

TEKNIK DETEKSI VIRUS *VIRAL NERVOUS NECROSIS* (VNN) PADA IKAN LAUT MENGGUNAKAN KIT IQ PLUS

Ni Luh Tati Aryani, Kadek Mastantra, dan Nengah Gede Supartha

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Budidaya Laut
Jl. Br. Gondol Kec. Gerokgak Kab. Buleleng, Kotak Pos 140,
Singaraja, Bali 81101

ABSTRAK

Infeksi *viral nervous necrosis* (VNN) disebabkan oleh virus dari golongan beta-nodavirus (famili *Nodaviridae*) yang dapat menyebabkan kematian massal pada ikan kerapu dan kakap. Virus ini termasuk ke dalam daftar penyakit ikan yang berbahaya (golongan 1) yang dikeluarkan oleh Ditjen Perikanan Budidaya Kementerian Kelautan dan Perikanan. Oleh karena itu, setiap pengusaha ikan yang akan menjualbelikan ikan kerapu dan kakap antar pulau maupun ekspor ke luar negeri diwajibkan menyertakan sertifikat bebas virus VNN yang dikeluarkan oleh laboratorium terakreditasi. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Budidaya Laut, Gondol telah mengembangkan laboratorium terakreditasi yang dapat mendeteksi keberadaan virus VNN pada ikan laut dengan beberapa metode analisis PCR yaitu menggunakan kit IQ2000, metode PCR/Speedy PCR dengan spesifik primer, Real time kuantitatif PCR (RT Q PCR) dan metode IQ Plus. Di antara ketiga metode, yang paling cepat dalam mendeteksi virus VNN adalah metode IQ Plus. Tujuan dari tulisan ini adalah untuk memberikan informasi tentang teknik deteksi VNN pada ikan dengan metode IQ Plus. Metode deteksi ini meliputi beberapa tahapan yaitu ekstraksi, amplifikasi dan dokumentasi. Waktu yang diperlukan dari ekstraksi, amplifikasi, dan dokumentasi sampai mendapatkan hasil hanya sekitar 70 menit.

KATA KUNCI: virus VNN, analisis PCR, IQ Plus

PENDAHULUAN

Virus VNN merupakan satu dari dua virus yang terdeteksi dan menyebabkan kematian massal pada ikan kerapu dan kakap di Indonesia. Virus ini dapat menyebabkan kematian massal pada larva ikan hingga 100% dalam seminggu. Selain menyerang stadia larva melalui infeksi horisontal (infeksi dari ikan sakit ke ikan sehat), virus VNN juga dapat menginfeksi induk ikan kerapu dan kakap, serta disinyalir dapat diturunkan dari induk ke anaknya (infeksi vertikal) (Koesharyani *et al.*, 1999; Yuasa *et al.*, 2001). Kejadian kematian ikan akibat infeksi virus VNN terjadi sepanjang tahun akibat perbenihan ikan kerapu dan kakap yang dilakukan secara terus-menerus sepanjang tahun. Ikan yang terinfeksi virus VNN menunjukkan gejala nafsu makan menurun, berenang tidak normal atau berenang berputar (*twirling*), berdiam di dasar bak, dan beberapa hari kemudian diikuti dengan kematian ikan di dasar bak. Virus VNN menyerang jaringan saraf dan

menimbulkan kematian sel-sel saraf (*necrosis of nervous cells*) yang terlihat seperti sel-sel retina mata dan otak yang berlubang-lubang (bervakuolasi) di bawah mikroskop. Virus VNN berada dan berkembang biak dalam vakuolasi sel-sel tersebut (Zafran *et al.*, 1998; Koesharyani *et al.*, 1999; Yuasa *et al.*, 2001).

Selama ini beberapa metode analisis telah diterapkan dalam mendeteksi keberadaan virus VNN dalam tubuh ikan. Namun seiring dengan perkembangan teknologi, deteksi dini sangat diperlukan untuk mengetahui keberadaan virus VNN dalam tubuh ikan dalam jumlah kecil atau sebelum berkembang biak lebih lanjut dan menimbulkan ikan sakit sehingga dapat dilakukan tindakan pencegahan dan karantina. Metode analisis PCR (*polimerase chain reaction*) merupakan metode cepat untuk mendeteksi keberadaan virus dalam tubuh ikan. Laboratorium Bioteknologi, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Budidaya Laut, Gondol telah mengembangkan teknik PCR dengan

beberapa metode analisis yaitu menggunakan kit IQ 2000, metode PCR/Speedy PCR dengan spesifik primer, Real time quantitative PCR (RT Q PCR), dan metode IQ Plus. Di antara ketiga metode, metode IQ Plus membutuhkan waktu paling cepat sekitar 70 menit dalam mendeteksi virus VNN. Tujuan dari tulisan ini adalah untuk memberikan informasi tentang teknik deteksi VNN pada ikan dengan metode IQ Plus.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam kegiatan ini antara lain sampel ikan kerapu dan kakap, bahan kimia untuk ekstraksi, dan amplifikasi dari Kit IQ Plus (Gambar 1).

Alat yang digunakan antara lain: gunting, pinset, penggerus, mikro pipet, autoclave, mini centrifuge cubbe, eppendorf tube, mikrotip (ukuran 100 dan 1.000 μ L), Pockit PCR, kamera, dan komputer (Gambar 1).

Teknik deteksi virus dengan IQPlus meliputi beberapa tahapan antara lain: ekstraksi, amplifikasi, dan dokumentasi.

Ekstraksi

- Eppendorf tube* bervolume 1.500 μ L diisi 500 μ L solution-1
- Sampel ikan diambil mata dan otak ditimbang sebanyak \pm 50 mg dimasukkan ke dalam *eppendorf tube* (a) kemudian digerus sampai halus.



Gambar 1. Bahan kimia dan alat untuk ekstraksi virus VNN dengan metode IQ Plus



Gambar 2. Alat yang dipakai untuk amplifikasi dan dokumentasi (PCR POCKIT)

- Solution-2 ditambahkan sebanyak 500 μ L dan di-centrifuge selama satu menit.
- Supernatan sebanyak 500 μ L dipindahkan ke coloum filter dan di-centrifuge selama satu menit, kemudian air dibuang
- Larutan PB3 ditambahkan 500 μ L ke coloum filter tersebut kemudian centrifuge kembali selama satu menit, buang airnya
- Solution-2 ditambahkan lagi sebanyak 500 μ L ke coloum filter dan centrifuge kembali selama tiga menit, air dibuang
- Selanjutnya coloum filter dipindahkan ke *eppendorf tube* baru bervolume 1.500 μ L kemudian ditambahkan 200 μ L solution-3 dan centrifuge kembali selama satu menit
- Air yang ada di dalam *eppendorf* adalah genom yang siap untuk diamplifikasi

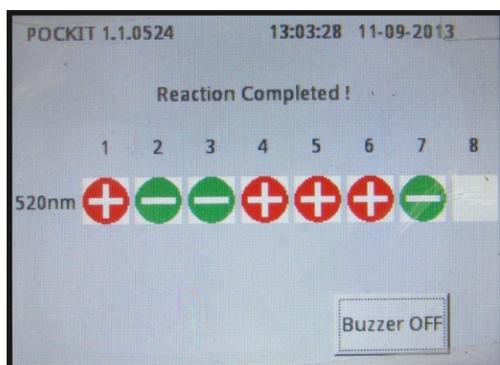
Amplifikasi

- Eppendorf* 0,6 mL yang ada di dalam kit IQ Plus ditambahkan dengan buffer sebanyak 50 μ L
- Loops yang ada dalam kit dipergunakan untuk mengambil genom sampel kemudian dicelupkan ke dalam *eppendorf* yang telah berisi buffer, demikian juga untuk kontrol positif dan negatif (satu loops untuk satu sampel)
- Kemudian di-centrifuge selama \pm 30 detik
- larutan tersebut dipindahkan dengan menggunakan mikropipet sebanyak 50 μ L ke dalam R-tube kemudian ditutup dan di-centrifuge kembali selama \pm 30 detik sampai tidak ada gelembung udara

- e. R-tube dimasukkan ke dalam POKKIT PCR dan reaksi berlangsung selama 58 menit
- f. Hasil yang terlihat pada mesin POKKIT PCR didokumentasikan dengan kamera (Gambar 2).

HASIL DAN BAHASAN

Dari kelima jumlah sampel ikan yang dideteksi dengan menggunakan metode IQ Plus (Gambar 3) dua sampel menunjukkan ikan negatif VNN dan 3 sampel ikan lainnya positif terserang VNN. Hasil amplifikasi virus dengan metode IQ Plus dapat dilihat langsung di monitor mesin Pockit PCR (mesin amplifikasi khusus untuk metode IQ Plus). Hal tersebut lebih memudahkan interpretasi pembacaan hasil dibandingkan dengan metode lain seperti metode IQ 2000 maupun menggunakan primer spesifik karena metode ini masih menggunakan agarose gel untuk menginterpretasikan hasil amplifikasi. Hal ini karena terkadang hasil elektroforesis produk PCR dalam agarose terlihat *band* (pita) target yang samar atau tidak segaris dengan *band* pada kontrol positif sehingga



Keterangan:

1. Sampel ikan (Terinfeksi VNN)
2. Sampel ikan (Negatif VNN)
3. Sampel ikan (Negatif VNN)
4. Sampel ikan (Terinfeksi VNN)
5. Sampel ikan (Terinfeksi VNN)
6. Kontrol Positif VNN
7. Kontrol Negatif VNN

Gambar 3. Hasil deteksi virus VNN dengan metode IQ Plus

menyulitkan dalam penentuan positif atau tidaknya sampel tersebut. Dari proses ekstraksi sampai pembacaan hasil, metode IQ Plus memerlukan waktu 70 menit lebih cepat dibandingkan dengan metode IQ 2000 yang memerlukan waktu kurang lebih 200 menit, maupun metode ekstraksi dengan trizol atau bahan ekstraksi RNA lainnya serta amplifikasi dengan spesifik primer. Namun, metode IQ Plus memerlukan mesin khusus untuk amplifikasi sedangkan metode IQ 2000 dan metode konvensional lainnya dapat memakai mesin PCR biasa yang dapat digunakan secara bersama-sama.

KESIMPULAN

Deteksi virus VNN dengan menggunakan metode IQ Plus hasilnya dapat diketahui lebih cepat dibandingkan dengan metode deteksi yang lain. Waktu yang diperlukan dari ekstraksi, amplifikasi dan dokumentasi sampai mendapatkan hasil hanya sekitar 70 menit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Haryanti, Dr. Ketut Mahardika, dan staf Laboratorium Bioteknologi yang telah membimbing dalam penulisan makalah ini.

DAFTAR ACUAN

- Koesharyani, I., Zafran, & Yuasa, K. 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, hlm. 237-240.
- Zafran, Harada, T., Koesharyani, I., Yuasa, K., & Hatai, K. 1998. Indonesian hatchery reared sea bass larvae (*Lates calcarifer*), associated with *viral nervous necrosis* (VNN). *IFR Journal*, IV(1): 19-22.
- Yuasa, K., Koesharyani, I., Roza, D., Jhonny, F., & Zafran. 2001. Manual for PCR procedure; rapid diagnosis on *viral nervous necrosis* (VNN) in grouper. Lolitkanta-JICA Booklet No. 13, 35 pp.

