

## OPTIMASI PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) UNTUK DETEKSI ENDOPARASIT YANG MENYERANG TELUR DAN LARVA IKAN TUNA SIRIP KUNING (*Thunnus albacares*)

Gusti Ngurah Permana, Jhon Harianto Hutapea, dan Haryanti

Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut

Jl. Br. Gondol, Kec. Gerokgak, Kab. Buleleng, Kotak Pos 140, Singaraja-Bali 81101

E-mail: *gustipermana@gmail.com*

(Naskah diterima: 3 Maret 2009; Disetujui publikasi: 15 Januari 2010)

### ABSTRAK

Endoparasit merupakan parasit yang menginfeksi dan terdapat di dalam tubuh inang, endoparasit ini telah menginfeksi telur dan larva ikan tuna sirip kuning. Tujuan dari penelitian adalah untuk mengetahui metode deteksi dan infeksi dari endoparasit ini secara molekuler dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Telur dan larva yang terinfeksi dikumpulkan dari bak pemeliharaan untuk dianalisis. Sampel diekstraksi dengan menggunakan metode lisis bufer dan trizol. Hasil analisis menunjukkan lisis bufer memberikan pola pita yang lebih jelas dan bersih. Primer P2: 1322f (2F) CCGGAACCTTAGAGTATCGG; 1680r (2R) TCGGTTTCAG ACTGA ACCAAG menghasilkan pola pita yang konsisten dan jelas dengan panjang fragmen 350 bp. Hal ini mengindikasikan bahwa endoparasit (*Ichthyodinium chambelardi*) menyerang telur ikan tuna di dalam bak terkontrol dan infeksi terjadi adalah secara horisontal yang berasal dari air media pemeliharaan.

**KATA KUNCI:** endoparasit, deteksi, Polymerase Chain Reaction, tuna sirip kuning

**ABSTRACT:** *Optimization of PCR (Polymerase Chain Reaction) method for detection of endoparasit in the egg and larvae of yellowfin tuna (Thunnus albacares). By: Gusti Ngurah Permana, Jhon Harianto Hutapea, and Haryanti*

*Endoparasite is a parasite that lives within the body of its host and it has been discovered infecting egg and larvae of yellowfin tuna in captivity. The aims of this experiment was to detect endoparasite in the egg and larvae of yellowfin tuna using PCR (Polymerase Chain Reaction) method. Infected eggs and larvae were taken from broodstock tank and extracted using lysis buffer and trizol method. The result showed that bands of sample extracted using lysis buffer method produced more sharp and clear band pattern compared to trizol method. Primer P2: 1322f (2F) CCGGAACCTTAGAGTATCGG; 1680r (2R) TCGGTTTCAGACTGAACCAAG showed consistent band with fragment size of 350 bp. This experiment indicated that identical endoparasite (*Ichthyodinium chambelardi*) were found in egg and larvae of yellowfin tuna in captivity and the infection was suspected to come horizontally from rearing water.*

**KEYWORDS:** *endoparasite, detection, Polymerase Chain Reaction, yellowfin tuna*

## PENDAHULUAN

Perbenihan ikan tuna sirip kuning dalam bak terkontrol telah dirintis mulai tahun 2002 oleh Badan Riset Kelautan dan Perikanan yang dilaksanakan di Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut (BBRPBL), Gondol-Bali yang bekerja sama dengan *Overseas Fishery Cooperation Foundation* (OFCF) Jepang. Ikan tuna yang dipelihara di dalam bak terkontrol dengan menggunakan induk yang ditangkap dari perairan Bali Utara telah berhasil memijah. Pemijahan pertama terjadi pada tanggal 25 Oktober 2004 selama 9 hari dan berhenti, kemudian bertelur kembali mulai tanggal 15 Agustus 2005 hampir setiap hari. Tingkat keberhasilan perbenihan ikan tuna ini masih sangat rendah, salah satu kendala yang dihadapi adalah infeksi endoparasit pada telur dan larva yang pertama kali diketahui terjadi pada tanggal 20 Oktober 2005. Beberapa peneliti melaporkan bahwa adanya endoparasit yang menyerang telur ikan antara lain pada ikan sardine (Holande, 1952; Collate *et al.*, 1983; Ishimaru, 2005). Kasus yang sama juga ditemukan pada ikan tuna sirip biru (*Thunnus thynnus orientalis*) yang menginfeksi telur ikan tuna di Kinki University Jepang, larva ikan cod (*Gadus morhua*) dan ikan turbot (*Scophthalmus maximus*) (Pedersen *et al.*, 1994). Endoparasit yang menyerang teridentifikasi dari jenis *Icthyodinium chambelardi*. Lebih lanjut Ishimaru (2004), menyatakan bahwa endoparasit tersebut menyerang telur ikan tuna sirip biru (*Thunnus thynnus orientalis*) dan telah dilakukan identifikasi secara molekuler dengan target gen adalah 18S-rDNA dan teridentifikasi yaitu jenis *Icthyodinium chambelardi*.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi endoparasit yang menyerang telur ikan tuna sirip kuning, *T. albacares* dengan menggunakan positif kontrol dari endoparasit tersebut dengan deteksi molekuler genetik menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) serta mengetahui pola infeksi dari endoparasit tersebut pada bak terkontrol.

## BAHAN DAN METODE

### Pengambilan Sampel

Tahap pertama adalah mengumpulkan sampel telur dan larva ikan tuna sirip kuning yang sehat dan terinfeksi endoparasit yang

diamati dengan menggunakan mikroskop. Perkembangan embrio pada saat pengambilan sampel adalah 32 sel dan larva pada hari ke-0 (d-0). Jumlah sampel telur dan larva yang dipergunakan untuk analisis masing-masing 50 ekor. Sampel telur diawetkan dengan menggunakan ethanol 95% sedangkan sperma dan gonad diambil dari tiga induk yang mati di bak pemeliharaan induk dan disimpan pada suhu -20°C sebelum dianalisis.

Pada tahap kedua dilakukan amplifikasi pada gonad (sel telur dan sperma) induk, pakan induk yaitu ikan layang (*Decapterus macarellus*) dan air media pemeliharaan serta sumber air laut dari filter pasir (*sand filter*) yang disaring sebanyak 200 L dengan menggunakan saringan 20 µ untuk mengetahui sumber dari endoparasit ini. Sampel pakan ikan tuna yaitu ikan layang yang digunakan adalah isi perutnya. Tujuan dari analisis ini adalah untuk mengetahui sumber infeksi dari endoparasit ini, secara vertikal dari induk atau secara horisontal dari air.

### Ekstraksi Genom DNA Endoparasit

Proses ekstraksi genom DNA merupakan langkah yang sangat penting untuk menentukan hasil analisis. Ekstraksi DNA mengikuti metode Yuasa *et al.* (2006), menggunakan 2 metode yaitu metode trizol (*Invitrogen-chloroform*) dan lisis bufer (*Invitrogen*).

### Metode Ekstraksi dengan Trizol

Sampel telur dan larva yang terinfeksi endoparasit dicuci terlebih dahulu dengan *double distilled water* (ddH<sub>2</sub>O) untuk menghilangkan ethanolnya. Tambahkan 200 µL trizol dan gerus/hancurkan dengan *pellet paste* kemudian tambahkan lagi 700 µL trizol untuk mencuci pinggiran tube, kocok dan vortex, kemudian diamkan 5 menit dalam suhu ruang. Tambahkan 200 µL phenol-chloroform, kocok dengan tangan dan biarkan selama 5 menit. Sentrifugasi 13.000 rpm selama 10 menit lapisan atas (*supernatan*) dibuang dapatkan pelet kemudian tambahkan 500 µL isopropanol dan vortex. Simpan dalam suhu ruang selama 5 menit dan sentrifugasi 15.000 rpm selama 5 menit. Tambahkan 600 µL ethanol 70%, sentrifugasi 15.000 rpm selama 5 menit kemudian supernatan dibuang, ambil peletnya dan dikering anginkan. Tambahkan 50 µL dd H<sub>2</sub>O dikocok dengan tangan secara

hati-hati dan inkubasi pada suhu 37°C selama 1-24 jam, genom siap digunakan untuk amplifikasi.

#### Metode Ekstraksi dengan Lysis Buffer

Sampel dicuci dari larutan preservasi (ethanol 90%) dengan menggunakan ddH<sub>2</sub>O. Tambahkan 600 µL Lysis buffer dan digerus kemudian tambahkan Proteinase K: 10 µL. Inkubasi dalam *thermoblock* pada suhu 65°C selama 30 menit. Setelah itu kocok dengan tangan dan diamkan 5 menit dalam suhu ruang, tambahkan 200 µL 3M CH<sub>3</sub>COONa pH-8 dan kocok dengan tangan. Sentrifugasi 15.000 rpm selama 5 menit kemudian supernatan (lapisan atas) diambil (±) 600 µL dan tambahkan 600 µL Isopropanol. Sentrifugasi 15.000 rpm selama 5 menit, buang supernatan, dan ambil peletnya kemudian tambahkan ethanol 70%: 600 µL kocok sampai terlarut. Sentrifugasi 15.000 rpm selama 2 menit, supernatan dibuang dan ambil peletnya kemudian diangin-anginkan. Tambahkan 50 µL dd H<sub>2</sub>O dan kocok dengan tangan perlahan dan genom DNA siap digunakan untuk amplifikasi.

#### Amplifikasi Genome DNA dari Endoparasit

Genom diamplifikasi menggunakan enzim polymerase dari Takara dan Qiagen taq DNA polymerase dengan menggunakan 2 set primer target yaitu P1 (1F x 1R) dan P2 (2F dan 2R). Spesifik primer ini didesain untuk mengidentifikasi *Icthyodinium chambelardi* dari endoparasit pada ikan kerapu sunu (*coral trout*) Yuasa *et al.* (2006). Sequen primer yang dipergunakan adalah sebagai berikut: P1: 96f (1F) ACTTGGCGGTTATTCTCTAC; 629 r (1R) GGACCAGCTA TTTTCAGCAA dan P2: 1322f (2F)

CCGGAACCTTAGAGTATCCG; 1680r (2R)= TCGGTTTCAGACTGA ACCAAG. Amplifikasi dilakukan menggunakan beberapa larutan pereaksi dengan total volume 25 µL yang terdiri atas: *double distilled* H<sub>2</sub>O:18.875 µL, 25 mM dNTP: 2 µL, buffer: 2,5 µL; taq DNA polymerase: 0,125 µL; primer 1 (*forward*): 0,25 µL; primer 2 (*reverse*): 0,25 µL; template DNA: 1 µL. Thermal cycler untuk amplifikasi DNA terlihat pada Tabel 1.

Hasil PCR dielektroforesis menggunakan 1.5% agarose gel (*L.E. analytical grade*) dalam 1 x TAE buffer selama 30 menit. Sebagai molekuler marker digunakan DNA ladder 100 bp. Pewarnaan menggunakan *ethidium bromide* dan visualisasi dari cDNA menggunakan ultraviolet transilluminator kemudian didokumentasikan menggunakan gel kamera.

### HASIL DAN BAHASAN

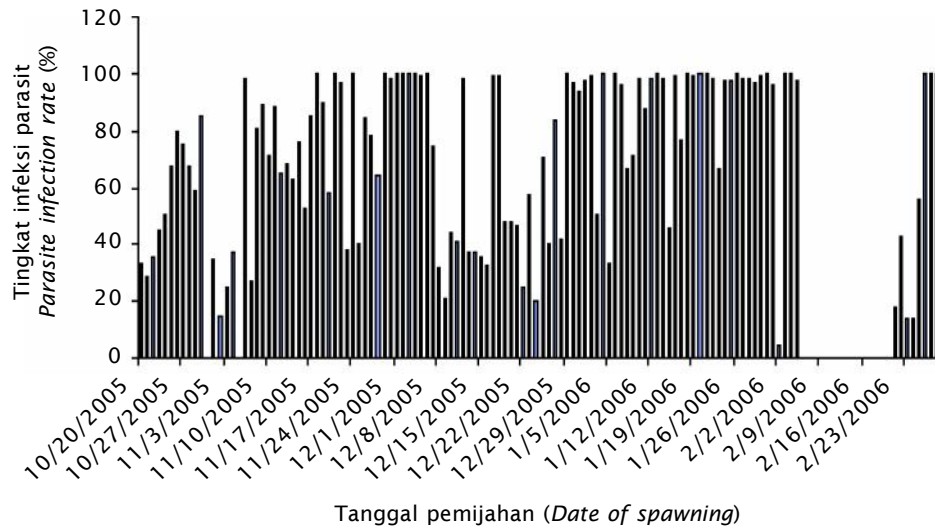
#### Infeksi Endoparasit

*Yolk opaque syndrome* merupakan suatu kejadian di mana endoparasit menginfeksi telur dan berkembang di dalamnya sehingga telur atau larva yang baru menetas menunjukkan warna keruh/buram (Pedersen, 1993). Infeksi parasit ini pertama kali diketahui di BBRPBL, Gondol-Bali terjadi pada tanggal 20 Oktober 2005. Persentase telur yang terinfeksi mencapai 100% yang artinya keseluruhan dari total telur semuanya terinfeksi. Selengkapnya terlihat pada Gambar 1.

Telur yang terinfeksi dapat menetas menjadi larva namun 1 hari setelah menetas larva akan mati. Embrio dan larva yang terinfeksi oleh parasit dapat dilihat pada Gambar 2.

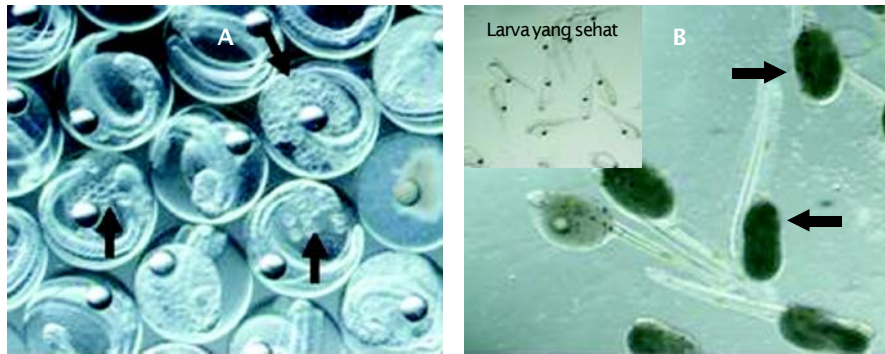
Tabel 1. Program thermal cycler amplifikasi PCR DNA endoparasit  
Table 1. Thermal cycler program for PCR amplification of endoparasit

Reaksi <i>Reaction</i>	Siklus <i>Cycle</i>	Suhu (°C) <i>Temperature</i>	Lama reaksi <i>Duration</i>
<i>Initial denaturation</i>	1	94	5 menit ( <i>minutes</i> )
<i>Denaturation</i>		94	30 detik ( <i>second</i> )
<i>Annealing</i>	35	58	30 detik ( <i>second</i> )
<i>Extention</i>		72	30 detik ( <i>second</i> )
<i>Final extention</i>	1	72	5 menit ( <i>minutes</i> )
<i>Preservation</i>		4	-



Gambar 1. Persentase telur ikan tuna sirip kuning, *T. albacares* yang terinfeksi endoparasit pada fase embrio

Figure 1. Percentages of infected egg of yellowfin tuna, *T. albacares* on embryo stage



Telur yang terinfeksi sebelum menetas

Larva terinfeksi hari ke-0

Gambar 2. Infeksi endoparasit (A) pada telur dan (B) larva d-0

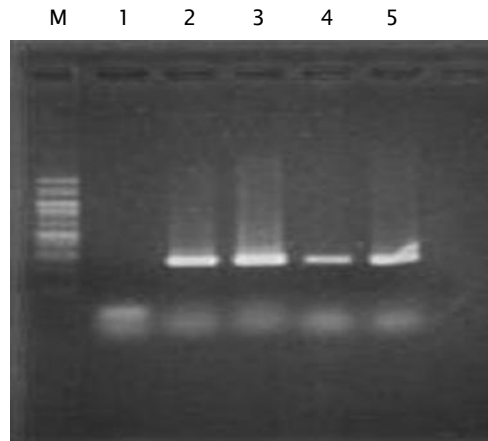
Figure 2. Endoparasite infection (A) on egg and (B) larvae

### Deteksi Endoparasit dengan PCR

Hasil deteksi endoparasit yang menginfeksi telur dan larva ikan tuna sirip kuning dengan menggunakan 2 metode ekstraksi tersaji pada Gambar 3.

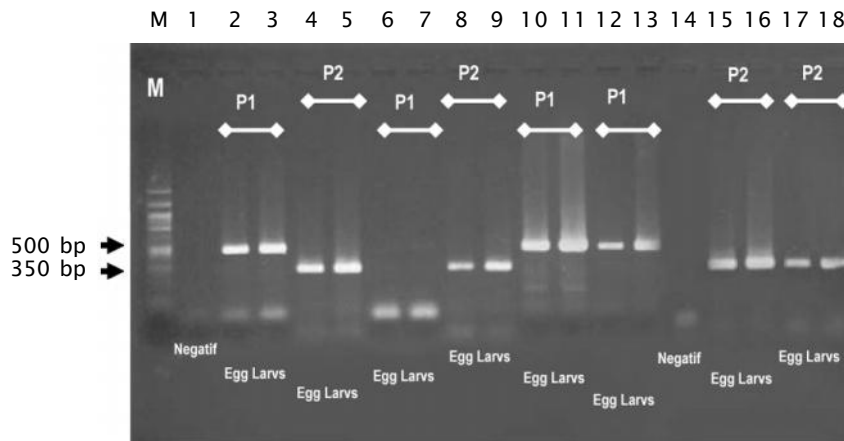
Metode ekstraksi menggunakan lisis buffer memberikan resolusi pita yang lebih jelas dibandingkan dengan metode trizol. Pada metode ini penambahan *Proteinase K* yang berfungsi untuk memecah protein mempunyai peranan yang cukup penting.

Amplifikasi dengan menggunakan 2 set primer yaitu primer set P1 dan P2 dapat dilihat pada (Gambar 4). Primer P2 yaitu (1322f x 1680r) menghasilkan pita yang konsisten dan lebih jelas dengan berat molekul 350 bp dan dapat mendeteksi endoparasit (*Ichthyodinium chambelardii*). Pola pita dari sampel telur dan larva yang digunakan untuk analisis menunjukkan hasil yang tidak terlalu berbeda artinya sampel untuk identifikasi endoparasit dapat menggunakan telur dan larva yang terinfeksi.



Gambar 3. Hasil amplifikasi PCR dari telur yang terinfeksi endoparasit dari telur dan larva ikan tuna sirip kuning (M = 100 bp DNA ladder; 1 = negatif kontrol; 2-3 = sampel yang diekstraksi dengan lysis buffer; 4-5 = sampel yang diekstraksi dengan trizol)

Figure 3. Result of PCR amplification from infected egg and larvae of yellow-fin tuna (M = 100 bp DNA ladder; 1 = negatif control; 2-3 = sample extracted by lysis buffer; 4-5 = sample extracted by trizol)



Gambar 4. Amplifikasi dengan PCR dari telur dan larva yang terinfeksi menggunakan 2 set primer (P1: primer 1 dan P2: primer2), M= marker 100 bp, nomor 1 & 14 = negatif kontrol

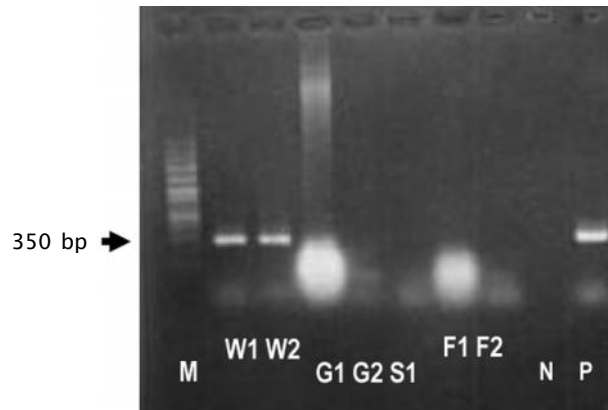
Figure 4. Amplification of infected egg and larva by PCR using 2 sets of primer (P1: primer 1 and P2: primer 2), M = marker 100 bp, lane 1 & 14 = negatif control

**Deteksi Endoparasit dari Gonad Induk, Pakan, dan Air Pemeliharaan**

Berdasarkan hasil PCR endoparasit ini tidak tampak pada gonad dan testis serta pada pakan dengan hasil negatif. Namun terdeteksi

pada air pemeliharaan. Hasil PCR selengkapnya terlihat pada Gambar 5.

Beberapa penelitian dan pendapat menyatakan bahwa cara infeksi endoparasit ini secara vertikal (Hutapea *et al.*, 2007;



Gambar 5. Hasil amplifikasi endoparasit dari air pemeliharaan (W1,W2), gonad induk (G1,G2), sperma induk (S1) dan pakan tuna/ikan layang (F1, F2), kontrol negatif (N), kontrol positif (P), dan marker 100 bp (M)

Figure 5. Electrophoresis of amplified products by PCR from rearing water (W1, W2), broodstock gonads (G1, G2), sperm (S1) and broodstock feed (F1, F2), negatif control (N), positif control (P), and marker 100bp (M)

Permana *et al.*, 2007). Diduga bahwa telur yang terinfeksi telah terjadi sewaktu masih di dalam gonad. Namun fakta yang didapatkan dari penelitian ini terlihat bahwa gonad induk ikan tuna dan pakan ikan yang digunakan negatif atau tidak terinfeksi, tetapi pada air pemeliharaan positif terdapat endoparasit (Gambar 5). Hal ini mengindikasikan bahwa infeksi dari endoparasit ini adalah horisontal atau melalui air pemeliharaan. Air media pemeliharaan yang dipergunakan sebagai sampel sebanyak 200 liter air yang disaring dengan saringan 20  $\mu$ , tetapi hasil analisisnya terlihat positif dengan penampakan pita sangat jelas, dapat diduga bahwa populasinya cukup tinggi dalam bak pemeliharaan induk. Deteksi lebih lanjut dilakukan untuk melihat adanya sebaran endoparasit ini pada air laut langsung (*fresh sea water*) dan setelah melalui penyaringan dengan filter pasir/*sand filter* (Gambar 6).

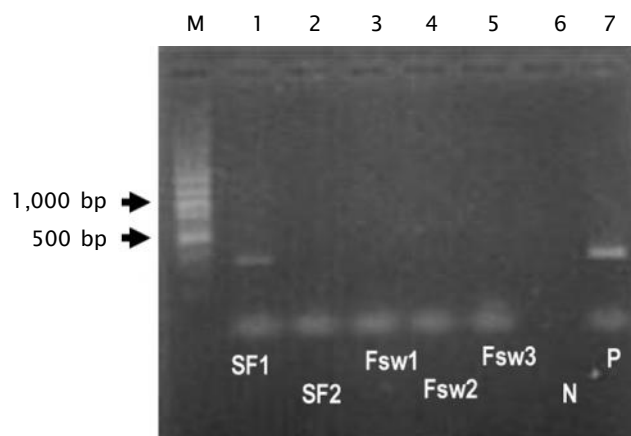
Dari Gambar 6 terlihat bahwa endoparasit ini sudah terdapat di perairan (air laut langsung) meskipun dengan jumlah yang sangat terbatas. Sedangkan pada media air pemeliharaan induk ikan tuna sirip kuning yang menggunakan sistem resirkulasi 50% melalui filter pasir (*sand filter*) dan 50% air laut langsung pada bak pemeliharaan induk masih dijumpai endoparasit dengan kepadatan cukup

tinggi. Penyaringan air dengan filter pasir belum mampu menghilangkan endoparasit tetapi hanya menurunkan populasinya. Dari fenomena tersebut jelas terjawab bahwa infeksi endoparasit ini secara horisontal artinya telur-telur yang dikeluarkan oleh induk ikan tuna pada saat *spawning* tidak terinfeksi akan tetapi setelah kontak dengan air endoparasit ini dapat menginfeksi. Salah satu fakta yang memperkuat argumen ini adalah hasil observasi jumlah rata-rata telur yang terinfeksi yang dipanen 3 jam setelah memijah/*spawning* (30%-80%) lebih rendah dibandingkan dengan 12 jam setelah *spawning* (100%).

#### KESIMPULAN DAN SARAN

Ekstraksi genom DNA dengan menggunakan metode lysis buffer dan primer set P2 (1322f x 1680r) memberikan hasil yang konsisten dan pita yang jelas untuk mendeteksi endoparasit *Ichthyodinium chambelardi*. Telur dan larva terinfeksi endoparasit secara horisontal atau dari air pemeliharaan.

Untuk menghindari infeksi yang tinggi dapat dilakukan pemanenan telur paling lambat 30 menit setelah *spawning* dan atau melakukan *treatment* air.



Gambar 6. Amplifikasi PCR endoparasit yang terdapat pada filter pasir dan air laut langsung (SF1 = sand filter 400L, SF2 = sand filter 200L, Fsw1 = fresh sea water 100 L, Fsw2 = fresh sea water 200L, Fsw3 = fresh sea water 300L, N = negatif kontrol, dan P = positif kontrol)

Figure 6. PCR amplification of endoparasite collected from sand filter and fresh sea water (SF1 = sand filter 400L, SF2 = sand filter 200L, Fsw1 = fresh sea water 100 L, Fsw2 = fresh sea water 200L, Fsw3 = fresh sea water 300L, N = negatif control, and P = positif control)

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Riset ini dapat terlaksana atas kerja sama BBRPBL-Gondol, Bali dengan OFCF-Japan. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Mr. Akio Nakazawa sebagai *chief expert* dan Mr. Kei Yuasa sebagai *shorterterm expert* patologi dari *Overseas Fishery Cooperation Foundation (OFCF)* Jepang dan seluruh staf teknisi bioteknologi BBRPBL-Gondol dan Teknisi tuna atas segala bantuan selama penelitian ini dilakukan.

#### DAFTAR ACUAN

Collate, B.B. & Nauen, C.E. 1983. *FAO Fish catalogue*. Vol. 2. *Scombrids of the world*. An annotated and illustrated catalogue of tunas, mackerels, bonitos and related species known to date. *FAO Fish Synop.*, (125) 2: 1-137.

Hollande, A. & Cachon, J. 1952. Un parasites des oeuf de sardine: *Ichtyodinium chabelardi* nov. gen. nov. sp. (*Peridinien parasite*). *C.R. Acad. Sci.*, 3(235): 976-977.

Hutapea, J.H. & Permana, G.N. 2007. Siklus Hidup Endoparasit, *Ichtyodinium chabelardi*, yang Menginfeksi Telur Ikan Laut. *Prosiding*

*Seminar Nasional Kelautan III Universitas Hang Tuah* Surabaya 24 April 2007, hlm. 68-72.

Ishimaru, K. 2004. *Yolk Opaque Symptom of fertilized egg and hatchout larvae of Bluefin tuna*. In *Japanes*, p. 43-45. *Ishimaru@cypress.ne.jp*. Diakses tanggal 15 Januari 2007.

Ishimaru, K. 2005. *The 21st-century COE program of Kinki University. The supportive-type research base of the fish culture industry of bluefin tuna and others. The cause of yolk nebula disease observed in the fertilized eggs and hatched fingerlings of bluefin tuna Kinki University. Center of Aquaculture Science and Technology for Bluefin Tuna and Other Cultivated Fish. 21st Century COE Program*, 2: 43-45.

Pedersen, B.H. 1993. *Embryos and yolk-sac larvae of turbot, Scopthalmus maximus are infested with an endoparasite from gastrulla stage onwards*. *Dis. Aquat. Org.*, 17: 57-59.

Pedersen, B.H., Buchmann, K., & Koie, M. 1994. *Baltic larval cod, Gadus morhua are infected with a protistan endoparasit in the yolk sac*. *Dis. Aquat. Org.*, 16: 29-33.

Permana, G.N., Hutapea, J.H., & Sugama, K. 2007. Yolk opaque syndrome pada telur ikan tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*). *Media akuakultur*, 2(1): 137-141.

Yuasa, K., Nakazawa, A., Hutapea, J.H., Permana, G.N., Haryanti, Zafran, Rosa, D., & Rafael,

F.J. 2006. A trial to establish control measures for the infection with protistan endoparasite causing 'yolk sac opaque syndrome of yellowfin tuna'. A Technical Report of OFCF Fish Disease Expert, 8 pp.