

DIAGNOSA “NESTED REVERSE TRANSCRIPTASE - PCR” UNTUK “VIRAL NERVOUS NECROSIS” PADA BENIH IKAN KERAPU BEBEK, *Cromileptes altivelis*

Isti Koesharyani¹⁾ dan Hesty Novita¹⁾

ABSTRAK

Budi daya kerapu utamanya kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) sudah berkembang sejak tahun 1998. Kendala utama dalam pembenihan adalah serangan penyakit yang disebabkan oleh *Viral Nervous Necrosis* (VNN), serangan virus intensitasnya sangat tinggi terutama pada ikan stadia larva yuwana. Metode diagnosa cepat dengan *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) menggunakan spesifik primer F-2 dan R-3 dengan target berat molekul (426 bp) sudah berkembang dan banyak diaplikasikan dalam mendiagnosa VNN. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan diagnosa dengan sensitivitas yang lebih tinggi dengan cara Nested RT-PCR menggunakan spesifik sub set primer NF-2 dan NR-3 dengan target berat molekul (294 bp). Sampel ikan yang digunakan adalah larva kerapu bebek berumur 33 hari yang positif terserang VNN. Selanjutnya sampel didiagnosa VNN dengan analisis RT-PCR dan Nested RT-PCR. Hasilnya, menunjukkan bahwa analisis dengan Nested RT-PCR mempunyai sensitivitas 1.000 x lebih tinggi dibandingkan dengan RT-PCR.

ABSTRACT: *Nested Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (Nested RT-PCR) of Viral Nervous Necrosis in humpback grouper, Cromileptes altivelis. By: Isti Koesharyani and Hesty Novita*

Since 1998, humpback grouper (*Cromileptes altivelis*) culture technique has been successfully developed. The main problem is high mortalities during larva-juvenile stages caused by disease of VNN. Detection of virus with Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) technique using specific primers has been developed and useful for detection VNN at the humpback grouper Mariculture. RT-PCR was performed by using specific primers R-3 and F-2 with molecule weight at 426 bp. The aim of this study is to develop VNN diagnostic tool with the highest sensitivity by Nested RT-PCR using other specific inner primers NR-3 and NF-2 with molecule weight 294 bp. Thirty three days old infected VNN humpback grouper, *Cromileptes altivelis* fish sample were used as a sample then analyzed of VNN using RT-PCR and Nested RT-PCR. The result, diagnosis of VNN by Nested RT-PCR showed high sensitivity (1,000 times) as compared with RT-PCR.

KEYWORDS: *humpback grouper, Cromileptes altivelis, Viral Nervous Necrosis, Nested RT-PCR*

PENDAHULUAN

Viral Nervous Necrosis (VNN) diketahui mengakibatkan kematian massal pada budi daya ikan laut yang disebabkan oleh virus Nodaviridae yang berbentuk icosahedral dengan diameter 20-30 nm. VNN mempunyai inang rentang yang

sangat luas yaitu dapat menginfeksi lebih dari 20 jenis ikan laut (Munday & Nakai, 1997). Ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) dapat terinfeksi pada stadia larva sampai yuwana (Koesharyani *et al.*, 1999; Koesharyani *et al.*, 2004; Zafran *et al.*, 2000).

¹⁾ Peneliti pada Pusat Riset Perikanan Budidaya, Jakarta

VNN pertama kali diketahui di Indonesia pada tahun 1997 menginfeksi ikan kakap putih, *Lates calcarifer* yang dibenihkan pada hatcheri di Jawa Timur (Zafran *et al.*, 1998). Pada stadia ini VNN telah menyebar pada sentra budi daya di Indonesia seperti di Sumatera Utara dan Selatan, Jawa, dan Bali.

Pada umumnya ikan yang terinfeksi VNN menunjukkan gejala tingkah laku berenang yang abnormal yaitu berputar-putar dan diam di dasar, karena virus ini menyerang sistem syaraf (Yuasa *et al.*, 2001; Koesharyani *et al.*, 2004). Dengan irisan histologi dapat terlihat secara rinci adanya vakuolasi pada jaringan otak dan retina mata yang mengakibatkan kerusakan pada jaringan saraf pusat dan membuat ikan menjadi hilang keseimbangan, berenang lemah atau tanpa arah serta diam di dasar air. Gejala kerusakan jaringan pada kerapu bebek ini ternyata sama dengan kerusakan yang terjadi pada kasus VNN pada ikan budi daya lainnya (Munday & Owen, 1998; Glazerbrook *et al.*, 1990; Munday *et al.*, 1992; Arimoto *et al.*, 1993; Zafran *et al.*, 1998; Zafran *et al.*, 2000; Bloch *et al.*, 1991; Boonyaratpalin *et al.*, 1996; Chua *et al.*, 1995; Koesharyani *et al.*, 2001; Koesharyani *et al.*, 2004). Sedangkan pengamatan dengan elektron mikroskop yang dilakukan pada kakap putih, yang terserang VNN di Indonesia dapat dilihat adanya partikel virus yang berdiameter 30 nm (Zafran *et al.*, 1998).

Tujuan percobaan diagnosa ini adalah untuk mendeteksi VNN dengan tingkat sensitivitas yang lebih tinggi menggunakan metode RT-PCR yang dilanjutkan dengan Nested RT-PCR. Metode tersebut diharapkan dapat mendeteksi jumlah virus yang belum begitu berkembang dalam tubuh ikan atau ikan yang bersifat carier yang tidak dapat terdeteksi dengan RT-PCR biasa. Diharapkan dengan metoda Nested RT-PCR gejala serangan VNN dapat terdeteksi. Untuk mengetahui sejauh mana tingkat sensitivitasnya maka dilakukan percobaan diagnosa dengan Nested RT-PCR. Metoda ini pernah diterapkan pada penelitian sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Thiery *et al.*, 1999).

BAHAN DAN METODE

Sampel Ikan Sakit

Sampel ikan yang digunakan adalah larva ikan kerapu bebek umur 33 hari berasal dari hatcheri di Lampung yang positif terinfeksi oleh

VNN. Ikan tersebut kemudian disimpan dalam larutan alkohol 70%, untuk pengujian RT-PCR dan Nested RT-PCR. Untuk menguji sensitivitas RT-PCR dan Nested PCR sample RNA dicerikan mulai dari 10^0 sampai dengan 10^{-10} .

Ekstraksi RNA

Ekstraksi RNA menggunakan Trizol, sampel ikan (larva) sebanyak 25-75 mg dilisis dengan 1 mL Trizol kemudian diinkubasikan pada suhu 25°C selama 5 menit selanjutnya disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 25°C. Supernatannya diambil dan ditambahkan dengan 200 mL kloroform, diinkubasikan pada suhu 25°C selama 10 menit, kemudian disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 25°C. Lapisan atas (RNA) diambil dan ditambahkan dengan 670 mL isopropanol, diinkubasikan pada suhu 25°C selama 10 menit serta disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 25°C. Supernatannya dibuang, endapan yang ada kemudian dicuci dengan 500 mL alkohol 70% serta disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 25°C. Selanjutnya supernatannya dibuang dan dikering anginkan. Larutan endapan RNA tersebut dengan 150 mL TE (Tris-EDTA) untuk 50 mg jaringan.

Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Deteksi VNN dengan metode RT-PCR untuk mengaplifikasi atau penggandaan c-DNA VNN dari RNA menggunakan spesifik primer yaitu R3: 5'-CgA gTC AAC ACg ggT gAA gA-3' dan F2: 5'-CgT gTC AgT CAT gTg TCg CT-3'. Spesifik primer tersebut merupakan hasil sekuensing dari ikan *Striped Jack Nervous Necrosis Virus* (SJNNV), pada T-4 dengan target molekul 426 bp. (Nishizawa *et al.*, 1994).

Proses amplifikasi menggunakan reagen Promega, RNA AccesQuick™ RT-PCR System. Untuk 50 mL RT-PCR reaksi dibuat dengan mencampurkan 25 ml AccesQuick™ Master Mix 2x dengan konsentrasi final 1x, Reverse dan Forward primer masing-masing sebanyak 1 mL (10 p mol), template RNA 1 pg- 1 mg, 1 ml (5u) AMV Reverse Transcriptase dan Nuclease-Free Water sampai dengan 50mL. Semua bahan dicampurkan kemudian diinkubasi pada mesin PCR MJ-Research: *Preheating* dilakukan pada suhu 48°C selama 45 menit dan 94°C selama 2 menit, dilanjutkan 25 kali dengan suhu denaturasi 95°C selama 40 detik, suhu annealing 55°C selama 40 detik dan suhu polimerisasi

72°C selama 40 detik, untuk suhu final elongasi dan penyimpanan secara berturut-turut adalah 72°C selama 5 menit dan 4°C hingga digunakan dalam proses selanjutnya.

Nested Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (Nested RT-PCR)

Pada Nested RT-PCR, proses reamplifikasi menggunakan sepasang *inner-primer* VNN hasil sintesa dari primer R-3 dan F-2 yaitu NR'3: 5'-ggA TTT gAC ggg gCT gCT CA-3' dan NF'2: 5'-gTT CCC TgT ACA ACg ATT CC-3' dengan target berat molekul 295 bp. (Sideris, 1997 dalam Thiery *et al.*, 1999).

Proses reamplifikasi ini menggunakan reagen Promega, DNA PCR Master Mix 2x. Untuk 50 mL reaksi Nested-PCR dibuat dengan mencampurkan 25 mL Master Mix 2x dengan konsentrasi final 1x, Reverse dan Forward primer masing-masing sebanyak 1 mL (10 p mol), template c-DNA 1 mL (diambil dari hasil amplifikasi RT-PCR) dan *Nuclease-Free Water* sampai dengan 50 mL. Semua bahan dicampurkan kemudian diinkubasi pada mesin PCR MJ-Research PT 200: *Preheating* pada suhu 94°C selama 2 menit, dilanjutkan 25 kali dengan suhu denaturasi 94°C selama 40 detik, suhu annealing 50°C selama 40 detik dan suhu polimerisasi 72°C selama 40 detik, untuk suhu final elongasi dan penyimpanan secara berturut-turut adalah 72°C selama 10 menit dan 4°C hingga digunakan dalam proses selanjutnya (Thiery *et al.*, 1999).

Electrophoresis

Hasil amplifikasi RT-PCR dan Nested RT-PCR masing-masing selanjutnya di elektroforesis dengan alat elektroforesis (Mupid-2 Plus/ *Submarine Type Electrophoresis System Advance*), menggunakan 2% agarose gel selama 25 menit dalam 1x *Tris Acetic EDTA* (TAE) buffer dan diwarnai dengan Ethidium Bromide (Et.Br.) selama 10-15 menit. Pembacaan hasil dilakukan

dengan UV Transilluminator dan difoto sebagai dokumentasi menggunakan polaroid kamera.

HASIL DAN BAHASAN

Hasil Pengujian Sensitivitas

Hasil pengujian sensitivitas dengan RT-PCR dan Nested RT-PCR menggunakan pengenceran RNA 10 x, yaitu dari 10⁰ sampai dengan 10⁻¹⁰ menggunakan R-3 dan F-2 (426 bp) and NR-3 dan NF-2 (294 bp) dapat dilihat pada Tabel 1.

Hasil elektroforesis dengan foto pada agarose gel diketahui bahwa Nested RT-PCR (Gambar 2) lebih sensitif dibandingkan dengan RT-PCR (Gambar 1). Tingkat perpendaran pita tunggal sangat berbeda, keadaan ini disebabkan oleh tingkat pengenceran RNA yang digunakan dari 10⁰ sampai dengan 10⁻¹⁰. Pada RT-PCR jumlah RNA yang bisa dipantau adanya VNN ditandai dengan pita tunggal hanya sampai pada pengenceran 10⁻⁴ sedangkan pada Nested RT-PCR masih bisa mendeteksi sampai pada pengenceran 10⁻⁷ (Gambar 1).

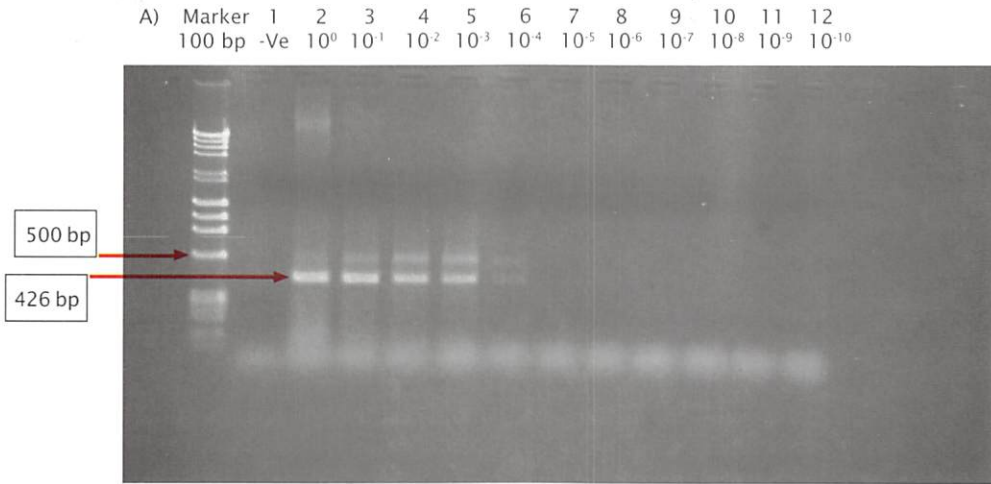
Bahasan

Diagnosa dengan PCR yang umum digunakan untuk amplifikasi virus adalah menggunakan metode PCR 1-step dan metode PCR 2-step. Deteksi dengan PCR 2-step lebih sensitif yang dikenal dengan istilah Nested RT-PCR, bila dibandingkan dengan PCR 1-step (RT-PCR), dimana dengan penggunaan Nested RT-PCR biasanya tanpa gejala pun atau ikan yang bersifat carier pembawa penyakit dapat segera diketahui akan keberadaan penyakit khususnya VNN. Metode ini juga sudah diterapkan pada beberapa penyakit virus lainnya baik pada ikan maupun pada udang.

Hasil percobaan menunjukkan bahwa metode konvensional dalam mendiagnosa VNN dengan Nested RT-PCR (PCR 2-step) ternyata menghasilkan tingkat sensitivitas yang lebih baik daripada RT-PCR. Dengan RT-PCR (PCR-1

Tabel 1. Perbandingan sensitivitas RT-PCR dan Nested RT-PCR
Table 1. Sensitivity comparison RT-PCR dan Nested RT-PCR

Metode Methods	Hasil Pada Pengenceran ke: (Result in dilution of:)										
	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰
RT-PCR	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Nested RT-PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

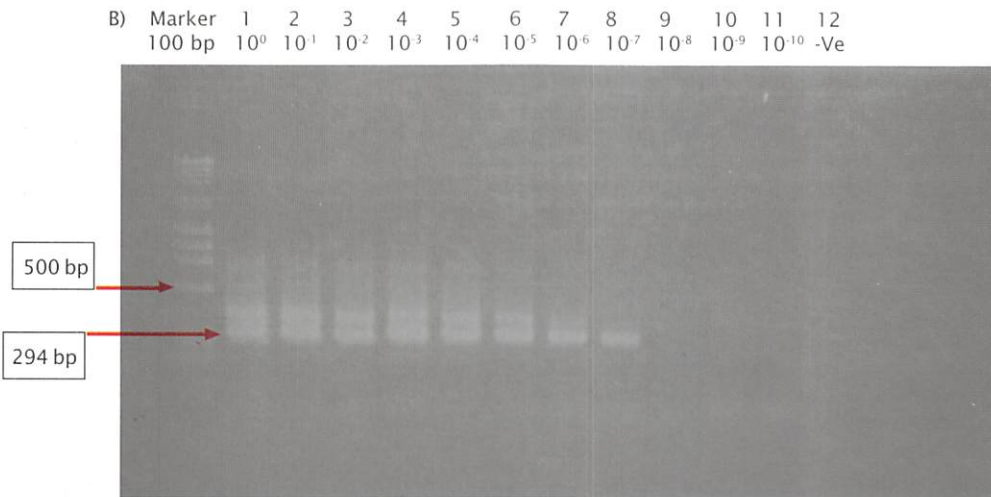


Gambar 1. Hasil gel agarose perbandingan sensitivitas RT-PCR.

(A) RT-PCR: 426 bp (Marker: 100 bp; 1: Negatif kontrol; 2: 10^0 ; 3: 10^{-1} ; 4: 10^{-2} ; 5: 10^{-3} ; 6: 10^{-4} ; 7: 10^{-5} ; 8: 10^{-6} ; 9: 10^{-7} ; 10: 10^{-8} ; 11: 10^{-9} ; 12: 10^{-10})

Figure 1. Agarose gel comparison of RT-PCR sensitivities.

(A) RT-PCR: 426 bp (Marker: 100 bp; 1: Negative control; 2: 10^0 ; 3: 10^{-1} ; 4: 10^{-2} ; 5: 10^{-3} ; 6: 10^{-4} ; 7: 10^{-5} ; 8: 10^{-6} ; 9: 10^{-7} ; 10: 10^{-8} ; 11: 10^{-9} ; 12: 10^{-10})



Gambar 2. Hasil gel agarose perbandingan sensitivitas Nested RT-PCR.

(B) Nested RT-PCR: 294 bp (Marker: 100 bp; 1: 10^0 ; 2: 10^{-1} ; 3: 10^{-2} ; 4: 10^{-3} ; 5: 10^{-4} ; 6: 10^{-5} ; 7: 10^{-6} ; 8: 10^{-7} ; 9: 10^{-8} ; 10: 10^{-9} ; 11: 10^{-10} ; 12: Negatif kontrol)

Figure 2. Agarose gel comparison of Nested RT-PCR sensitivities.

(B) Nested RT-PCR: 294 bp (Marker: 100 bp; 1: 10^0 ; 2: 10^{-1} ; 3: 10^{-2} ; 4: 10^{-3} ; 5: 10^{-4} ; 6: 10^{-5} ; 7: 10^{-6} ; 8: 10^{-7} ; 9: 10^{-8} ; 10: 10^{-9} ; 11: 10^{-10} ; 12: Negative control)

step) VNN hanya dapat terdeteksi sampai pada pengenceran (10^{-4}), sedangkan pada Nested RT-PCR keberadaan virus dapat terdeteksi sampai pada pengenceran (10^{-7}). Berarti diagnosa dengan Nested RT-PCR VNN mempunyai tingkat sensitivitas yang lebih tinggi hingga 1000 x dari RT-PCR. Metode ini sangat mudah, cepat, tepat serta dapat diterapkan pada budi daya ikan kerapu bebek khususnya dan pada ikan kerapu lain atau ikan yang tanpa gejala klinis (*carrier*) terhadap VNN dan sudah berhasil dibudidayakan dapat dideteksi awal dengan Nested RT-PCR. Diagnosa PCR perlu dilakukan secara rutin pada masa pemeliharaan larva dengan waktu sedini mungkin sehingga keberadaan virus segera dapat diketahui sehingga dapat dilakukan tindakan yang cepat guna mencegah penyebaran virus pada lingkungan budi daya. Di samping itu metode ini dapat digunakan juga untuk mendiagnosa ikan lain yang diduga bersifat carier VNN.

Gejala ikan yang terinfeksi VNN biasanya berbeda pada setiap fase atau umur ikan, tetapi dengan diagnosa PCR terutama dengan Nested RT-PCR keberadaan penyakit dapat segera diketahui dengan cepat. Gejala ikan kerapu bebek yang terserang VNN secara kasat mata baru dapat diketahui setelah larva berumur antara 10-20 hari, di mana ikan tampak lemah dan nafsu makannya berkurang. Hal ini dapat dilihat dari sisa rotifer pada air pemeliharaan. Sedangkan pada stadia post-larva (20-45 hari) ikan yang sakit tampak berenang lemah dan tidak terarah pada permukaan air, juga ditemukan kematian ikan pada dasar bak pemeliharaan. Pada umur 45 hari- 4 bulan menunjukkan gejala berenang lemah dan diam di dasar bak (Koesharyani *et al.*, 2001). Keadaan ini bila tidak dilakukan diagnosa PCR secara dini dapat memperparah kegagalan budi daya ikan kerapu dan ikan lainnya yang rentan akibat serangan VNN, yang lebih parah lagi bila mana baru diketahui setelah ikan berumur lanjut dan virus telah menyebar secara horizontal. Oleh karena itu diagnosa dengan Nested RT-PCR dapat diterapkan pada ikan-ikan yang berumur lebih muda atau kurang dari umur 10 hari serta ikan carier, sehingga penyebaran virus dapat ditekan sedini mungkin.

KESIMPULAN

Hasil deteksi dengan Nested RT-PCR menunjukkan 1000 x lebih sensitif dibandingkan dengan RT-PCR. Nested RT-PCR lebih tepat kegunaannya untuk diagnosa

penyakit bagi ikan kerapu bebek yang tidak menunjukkan gejala klinis yang jelas atau ikan kerapu bebek yang terinfeksi pada stadium awal.

DAFTAR PUSTAKA

- 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.
- Koesharyani, I., 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 Budi-daya 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. Marine fish and crustacean. Diseases in Indonesia (ISBN-979-8186-8-5, English), 49 pp.
- Koesharyani, I., K. Mahardika, dan K. Yuasa . 2004. Infeksi Viral Nervous Necrosis pada benih ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis*. JPPI, 10(2): 77--81.
- 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.
- Munday, B.L. and L. Owens. 1998. Viral disease of fish and shellfish in Australian mariculture. *Fish Pathology*, 33(4): 193--200.
- 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 (SVNN). *Diseases of Aquatic Organism*, 18: 103--107.
- Thiery, R., J.-C. Raymond, and J. Castric. 1999. Natural outbreak of viral encephalopathy in juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*: study by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Virus Research*, 63: 11--17.
- 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). *IFR Journal*, 4(1): 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.