

TEKNIK DETEKSI *VIRAL NERVOUS NECROSIS* PADA IKAN KERAPU BEBEK (*Cromileptes altivelis*) DENGAN MENGGUNAKAN KIT IQ-2000

Sri Suratmi¹⁾ dan Ni Luh Tati Aryani²⁾

¹⁾ Teknisi Litkayasa pada Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol

ABSTRAK

Tingginya tingkat mortalitas pada sentra pembenihan merupakan salah satu kendala dalam usaha budi daya ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*). Pada umumnya, mortalitas ikan kerapu bebek disebabkan oleh infeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN). Penyakit VNN dapat menyebabkan kematian massal hingga 100% dan sampai saat ini belum ada obat yang dapat mengatasi penyakit tersebut. Upaya pencegahan dapat dilakukan dengan deteksi dini infeksi VNN menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan kit IQ-2000. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa deteksi dengan metode tersebut dapat diketahui tingkat infeksi, yaitu infeksi ringan, dengan berat molekul DNA sebesar 289 bp, infeksi sedang (289 bp dan 620 bp) dan infeksi berat (289 bp, 620 bp, dan 1.160 bp). Teknik PCR terdiri atas beberapa tahapan yaitu ekstraksi, amplifikasi, elektroforesis *staining*, dan dokumentasi.

KATA KUNCI: *Viral Nervous Necrosis*, PCR, kerapu bebek (*C. altivelis*)

PENDAHULUAN

Tingginya kematian ikan kerapu bebek dalam pembenihan merupakan penyebab kegagalan pada usaha budi daya. Salah satu penyebab tingginya tingkat kematian ikan adalah infeksi penyakit VNN pada ikan kerapu bebek. Infeksi penyakit VNN pada ikan kerapu bebek merupakan kendala besar bagi pembudi daya karena dapat menyebabkan kematian massal hingga 100% dan sampai saat ini belum ada obat yang dapat mengatasi penyakit tersebut (Koesharyani *et al.*, 1999).

Virus ini umumnya menginfeksi stadia larva sampai yuwana dan menyerang sistem organ syaraf mata dan otak dengan gejala yang cukup spesifik karena ikan menampilkan tingkah laku berenang yang tidak normal dan umumnya ikan berdiam di dasar (Yuasa *et al.*, 2001), nafsu makan ikan menurun dan banyak yang mati di dasar bak (Koesharyani *et al.*, 2001).

Untuk mencegah infeksi penyakit VNN pada ikan dapat dilakukan deteksi dengan metode *Polymerase Chain Reaction* atau lebih populer disebut dengan PCR (Nishizawa *et al.*, 1994). Hasil deteksi VNN dengan metode PCR

dapat diketahui dengan cepat. Dalam makalah ini disajikan langkah-langkah teknik deteksi penyakit VNN menggunakan metode PCR dengan Kit IQ-2000.

BAHAN DAN TATA CARA

Alat dan Bahan

Teknik deteksi VNN menggunakan IQ-2000 dengan metode PCR menggunakan alat-alat antara lain: mesin PCR, gunting, pinset, sarung tangan, eppendorf tube, pistil/penggerus, centrifuge, pipet, tip, timbangan, elektroforesis, UV transiluminator, gel camera, polaroid film. Bahan yang digunakan untuk diagnosa adalah sampel ikan kerapu bebek, RNA *extraction solution*, chloroform, isopropanol, ethanol 75% dan DEPC (Diethypyrocarbonate) sebagai pelarut genom RNA.

Cara Kerja

Teknik deteksi VNN dengan PCR berdasarkan pada prosedur kit IQ 2000™. Langkah kerja deteksi meliputi beberapa tahapan, yaitu: ekstraksi, amplifikasi, elektroforesis, *staining* (pewarnaan) dan dokumentasi.



Gambar 1. Peralatan yang dipergunakan

Ekstraksi

Ekstraksi merupakan serangkaian proses untuk memisahkan DNA dan RNA. Ekstraksi bertujuan untuk menghasilkan material RNA (genom) dari VNN yang akan dideteksi. Langkah-langkah yang dilakukan pada tahapan ekstraksi adalah sebagai berikut:

1. Ekstraksi di awali dengan mengambil jaringan tubuh ikan yang akan di analisis berupa organ mata atau otak sebanyak ± 20 mg yang kemudian dimasukkan kedalam mikrotube volume 1.500 mL dan selanjutnya dihancurkan menggunakan gunting.
2. RNA *Extraction Solution* sebanyak 500 μ L ditambahkan ke dalam mikrotube yang berisi organ mata atau otak yang telah hancur kemudian digerus dengan menggunakan pistil/penggerus dan didiamkan pada suhu ruang selama 5 menit.
3. Chloroform sebanyak 100 μ L ditambahkan pada larutan tadi dan divortex selama 20 detik, selanjutnya didiamkan selama 2—3 menit pada suhu ruang.
4. Campuran larutan dan organ ikan kerapu kemudian disentrifuse selama 15 menit dengan kecepatan 12.000 g (12.000 rpm).



Gambar 2. Sentrifuge

5. Supernatan sebanyak 200 mL dipindahkan pada mikrotube baru dan ditambahkan 200 μ L isopropanol dan divortex agar tercampur rata.
6. Larutan tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 g selama 10 menit.
7. Supernatan yang terjadi dibuang dan ditambahkan 500 mL ethanol 75%.
8. Larutan tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 7.500 g selama 5 menit.
9. Keringkan pelet dengan cara diangin-anginkan dalam suhu ruang atau masukkan kedalam pompa vacuum (desikator).
10. Pellet RNA diencerkan dengan DEPC ddH₂O (Diethylpyrocarbonate).

Amplifikasi

Amplifikasi merupakan tahapan selanjutnya dalam proses deteksi VNN pada ikan kerapu bebek dengan menggunakan mesin PCR. Amplifikasi dibagi menjadi 2 tahap, yaitu RT (Reverse - Transcription) - PCR dan Nested PCR. Campuran yang digunakan dalam RT - PCR adalah :

- | | |
|---|------------------------|
| a. RT - PCR reaction | : 8 μ L / reaction |
| b. RT - Pre- Mixed Reagent | : 7.0 μ L |
| c. Iqzyme™ | : 0,5 μ L |
| d. Reverse Transcription
(RT) Enzyme Mix | : 0,5 μ L |
| e. Genom RNA | : 2 μ L |

Pada tahap pertama, semua larutan tersebut dimasukkan kedalam mikrotube dan selanjutnya diletakkan ke dalam mesin PCR selama ± 1 jam dengan menggunakan program RT - PCR VNN. Setelah tahap pertama selesai, mikrotube diambil dari mesin PCR dan ditambahkan larutan Nested PCR dan diflasing, selanjutnya dimasukkan lagi ke dalam mesin PCR dengan menggunakan program Nested PCR. Campuran yang digunakan dalam larutan Nested PCR adalah:

- | | |
|----------------------------------|--------------|
| a. Nested PCR reaction | : 15 μ L |
| b. Nested PCR Pre- Mixed Reagent | : 14 μ L |
| c. Iqzyme™ | : 1 μ L |

Setiap mendeteksi sampel dugaan infeksi VNN harus ditambahkan dua sampel lagi sebagai kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif sudah tersedia dalam kit yang digunakan, sedangkan kontrol negatif menggunakan aquades atau yeast tRNA yang juga sudah tersedia di dalam kit. Setelah proses amplifikasi

selesai dilanjutkan dengan tahap elektroforesis.



Gambar 3. Mesin PCR yang dipergunakan untuk deteksi VNN

Elektroforesis

Elektroforesis adalah proses migrasi fragmen DNA berdasarkan aliran listrik di dalam gel yang direndam dalam larutan penyangga. Fragmen DNA yang lebih ringan berat molekulnya akan berjalan lebih cepat dari molekul DNA yang lebih berat. Perjalanan molekul DNA di dalam gel mengikuti arus listrik dari kutub negatif menuju kutub positif (Sulandri & Samsul, 2003). Sebelum melakukan elektroforesis dilakukan langkah dalam 2 tahapan, yaitu pembuatan agarose gel dan proses elektroforesis.

Pembuatan Agarose Gel

Agarose sebanyak 1,5 g dilarutkan dalam 100 mL larutan 1 x TAE *Buffer*, kemudian dipanaskan dengan *microwave* selama ± 2 menit. Setelah larutan berwarna bening, didinginkan sebentar dan larutan agarose dituangkan ke dalam cetakan agarose yang dilengkapi dengan sisir (*comb*). Agarose dibiarkan hingga membeku. Setelah dingin, sisir dilepaskan secara perlahan dan hati-hati agar agarose gel tidak rusak. Agarose gel siap digunakan untuk proses elektroforesis.



Gambar 4. Cetakan agarose gel

Elektroforesis

Larutan 1 x TAE *Buffer* disiapkan sebanyak 300 mL dan dimasukkan ke dalam wadah elektroforesis, kemudian agarose gel yang sudah siap digunakan dimasukkan. Selanjutnya 4 mL loading dye 6 x diletakkan di atas parafilm, dan sebanyak 5 mL PCR *product* kemudian campur dengan loading dye hingga homogen menggunakan mikropipet. Campuran PCR *product* dengan loading dye tersebut dimasukkan ke dalam sumuran yang berada dalam agarose gel menggunakan mikropipet. Proses elektroforesis siap dilakukan dengan menyalakan alat elektroforesis selama 25 menit. Setelah 25 menit elektroforesis dimatikan dan selanjutnya adalah tahap *staining* (pewarnaan).



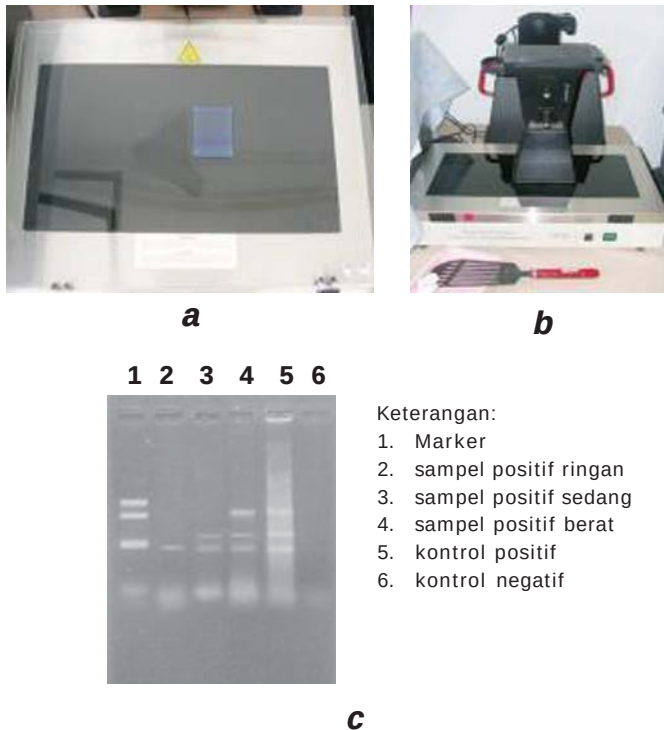
Gambar 5. Alat elektroforesis

Staining (Pewarnaan)

Staining (pewarnaan) merupakan tahapan penting untuk ekspresi fragment DNA. Agarose gel yang telah di elektroforesis kemudian direndam dalam larutan 1 x TAE *Buffer* yang sudah dicampur dengan Ethidium Bromide, dengan perbandingan 100 mL 1 x TAE *Buffer* dan 10 mL *Ethidium Bromide*. Perendaman agarose gel dilakukan selama 15 menit, selanjutnya agarose gel dicuci dengan merendamnya dalam aquades selama 5 - 10 menit. Tahap berikutnya adalah dokumentasi.

Dokumentasi

Hasil deteksi VNN dilihat dengan menggunakan UV Transilluminator dan difoto menggunakan gel kamera Polaroid (Gambar 6a, 6b). Dari hasil dokumentasi ini dapat diketahui tingkat infeksi ikan kerapu bebek yang dianalisis. Sampel yang terinfeksi terlihat adanya *fragment* yang



Gambar 6. a. UV transilluminator; b. Polaroid gel camera; dan c. Hasil analisis sampel menggunakan metode PCR dengan kit IQ-2000

sejajar dengan kontrol positif (Gambar 6c). Indikator tingkat akurasi analisis dapat dilihat dari tidak adanya *fragment* DNA pada kontrol negatif. Bila terjadi *fragment* DNA pada kontrol negatif maka berarti analisis mengalami kontaminasi sehingga perlu dilakukan pengulangan.

Dari hasil yang diperoleh terlihat bahwa deteksi dengan kit IQ-2000 dapat diklasifikasi tingkat infeksi dari VNN terhadap ikan kerapu bebek. Klasifikasi serangan infeksi ringan dengan berat molekul *fragment* DNA sebesar 289 bp, infeksi sedang ditunjukkan dengan berat molekul 289 bp dan 620 bp, serta infeksi berat masing-masing *fragment* DNA sebesar 289 bp, 620 bp, dan 1.160 bp. Hal ini sangat berguna bagi praktisi hatcheri dalam penentuan langkah dan keputusan berikutnya.

Pada kasus serangan infeksi ringan, ikan kerapu dapat mengalami pemulihan kesehatan dengan bantuan pemberian vitamin (terutama vitamin C), penggunaan immunostimulan, meminimalkan tingkat stres dan pemberian pakan yang berkualitas.

KESIMPULAN

- Deteksi dini infeksi VNN pada ikan kerapu bebek dapat dilakukan dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) menggunakan kit IQ-2000.
- Hasil deteksi infeksi VNN dengan Kit IQ-2000 dapat diketahui tingkat infeksi yaitu ringan, sedang, dan berat dengan tingkat akurasi tinggi dan waktu yang relatif cepat.

DAFTAR PUSTAKA

- 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 Budidaya Laut dan Pantai, Jakarta. p. 237 - - 240.
- Koesharyani I., Des Roza., K. Mahardika, F. Jhonny, Zafran., dan K. Yuasa. 2001. Penuntun Diagnosa Ikan II. Penyakit Ikan Laut dan Krustacea di Indonesia. Balai

- Penelitian Perikanan Laut Gondol-Singaraja.
49 pp
- Nishizawa, T., K. I. Mori, T. Nakai, I. Furusawa,
and K. Muroga. 1994. *Polymerase Chain
Reaction* (PCR) Amplification of RNA of
Stripped Jack Viral Nervous Necrosis
(SJVNN). *Diseases of Aquatic Organism*, 18:
103—107.
- Sulandri, S. dan M.A.Z. Syamsul. 2003. Panduan
Praktis Laboratorium DNA. 117 pp.
- Yuasa, K., I. Koesharyani, D. Roza, F. Jhonny
and Zafran. 2001. Manual for PCR Proce-
dure; Rapid Diagnosis on *Viral Nervous
Necrosis* (VNN) in Grouper. Lolitkanta-JICA
Booklet No. 13, 35 pp.