sperma atau telur dan penularan secara horizontal melalui media air, pakan, dan binatang lain dalam lingkungannya (Anonim, 2001). Aslianti (2001) juga melaporkan bahwa penularan VNN dapat terjadi secara horizontal melalui media air dan pakan, di mana penularan melalui media air lebih cepat dibanding melalui pakan. Dijelaskan pula VNN menginfeksi jaringan otak lebih awal daripada jaringan mata.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Benih ikan kerapu macan yang berukuran besar dan ukuran sedang tidak menunjukkan serangan VNN, sedangkan benih yang berukuran kecil (pertumbuhannya lambat) mengalami serangan VNN walaupun masih bisa bertahan hidup.
2. Deteksi VNN dengan menggunakan metode PCR dapat mengetahui terjadinya serangan VNN terhadap benih ikan kerapu macan pada pemeliharaan 45--60 hari.

Saran

Untuk menghindari serangan VNN, diusahakan sumber telur dari induk yang bebas VNN, tata laksana air dan pakan yang baik dan dilakukan *grading* lebih awal pada benih ikan kerapu macan, sehingga benih cepat diketahui bila ada serangan virus VNN. Perlu dilakukan deteksi VNN pada benih ikan kerapu macan, terutama yang memiliki ukuran kecil secara rutin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ini disampaikan kepada Ibu Sri Suratmi yang telah banyak membantu dalam

melakukan deteksi virus VNN pada benih ikan kerapu macan, sehingga laporan ini dapat diselesaikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous. 1986. *Manual on Floating Net Cage Fish Farming in Singapore Coastal Water Fisheries Handbook*. Prim. Pro. Dep. Ministry of Nat. Dev. Singapore, 1:17 pp.
- Anonymous. 1998. *Pembenihan Kerapu Macan *Epinephelus fuscoguttatus**. Balai Budidaya Lampung. Ditjen Perikanan. Deptan. 85 pp.
- Anonim. 2001. *Pembudidayaan dan Manajemen Kesehatan Ikan Kerapu*. Asia-Pacific Economic Cooperation. Aquaculture Department Southeast Asia Fisheries Development Center Tigbauan, Iloilo, Philippines. 94 pp.
- Aslianti, T., S. Ismi, K.M. Setiawati, J.H. Hutapea, dan Wardoyo. 1998. Penelitian pemeliharaan larva kerapu tikus, *Cromileptes altivelis* dengan pengelolaan pakan dan lingkungan. *Prosiding Simposium V Perhimpunan Ilmu Pemuliaan Indonesia (PERIPI)*. p. 71--79.
- Aslianti. 2001. *Studi Penularan Viral Nervous Necrosis (VNN) secara Horizontal pada Juvenil Kerapu Tikus, *Cromileptes altivelis**. Tesis Program Studi Bioteknologi Pertanian. Program Pascasarjana Universitas Udayana. Denpasar. 46 pp.
- Kohnno, H., M. Duray, and P. Sunyoto. 1990. *A Field Guide to Grouper of South East Asia*. Centre Research Institute of Fisheries, JICA. 27 pp.
- Koesharyani, I., D. Rosa, K. Mahardika, F. Johnny, Zafran, and Yuasa K. 2001a. *Manual for Fish Disease Diagnosis Marine Fish and Crustaceae Disease in Indonesia*. Gondol Research Institute for Mariculture and JICA. 49 pp.
- Koesharyani I., K. Mahardika, dan Tridjoko. 2001b. Patogenisitas VNN yang diisolasi dari ikan kerapu bebek *C. altivelis* terhadap ikan budidaya lain. *Laporan Penyelesaian DIP 2001*. Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol, Bali. p. 105--114.
- Murtiningsih, S., Mustahal, dan Basyarie. 1995. Pengaruh penambahan serbuk ulva pada pakan buatan terhadap kelangsungan hidup dan pertumbuhan ikan kerapu *Epinephelus* spp. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Sub Balitdita Bojonegoro Serang*. p. 147--151.
- Yuasa, K., I. Koesharyani, D. Rosa, K. Mahardika, F. Johnny, and Zafran. 2001. *Manual for PCR Procedure, Rapid Diagnosis on Viral Nervous Necrosis (VNN) in Groupers*. Multi-Species Hatchery Project (ATA-379), Gondol Research Institute for Mariculture and Japan International Cooperation Agency. 35 pp.

