

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/btla>

## DETEKSI *Infections Spleen and Kidney Necrosis Virus* PENYEBAB KEMATIAN PADA IKAN GURAME (*Osphronemus gouramy* Lac) SECARA MOLEKULAR

Setiadi dan Edi Farid Wadjdjy

Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan

Jl. Sempur No. 1, Bogor 16129

E-mail: [pelnisbpbpat@yahoo.com](mailto:pelnisbpbpat@yahoo.com)

### ABSTRAK

Penyakit *Infections Spleen and Kidney Necrosis Virus* (ISKNV) merupakan penyakit infeksius pada ikan gurame (*Osphronemus gouramy* Lac), yang dapat menginfeksi pada semua umur. Gejala klinis ISKNV adalah ikan berenang lemah, badan menghitam, sering mengambil udara ke permukaan, dan mengeluarkan gelembung. Pendeteksian menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) telah banyak digunakan untuk mengidentifikasi penyakit virus maupun bakteri. Tujuan dari kegiatan ini adalah untuk mendeteksi ISKNV menggunakan PCR. Hasil PCR ikan gurame yang berasal dari Ciseeng dan Tajurhalang positif ISKNV, sedangkan hasil PCR ikan gurame yang berasal dari Putatnutug, Citayam, Cibinong, Depok, dan Sukamandi semuanya negatif ISKNV.

**KATA KUNCI:** deteksi PCR (*Polymerase Chain Reaction*); ISKNV; ikan gurame; penyakit

### PENDAHULUAN

Ikan gurame (*Osphronemus gouramy* Lac.) adalah ikan asli Indonesia yang memiliki nilai ekonomis tinggi, berukuran besar, dan berpotensi tumbuh cepat sehingga menjadi salah satu komoditas unggulan pada budidaya ikan air tawar. Sentra budidaya ikan gurame di Indonesia tersebar di Jawa, Nusa Tenggara Barat, dan Sumatera (Fatimah *et al.*, 2015). Salah satu kendala yang dihadapi pada budidaya ikan gurame adalah adanya penyakit *Infections Spleen and Kidney Necrosis Virus* (ISKNV). Adapun ciri-ciri ikan gurame yang terserang penyakit ISKNV bisa dilihat dari gejala klinis seperti badan menghitam, berenang lemah, sering mengambil udara ke permukaan, dan mengeluarkan gelembung. Beberapa kerugian yang ditimbulkan dari serangan penyakit terhadap usaha budidaya antara lain penurunan produksi, produktivitas, kualitas ikan, efisiensi pakan, penurunan daya saing, penolakan pasar, menghambat intensifikasi, dan ekstensifikasi budidaya karena usaha budidaya menjadi berisiko tinggi dan tidak berkelanjutan (Tauhid *et al.*, 2015). Saat ini deteksi penyakit pada ikan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) telah banyak digunakan untuk mengidentifikasi penyakit virus maupun bakteri. Teknik ini lebih cepat dan akurat dibandingkan metode konvensional seperti uji karakteristik biokimia. Sebelum dilakukan uji PCR, ada beberapa tahapan yang harus dilakukan seperti persiapan sampel, ekstraksi DNA, pengukuran konsentrasi DNA, pencampuran

*master mix* dan amplifikasi PCR. Tahapan penting yang dapat mempengaruhi keberhasilan deteksi penyakit dengan teknik PCR adalah ekstraksi DNA. Menurut Gardenia & Koesharyani (2011), proses ekstraksi pada dasarnya adalah untuk membebaskan DNA dari masa sel dan komponen-komponen lain di dalam sel. Tujuan dari kegiatan ini adalah deteksi penyakit pada ikan gurame yang diduga terinfeksi ISKNV dengan teknik PCR. Pengambilan sampel ikan gurame dilakukan dari beberapa daerah di Jawa Barat, yaitu dari: Ciseeng, Putatnutug, Tajurhalang, Citayam, Depok, Cibinong, dan Sukamandi.

### BAHAN DAN METODE

#### Waktu dan Tempat

Kegiatan ini dilakukan pada bulan Juli sampai dengan September 2019 di Instalasi Riset Pengendalian Penyakit Ikan, Depok yang berada di bawah Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan, Bogor.

#### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan antara lain: jaringan ikan gurame berupa limpa dan ginjal, *ethanol* (70%, 85%, 95%, dan 100%), DNAzol, *primer*, *master mix*, *RNAse free water*, ddH<sub>2</sub>O, *agarose*, TAE buffer 1x, DNA Marker (DNA *ladder*) 100 bp, *Ethidium bromide*, akuades, mikrotube (1,5 mL dan 0,2 mL), tip mikropipet

(10  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , dan 1000  $\mu\text{L}$ ), *gloves*, dan masker. Adapun alat yang digunakan terdiri atas: *laminar flow*, *dissecting kit*, *pestel*, *centrifuge*, *microcentrifuge*, mikropipet, *nano drop*, *thermal cycler*, *electrophoresis*, *gel doc*, *refrigerator*, dan *freezer*.

## METODE

### Persiapan Sampel

Jumlah sampel ikan gurame yang digunakan dalam kegiatan ini sebanyak 75 sampel. Sampel ikan gurame yang diduga terinfeksi penyakit ISKNV dibersihkan terlebih dahulu dengan menggunakan kertas tisu yang telah dibasahi alkohol teknis 70%, selanjutnya dilumpuhkan dengan cara ditusuk pada bagian otak supaya dapat dilakukan nekropsis untuk dapat diambil organ targetnya. Organ yang diambil untuk pembuatan ekstrak jaringan adalah limpa dan ginjal, kemudian jaringan tersebut disimpan dalam *ethanol* 95%. Proses pengambilan jaringan organ limpa dan ginjal tersaji pada Gambar 1.



Gambar 1. Proses nekropsis pada ikan gurame.

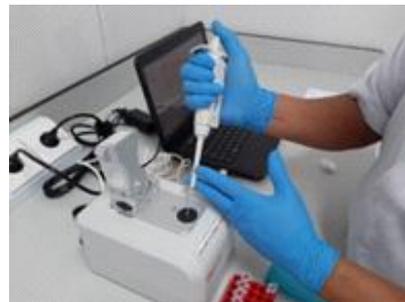
### Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan DNAzol reagen yaitu dengan cara mengambil organ target limpa dan ginjal sebanyak 25 mg, setelah itu dimasukkan ke mikrotub 1,5 mL dan ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  DNAzol, selanjutnya digerus dengan *pestel* sampai homogen (Gambar 2 A-C). Selanjutnya untuk memisahkan DNA dari protein, sampel disentrifugasi pada 1200 g selama 10 menit. Supernatan yang mengandung DNA atau bagian yang bening dipindahkan ke mikrotub yang baru dengan

menggunakan pipet, kemudian supernatan (DNA) yang diperoleh ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  *ethanol* 100% dan dicampurkan dengan cara membolak-balikkan. Setelah itu diinkubasi pada suhu ruang selama 3 menit dan disentrifugasi pada 8000 g selama 3 menit, lalu cairannya dibuang sehingga yang tersisa pelet DNA. Selanjutnya pelet DNA yang diperoleh ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  *ethanol* 95% dan dikocok sebanyak 6 kali dengan cara dibolak-balikkan, dan disentrifugasi kembali pada 8000 g selama 5 menit. Setelah selesai sentrifugasi cairan *ethanol*nya dibuang, kemudian ditambahkan ddH<sub>2</sub>O sebanyak 50  $\mu\text{L}$ . Setelah proses ekstraksi selesai selanjutnya dilakukan pengukuran konsentrasi DNA dengan menggunakan *nano drop*.

### Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA

DNA yang diperoleh selanjutnya dicek konsentrasi dan kemurniannya menggunakan *nano drop* (*Thermo Scientific*) dengan absorbansi pada rasio 260 dan 280 nm. Pengukuran blanko dilakukan dengan meneteskan ddH<sub>2</sub>O sebanyak 1  $\mu\text{L}$  pada alat *nano drop* yang dihubungkan langsung dengan komputer (Gambar 3). Sampel dapat digunakan bila terukur pada skala kemurnian 1,8-2,0 dan konsentrasi 100-200 ng/ $\mu\text{L}$ . Bila kemurniannya kurang dari skala 1,8 atau melebihi dari 2,0 maka sampel DNA tidak dapat digunakan dan harus diekstaksi ulang. Bila konsentrasi DNA lebih dari 200 ng/ $\mu\text{L}$ , maka DNA harus diencerkan terlebih dahulu sebelum proses amplifikasi sampai konsentrasi mencapai 100 ng/ $\mu\text{L}$ .



Gambar 3. Proses pengukuran konsentrasi DNA.



Gambar 2. (A) kit DNAzol, *ethanol* 100% dan 95%; (B) proses penggerusan sampel; (C) proses sentrifugasi.

### Amplifikasi DNA

DNA dari jaringan ikan yang telah diekstraksi dan diketahui konsentrasinya, selanjutnya dilakukan pengujian ISKNV menggunakan PCR. Amplifikasi PCR menggunakan primer 1F: 5' CTCAAACACTCTGGCTCATC 3' dan 1-R: 5' GCACCAACACATCTCCTATC 3' dengan target pita PCR pada 570 bp. Komposisi reaksi PCR menggunakan GoTaq-Gren Master Mix 2x, 12,5  $\mu$ L, primer *forward* dan *reverse* 10 pMol 1  $\mu$ L, *nuclease free water* 8,5  $\mu$ L dan DNA *template* 2  $\mu$ L, master mix PCR dan DNA *template* digabung dalam tube 0,2 mL (Gambar 4 A dan B), selanjutnya dilakukan uji PCR pada mesin *Thermocycler*. Program PCR untuk amplifikasi DNA sebagai berikut: denaturasi awal suhu 95°C selama 15 menit, kemudian dilakukan denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 58°C selama 1 menit dan ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit, sebanyak 34 siklus, ekstensi akhir 72°C selama 7 menit, suhu akhir 4°C.

### Elektroforesis dan Dokumentasi

Hasil PCR selanjutnya dilakukan elektroforesis pada gel agarose 1,5 %, adapun cara pembuatan gel agarose adalah sebagai berikut: agarose 1,5 g dilarutkan ke dalam TAE buffer 1x 100 mL, dipanaskan dalam *microwave* (Gambar 5 A-D). Agarose kemudian dituang ke dalam cetakan elektroforesis yang telah dipasang *comb*. Setelah agarose mengeras, kemudian gel

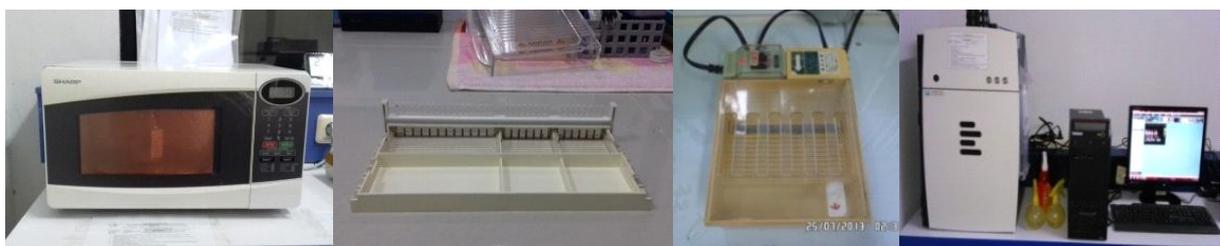
dimasukkan ke dalam elektroforesis yang telah diisi dengan TAE 1 x sebagai *buffer* elektroforesis. Selanjutnya 10  $\mu$ L produk PCR dimasukkan ke sumur gel agarose, sumur 1 diisi dengan 3  $\mu$ L penanda molekuler (*marker*) 1 kb, sumur 2, 3 dan seterusnya dimasukkan 10  $\mu$ L produk PCR. Elektroforesis dijalankan dengan voltase 110 volt selama 25 menit. Pewarnaan DNA dengan melakukan perendaman gel agarose ke dalam larutan *ethidium bromide* selama 15 menit dan hasilnya didokumentasikan dengan *gel doc*.

### HASIL DAN BAHASAN

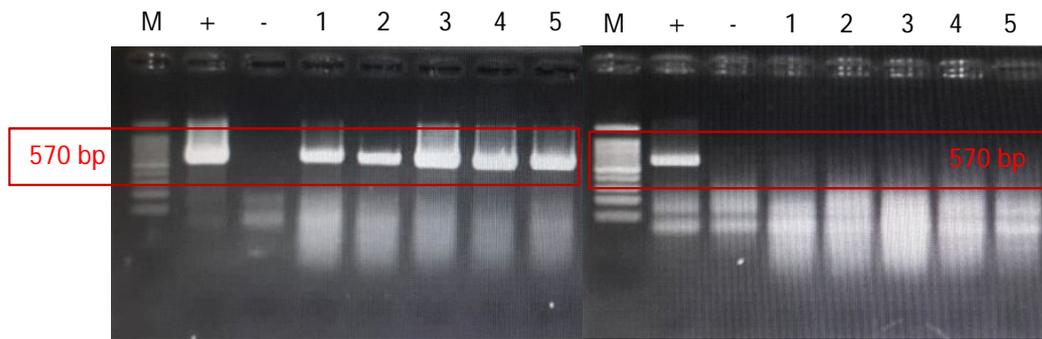
Deteksi penyakit ISKNV dilakukan pada semua sampel ikan gurame yang diambil dari beberapa daerah di Jawa Barat dengan target panjang amplicon 570 bp. Berdasarkan visualisasi gel elektroforesis, hasil deteksi ISKNV dengan PCR pada ikan gurame menunjukkan hasil yang berbeda antar daerah (Gambar 6-8). Sampel ikan dari daerah Ciseeng menunjukkan positif ISKNV yang ditandai dengan munculnya pita PCR target pada 570 bp, sedangkan sampel ikan dari daerah Putatnutug, Citayam, Cibinong, Depok dan Sukamandi menunjukkan hasil negatif ISKNV yang ditandai dengan tidak munculnya pita PCR pada 570 bp. Hasil yang lebih bervariasi ditunjukkan pada sampel ikan gurame dari daerah Tajurhalang, yaitu 2 sampel menunjukkan hasil positif dan 3 sampel negatif ISKNV. ISKNV merupakan salah satu agen penyakit virus dari spesies



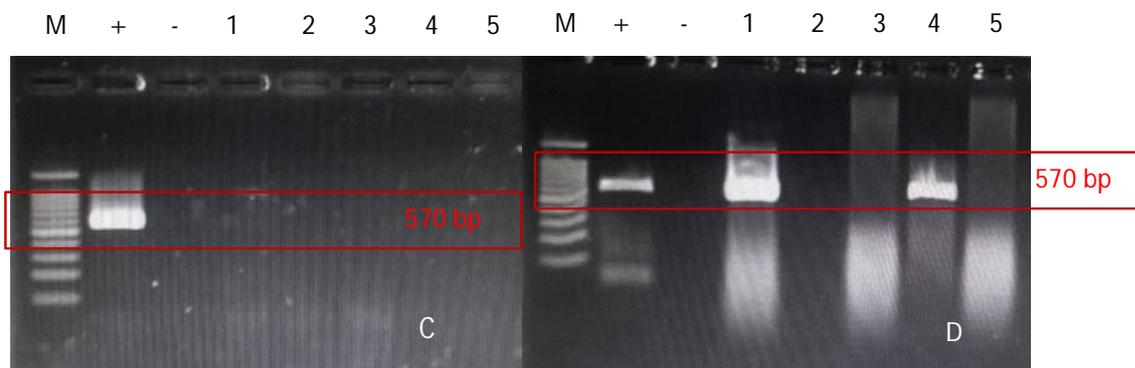
Gambar 4. (A) Proses pencampuran mastermix; (B) Proses amplifikasi PCR.



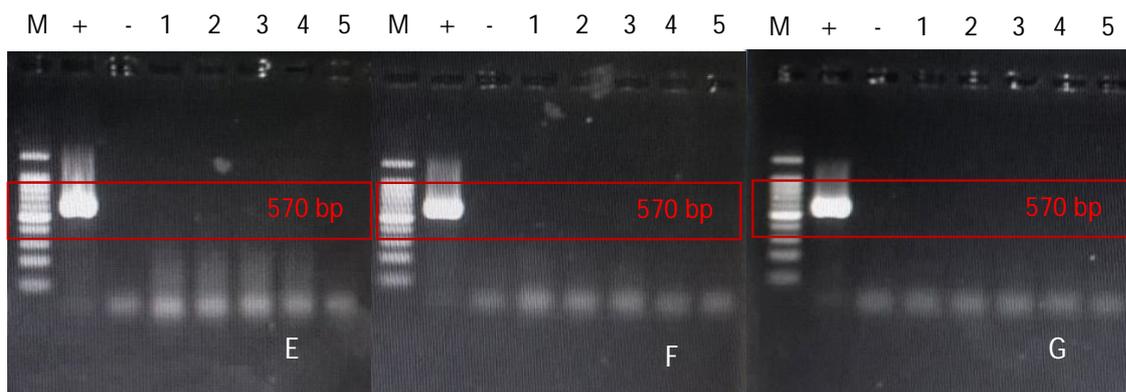
Gambar 5. (A) Proses pemanasan gel agarose; (B) Proses pencetakan ge agarose; (C) Proses elektroforesis; (D) Proses dokumentasi.



Gambar 6. Hasil uji PCR ISKNV gurame (A. Sampel dari Ciseeng, B. sampel dari Putatnutug). Keterangan: M= marker 100 bp, (+) positif kontrol, (-) negatif kontrol, 1-5 (sampel). Sampel positif ditandai dengan munculnya pita PCR target pada 570 bp dan hasil negatif ditandai tidak munculnya pita PCR pada 570 bp.



Gambar 7. Hasil uji PCR ISKNV gurame (C. sampel dari Citayam; D. sampel dari Tajurhalang). Keterangan: M= marker 100bp, (+) positif kontrol, (-) negatif kontrol, 1-5 (sampel). Sampel positif ditandai dengan munculnya pita PCR target pada 570 bp dan hasil negatif ditandai tidak munculnya pita PCR pada 570 bp.



Gambar 8. Hasil uji PCR ISKNV ikan gurame (E. sampel dari Cibinong; F. sampel dari Depok; G. sampel dari Sukamandi). Keterangan: M= marker 100 bp, (+) positif kontrol, (-) negatif kontrol, sampel nomor 1 sampai dengan sampel nomor 5 hasil negatif ditandai tidak munculnya pita PCR pada 570 bp.

*Megalocytivirus* yang dapat menimbulkan kematian massal pada budidaya ikan laut maupun ikan air tawar (Rifai, 2020). Secara umum ikan yang terinfeksi virus dari genus *Megalocytivirus* memiliki kesamaan gejala klinis sehingga sangat sulit membedakan ikan yang terinfeksi ISKNV, RBIV atau TRBV. Teknik PCR merupakan metode yang direkomendasikan oleh OIE untuk dapat mendeteksi ISKNV. Teknik ini didasarkan pada proses amplifikasi atau perbanyakan DNA menggunakan sepasang primer melalui reaksi enzimatis.

Hasi kegiatan deteksi penyebab penyakit pada sampel ikan gurame dengan menggunakan metode PCR berhasil mendeteksi ISKNV yang ditandai dengan munculnya pita PCR pada 570 bp. Berdasarkan hasil tersebut dapat dipastikan bahwa sampel ikan gurame dari beberapa daerah Jawa Barat terserang penyakit yang disebabkan ISKNV.

#### KESIMPULAN

Penyebab penyakit ISKNV pada ikan gurame dapat dideteksi dengan teknik PCR yang ditandai dengan munculnya pita PCR target pada 570 bp dan hasil deteksi berbeda pada setiap daerah.

#### DAFTAR ACUAN

- Taukhid, Purwaningsih, U., Sugiani, D., Sumiati, T., & Lusiastuti, A.M. (2015). Efikasi vaksin in-aktif bakteri *Aeromonas hydrophila*-AHL0905-2 (hydrovac) dan *Streptococcus agalactiae*-N14G (streptovac) untuk pencegahan penyakit bakterial pada ikan budidaya air tawar. *Jurnal Riset Akuakultur*, 10(4), 541-551.
- Gardenia, L. & Koesharyani, I. (2011). Metode isolasi *deoxyribo nucleic acid* bakteri dari organ ikan nila (*Oreochromis niloticus*) untuk diagnosa *Streptococciosis* dengan teknik *Polymerase Chain Reaction*. *Jurnal Riset Akuakultur*. 6(3), 469-477.
- Fatimah, S., Indrawati, A., & Lusiastuti, A.M. (2015). Toksisitas dan imunogenisitas produk ekstraseluler *Mycobacterium fortuitum* pada ikan gurame (*Osphronemus gourami*). *Jurnal Riset Akuakultur*, 10(2), 231-241.
- Rifai, A.H. (2020). *Deteksi dan karakterisasi Megalocytivirus pada budidaya ikan di beberapa daerah di Indonesia*. [Tesis]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.